



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie vegetal
Solanum oblongifolium Dunal, en la provincia de Loja**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Matailo García, Dario Xavier

DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio Ph.D

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

PhD.

Chabaco Patricio Armijos Riofrío

DOCENTE DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Solanum oblongifolium* Dunal, en la provincia de Loja**” realizado por **Dario Xavier Matailo García**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja,.....

.....

Ph.D. Chabaco Patricio Armijos Riofrío.

CI: 1102430509

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Darío Xavier Matailo García** declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Solanum oblongifolium* Dunal, en la provincia de Loja” de la titulación Bioquímica y Farmacia, siendo el Ph.D. Armijos Riofrío Chabaco Patricio director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

.....

Darío Xavier Matailo García

CI: 1104108145

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico a toda mi familia, a mis padres quienes con su amor, confianza, esfuerzo y sobre todo su apoyo incondicional tanto moral como económico, han hecho posible que mi objetivo planteado haya culminado con éxito, ya que con sus consejos de superación me ayudaron a formarme de la manera correcta durante en todo mi trayecto estudiantil, hasta cumplir con éxito mi meta tan anhelada.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, por haberme permitido llegar a este momento tan importante en mi vida como es la culminación de mi carrera universitaria, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría suficiente para culminar con este objetivo tan anhelado, que es el inicio de mi vida profesional.

A mi padre y madre quienes con su apoyo incondicional estuvieron en cada paso de mi etapa universitaria y que han sido un baluarte fundamental dentro de mi formación y obtención de mi título profesional. Gracias a mi novia por todo tu esfuerzo y apoyo incondicional durante el largo trayecto de mi carrera profesional, gracias amor por tu sacrificio y paciencia demostrada en todos estos años.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en especial a la Titulación de Bioquímica y Farmacia por permitirme ser parte integral de la misma; a mis profesores que durante toda mi carrera profesional han aportado a mi formación universitaria. Un agradecimiento especial al Ph.D Chabaco Armijos, Ph.D Gianluca Gilardoni y Mgtr. José Miguel Andrade quienes con su experiencia y sus vastos conocimientos me han guiado en el transcurso de este trabajo de investigación, como ser humano le quedo inmensamente agradecido por cada ayuda.

A mis amigos y compañeros, quienes de una u otra forma estuvieron presentes en el transcurso de la vida estudiantil.

Dario Xavier Matailo Garcia

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	5
1.1. Fin del proyecto	6
1.2. Propósito del proyecto.....	6
1.3. Componentes del proyecto	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes.....	8
2.2. Plantas medicinales	8
2.3. Uso de las plantas medicinales.....	9
2.4. Medicina tradicional.....	10
2.5. Plantas medicinales en Ecuador.....	11
2.6. Plantas medicinales en la región sur del Ecuador.....	11
2.7. Familia Solanaceae.....	12
2.8. Genero <i>Solanum</i>	13
2.9. <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal	14
2.10. Taxonomía de la especie <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal	15
2.11. Metabolitos secundarios	16
2.12. Flavonoides	16
2.13. Cumarinas	18
2.14. Fraccionamiento líquido – líquido	20
2.15. Técnicas cromatográficas	21
2.16. Cromatografía en capa fina (CCF).....	22
2.16.1. Tipos de TLC.	22
2.16.2. Elución de la placa TLC.....	22
2.16.3. Métodos de detección.	23
2.17. Cromatografía en columna.....	23

2.18. Técnicas Espectroscópicas.....	24
2.18.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	24
2.18.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).	25
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Esquema metodológico.....	27
3.2. Recolección de la muestra.....	28
3.3. Tratamiento de la muestra vegetal	28
3.4. Obtención de extractos	28
3.5. Análisis de extracto	29
3.6. Desclorofilación	30
3.7. Fraccionamiento líquido – líquido	30
3.8. Fraccionamiento en columna.....	31
3.8.1. Fraccionamiento en columna del extracto DCM.	31
3.8.2. Fraccionamiento en columna del extracto acuoso.	32
3.9. Cromatografía en capa fina y unión de fracciones.....	33
3.10. Purificación cromatográfica.....	33
3.10.1. Purificación de la fracción F5 obtenida del extracto acuoso.	33
3.11. Identificación de los compuestos aislados.....	34
3.11.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).	34
3.11.2. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)....	34
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS	36
4.1. Extractos de la especie <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal	37
4.2. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna (CC).....	37
4.2.1. Escopoletina aislado del extracto de DCM.	37
4.2.2. Isoquercitrina aislado del extracto acuoso.....	38
4.3. Identificación de compuestos aislados de la especie vegetal <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal.....	39
4.3.1. Identificación de compuesto 1 (FC-4) escopoletina.....	39
4.3.2. Datos del espectro de ¹ H-NMR de la escopoletina.....	40
4.3.3. Determinación del peso molecular del compuesto aislado.	41
4.3.4. Identificación de compuesto 2 (FL-3) isoquercitrina.	43
4.3.5. Datos del espectro de ¹ H-NMR de la isoquercitrina.	43
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de compuestos presentes en la familia Solanaceae.	13
Figura 2. Fotografía de la especie <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal.....	15
Figura 3. Clasificación de los metabolitos secundarios	16
Figura 4. Estructura química del flavonoide.....	17
Figura 5. Estructura química de los principales tipos de flavonoides. a. Flavona. b. Isoflavona. c. Flavonol. d. Antocianidina.	18
Figura 6. Estructura química de la cumarina	19
Figura 7. Características estructurales de las principales cumarinas	19
Figura 8. Fraccionamiento líquido – líquido.	21
Figura 9. Modelo grafico de la elución de placa TLC	22
Figura 10. Detección de compuestos. Mediante cálculo de Rf.	23
Figura 11. Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas	24
Figura 12. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear	25
Figura 13. Esquema metodológico de la investigación	27
Figura 14. Tratamiento de la muestra. a. Secado b. Trituración de la muestra.....	28
Figura 15. Obtención de extractos. a. Maceración b. Filtración c. Rotaevaporación.	29
Figura 16. Análisis de extracto total.	29
Figura 17. Análisis en CCF. Para el proceso de desclorofilación.	30
Figura 18. Extracción líquido - líquido.....	31
Figura 19. Fraccionamiento en columna del extracto de DCM	32
Figura 20. Fraccionamiento en columna del extracto acuoso	32
Figura 21. Condiciones de operación del CG-EM.	35
Figura 22. Especificación de obtención del compuesto FC-4.	38
Figura 23. Especificación de obtención del compuesto FL-3.....	39
Figura 24. Espectro de masas a. Escopoletina identificada en fracción FC-4 b. Escopoletina aislado de <i>Pentacalia vaccinioides</i> (Kunth)	41
Figura 25. Estructura química de escopoletina.....	42
Figura 26. CCF de FC-4 en Hex - AcOEt 4:6. Observado bajo la luz UV.....	42
Figura 27. Estructura química de isoquercitrina	44
Figura 28. CCF de FL-3 en MeOH - H ₂ O 4:6. Observado bajo la luz UV.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de la especie <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal	15
Tabla 2. Característica de la columna capilar CG-EM utilizada.	34
Tabla 3. Rendimiento de los extractos obtenidos.	37
Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto de diclorometano.....	37
Tabla 5. Fracciones obtenidas del extracto acuoso	38
Tabla 6. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción F5	39
Tabla 7. Descripción del compuesto identificado	40
Tabla 8. Comparación del espectro ¹ H-NMR de escopoletina aislado en <i>Ipomoea digitata</i> .40	
Tabla 9. Descripción del compuesto identificado	43
Tabla 10. Comparación del espectro ¹ H-NMR de isoquercitrina aislado en <i>Laetia suaveolens</i>	44

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
H₂O	Agua
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
FLL	Fraccionamiento líquido – líquido
UV	Ultravioleta
RF	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
¹H NMR	Resonancia magnética nuclear de Hidrogeno 1
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
FC-4	Compuesto de extracto DCM
FL-3	Compuesto de extracto acuoso
He	Helio
Hz	Hertz
d	Doblete
dd	Doble doblete
s	Singulete

RESUMEN

En la presente investigación se utilizaron las hojas de la planta medicinal *Solanum oblongifolium* Dunal conocida comúnmente como “Turpe o Mataperros”, recolectada en la parroquia San Lucas, Cantón, Provincia de Loja. De la misma que se realizó la extracción, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas como RMN y CG-EM. Se trabajó a partir de 500 g de muestra seca de la cual mediante maceración estática y rotaevaporación se obtuvo el extracto total, al mismo que se le realizó una desclorofilación y próximo fraccionamiento líquido – líquido utilizando diclorometano, obteniendo dos extractos un acuoso y uno de DCM. Basándose en la riqueza de compuestos y separación de los mismos, dada por cromatografía en capa fina utilizando disolventes en proporciones y polaridad diferente para cada extracto, se fijó las condiciones para su fraccionamiento por cromatografía en columna, las fracciones resultantes fueron purificadas mediante microcolumnas y analizadas por CCF. Identificándose finalmente dos compuestos de naturaleza fenólica, un flavonoide conocido como isoquercitrina resultante del fraccionamiento del extracto acuoso y una cumarina caracterizada como escopoletina, producto del fraccionamiento en columna del extracto de DCM.

Palabras clave: *Solanum oblongifolium* Dunal, metabolito secundario, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, desclorofilación, escopoletina, isoquercitrina.

ABSTRACT

In the present investigation the leaves of the medicinal plant *Solanum oblongifolium* Dunal commonly known as "Turpe or Mataperros", collected in the parish San Lucas, Cantón, Province of Loja were used. From the same that the extraction, isolation and characterization of secondary metabolites were carried out by means of chromatographic and spectroscopic techniques such as NMR and GC-MS. It was worked out from 500 g of dry sample of which by means of static maceration and rotaevaporation the total extract was obtained, to the same one that was carried out a liquid chlorination and liquid fractionation next using dichloromethane, obtaining two extracts an aqueous and one of DCM. Based on the richness of compounds and separation thereof, given by thin layer chromatography using solvents in proportions and different polarity for each extract, the conditions were fixed for fractionation by column chromatography, the resulting fractions were purified by microcolumns and analyzed by TLC. Finally two compounds of phenolic nature were identified, a flavonoid known as isoquercitrin resulting from the fractionation of the aqueous extract and a coumarin characterized as scopoletin, product of column fractionation of DCM extract.

Keywords: *Solanum oblongifolium* Dunal, secondary metabolite, column chromatography, thin layer chromatography, dechlorophyllation, scopoletin, isoquercitrin.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación tiene por objetivo el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Solanum oblongifolium* Dunal, los principios activos son moléculas bioactivas que se encuentran presentes en distintas partes de la planta y que ejercen una acción farmacológica en el ser humano, ya que muchos de estos componentes aislados poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre (Roldan, 2004).

Las plantas medicinales han sido por generaciones un recurso fundamental para las comunidades campesinas e indígenas de nuestro país, caracterizadas por ser poseedoras de una gran herencia ancestral sobre el uso de plantas con fin medicinal, se estima que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales para atención primaria de la salud. Varios de los medicamentos desarrollados sintéticamente han sido muy controversiales, costosos o pocos efectivos; circunstancias que han motivado la búsqueda de compuesto naturales que tengan actividad biológica y baja toxicidad. Múltiples plantas del genero *Solanum*, con conocidas por sus usos en la medicina para el control de algunas enfermedades causadas por hongos, nematodos e insectos (Ansaloni et al., 2010).

Ecuador posee alrededor de 5172 especies útiles, 60% lo son en medicina, 55% se usan como materiales de construcción, 30% en alimentación y 20% son utilizados en los llamados usos sociales, los cuales incluyen rituales de sanación y purificación (De la Torre, 2008). La región sur destaca el gran aporte de las provincias de Loja y Zamora con los grupos shuar, saraguro y mestizo en las que poseen más de 275 especies de plantas medicinales con 68 usos terapéuticos distintos, en Saraguro se describen un total de 183 plantas distribuidas en 68 familias entre las más representativas son las Asteráceas con 30 spp, del número total de plantas 96 son usadas por visionarios, 69 por herboristas 52 por una partera y 12 por un sobador (Andrade et al., 2009).

La familia solanaceae se ha caracterizado por ser una especie vegetal de gran aporte en estudios de investigación por su gran riqueza de compuestos activos, ya que se destaca por producir en la mayoría de sus órganos alcaloides tóxicos como la nicotina, la atropina y la solanina, contiene aproximadamente 96 géneros y 2,300 especies. Los géneros con mayor número de especies son: *Solanum* (1,000), *Lycianthes* (200), *Cestrum* (175), *Nicotiana* (95) y *Lycium* (75) ,la mayoría de estos géneros tienen su centro de origen ubicado en América del sur (Sierra, Siqueiros, & Moreno, 2015).

El uso de la especie vegetal *Solanum oblongifolium* Dunal por parte de las comunidades ha generado gran interés para el desarrollo de la investigación, ya que estas usan sus hojas por medio de infusión actuando como antiinflamatorio, antipirético, y purgante. También se caracteriza por su gran uso como estimulante del sistema nervioso central aumentando la actividad motriz y cognitiva, reforzando el estado de alerta y la atención. Y de la cual se conoce que podría poseer algunos alcaloides esteroidales como fuente de su principal principio activo (Salinas, 2012).

Estudios realizados en hojas de la especie *Solanum oblongifolium* Dunal destacan la presencia de metabolitos secundarios llamados glicoalcaloides, los mismos que se encuentran en 15,286 mg% de hojas desecadas, calculados como tomatina. Estos glicoalcaloides presentes en la especie presentan actividad citotóxica y citostática, presentan también actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella* entérica, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans* luego de 30 minutos y de 24 horas de enfrentamiento (Olortegui & Brañez, 2009). Por la caracterización de sus compuestos bioactivos y sus usos etnobotánicos, se ha determinado que se trata de una especie medicinal de gran interés medicinal para el desarrollo de la presente investigación.

CAPÍTULO I
FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin del proyecto

El presente estudio aportara a fortalecer e impulsar el uso de plantas medicinales con la finalidad de obtener nuevos metabolitos que puedan llevar al desarrollo de nuevos fármacos que favorezcan al tratamiento de enfermedades.

1.2. Propósito del proyecto

Aislar e identificar metabolitos secundarios a partir de extractos totales de las partes aéreas de la especie medicinal *Solanum oblongifolium* Dunal, mediante técnicas cromatografías

1.3. Componentes del proyecto

- 1.- Revisión bibliográfica de la especie psicoactiva usada en medicina tradicional por comunidades del sur del Ecuador.
- 2.- Recolección y maceración de las hojas de especie *Solanum oblongifolium* Dunal.
- 3.-Obtener extractos totales en disolventes con polaridades diferentes y fraccionamiento de los extractos biológicamente activos.
- 4.- Obtención de metabolitos secundarios correctamente aislados e identificados, mediante técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y Cromatografía de Gases Acoplada a Espectroscopía de Masas (CG-EM).

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La utilización de plantas como medio de curación viene desde hace más de 5000 años atrás, en la mayoría de las culturas antiguas se consideraba la enfermedad como un castigo de los dioses por lo que los curanderos trataban a los enfermos a base de conjuros y ritos con pócimas mágicas preparadas con plantas locales, sus efectos positivos para la sanación de enfermedades han hecho profundizar el estudio de especies vegetales con propiedades medicinales y ampliar su experiencia con los preparados que se extraen de ellas determinando su principal principio activo (Linares, 2013).

Debido a la sabiduría ancestral e innata de nuestras comunidades hoy en día la medicina tradicional se ha convertido en un recurso fundamental para la salud humana, las especies vegetales empleadas son la base del desarrollo de la medicina moderna para la producción de nuevos fármacos, mediante el estudio de sus componentes que se centran en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano (Morales, Edith, & Pérez, 2015).

Tal ha sido el éxito de las plantas como fuente para aislar compuestos bioactivos para su uso directo o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química para producir nuevas entidades patentables con mayor actividad y/o menor toxicidad que, en la actualidad, casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos que se caracterizan por ser sustancias que se encuentran en sus distintas partes u órganos de las plantas (Barquero, 2007).

2.2. Plantas medicinales

Las plantas medicinales se caracterizan por que contienen en su estructura elementos activos que son los componentes considerados terapéuticos, que se pueden aislar mediante la obtención de extractos y técnicas cromatográficas, por lo general el principio activo que se encuentra en cantidad mayoritaria es el responsable de la actividad terapéutica de la planta para finalmente ser empleado como droga medicinal, muchos de estos componentes aislados ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre. Por ello su importancia para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos (Roldan, 2004).

De las 260.000 especies de plantas que actualmente se conocen, se dice que el 10% son consideradas medicinales, el estudio de plantas se basa en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre los seres vivos, estos principios activos pueden ser sustancias simples como alcaloides o mezclas complejas como resinas, aceites esenciales, etc.; sin embargo los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos que pueden ser glucósidos (Perez, 2008).

2.3. Uso de las plantas medicinales

El uso de plantas medicinales es resultado de la experiencia e íntimo contacto con la naturaleza que el hombre ha acumulado por generaciones y qué ha sido de gran importancia dentro de las diversas poblaciones del Ecuador usadas desde hace muchos años atrás por varias comunidades pertenecientes a las zonas rurales e indígenas de nuestro país, en cada región las nacionalidades indígenas han desarrollado su propio sistema de aprovechamiento de las especies vegetales identificando sus propiedades y su fin medicinal (Gomez, 2012).

Se caracterizan por poseer sustancias curativas que usan como cicatrizantes, antiinflamatorio, antifúngico o antiparasitario entre otras, esto varía en función del principio activo. Para obtener estos elementos activos hay que hacer procesos especiales, el proceso varía en función de la parte de la planta y de la enfermedad a tratar, en la mayoría las partes utilizadas son, flores, frutos, hojas, la corteza o raíz, eso depende de la parte donde se encuentren de los principios activos mayoritarios (Pierre, 2013).

Las plantas medicinales pueden ser usadas solas o mezcladas con otras, a continuación se describen las formas de uso de las plantas.

Uso interno

- **Infusiones:** se obtiene usando agua caliente y vertiendo la parte de la planta seca.
- **Cocimiento:** consiste en cocer las plantas en agua hirviendo, ellas sueltan sus principios activos en el agua poco a poco con el transcurso del hervor
- **Té:** consiste en echar agua hirviendo en las plantas y dejar reposar durante un tiempo, poco a poco los principios activos de la planta van pasando al agua y esta va cambiando de color progresivamente

Uso externo

- **Baño:** se moja completamente el cuerpo o una parte del cuerpo en una preparación de plantas
- **Los lienzos:** aplicación de un paño empapado sobre la parte afectada
- **Cataplasma:** es una pasta de plantas que se aplica directamente sobre la parte afectada
- **El colirio:** es un cocimiento salado usado para afecciones oculares
- **Inhalaciones:** preparado de vapor que sirve para despejar las vías respiratorias
- **Enjuagues bucales:** se usa decocciones de plantas o agua salada para sanar enfermedades de la boca o encías.

2.4. Medicina tradicional

En la actualidad la medicina tradicional se ha convertido en un recurso fundamental para la industria farmacéutica mediante la obtención de nuevos principios activos, teniendo en cuenta que las plantas y árboles empleados son la base para la obtención de los mismos cuya finalidad es avanzar con el desarrollo de la medicina moderna a través de la elaboración de nuevos fármacos (Ríos, Michael, Borgtoft, & Granda, 2007).

Las plantas medicinales y sus productos naturales, han estado presente por siglos, incluso desde la edad antigua, se utilizaban ciertas plantas y sus derivados en China, Babilonia y Egipto. Con el paso del tiempo las plantas ha sido una fuente importante en la elaboración de medicamentos. En los últimos 20 años en Gran Bretaña y Estados Unidos, los componentes activos de los medicamentos que se suministran, primeramente, se las conoció como plantas de uso común (Oramas Díaz & Rodríguez Luis, 1999).

La medicina tradicional en el Ecuador se ha venido practicando desde tiempos inmemoriales por varias de nuestras comunidades, en las donde se caracterizan por ser el medio de atención primaria en salud. Este conocimiento sobre la medicina tradicional es conocido teocéntricamente como “medicina complementaria o alternativa”, que va creciendo en países desarrollados permitiendo un incremento en la calidad y esperanza de vida de la población (Vides & Alvarez, 2013).

2.5. Plantas medicinales en Ecuador

A lo largo de los años las plantas medicinales han sido un recurso fundamental para las comunidades campesinas e indígenas de nuestro país, incluso se conoce que hasta la actualidad se usa de manera directa o indirecta el uso de plantas como medio curativo, se estima que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales para la atención primaria de la salud y bienestar (Ansaloni et al., 2010).

Ecuador se caracteriza por poseer una gran diversidad de la flora que ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo por su gran riqueza cultural y terapéutica, ya que se caracteriza por poseer el mayor número de especies calculando aproximadamente de 20000 a 30000 especies vasculares de las cuales se encontraron 3118 especies medicinales pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines terapéutico, el 75% de estas especies son plantas nativas y el 5% de ellas son endémicas, mientras que el 11% son introducidas en el Ecuador. Las 206 especies curan 74 dolencias, según el mayor número de especies que incluye nueve dolencias tratadas el orden de importancia es el siguiente: 80 para la inflamación, 32 circulación, 29 estomacal, 27 limpiados, 16 resfrío, 14 cicatrizante, 13 aromática, 12 cefalea, baño posparto y 11 fortificante (De la Torre, 2008).

2.6. Plantas medicinales en la región sur del Ecuador

La región sur del Ecuador se considera botánicamente rico y sorprendente ya que nos proporciona una gran herencia cultural y ancestral, la mayoría de plantas del sur son principalmente usadas por visionarios, parteras y sobadores, también se destaca el gran aporte de las provincias de Loja y Zamora con los grupos shuar, saraguro y mestizo en las que poseen más de 275 especies de plantas medicinales utilizadas para 68 afecciones diferentes (Malagon et al., 2015). Su mayor área vegetal se encuentra representada por el Parque Nacional Podocarpus y posee 211 especies endémicas, con 99 especies 'del área lo cual representa el número más alto de endemismo de todas las áreas protegidas (Ansaloni et al., 2010).

Dentro de los grupos étnicos más representativo de la región sur, se encuentran los saraguros que es una comunidad caracterizada por poseer una gran variedad de conocimientos ancestrales en la utilización de plantas medicinales y de la cual se conoce que hasta la

actualidad conservan costumbres de sus antepasados con relación al uso de especies vegetales como medio curativo de diversas enfermedades. (Chalán & Guamán, 2015).

En Saraguro se describen un total de 183 plantas distribuidas en 68 familias entre las más representativas son las Asteráceas con 30 spp, del número total de plantas 96 son usadas por visionarios, 69 por herboristas 52 por una partera y 12 por un sobador (Andrade et al., 2009).

2.7. Familia Solanaceae

Las solanaceae pueden ser plantas herbáceas, sub-arbustos, arbustos, árboles o lianas; además pueden estar provistas de tubérculos subterráneos, las hojas generalmente son pecioladas o subsésiles, raramente sésiles coriácea o también pueden ser espinas; la lámina foliar puede ser simple o compuesta, la nerviación de las hojas es reticulada y no presentan un meristema basal, en lo que se refiere a la anatomía foliar, las láminas generalmente son dorsiventrals, sin cavidades secretoras, los estomas se hallan confinados en una de las caras, raramente en ambas caras (Carmona, Gil, & Rodríguez, 2008).

Se ha caracterizado por ser una especie vegetal de gran aporte en estudios de investigación por su gran riqueza de compuestos activos, ya que se destaca por producir en la mayoría de sus órganos alcaloides tóxicos, contiene aproximadamente 96 géneros y 2,300 especies. Los géneros con mayor número de especies son: *Solanum* (1,000), *Lycianthes* (200), *Cestrum* (175), *Nicotiana* (95) y *Lycium* (75) ,la mayoría de estos géneros tienen su centro de origen ubicado en América del sur (Sierra et al., 2015).

Dentro de los grupos más importantes de metabolitos secundarios identificados en la familia solanaceae se encuentran los alcaloides (nicotina, escopolamina, nornicotina), terpenos (capsidiol, dihidrocapsenona), componentes fenólicos (Cafeoilputrescina) y glicoalcaloides como la solamargina y solanina) importantes para el control de algunas enfermedades por hongos e insectos (Aguirre, 2005). A continuación se observan varias estructuras de algunos compuestos que contiene esta familia (Figura 1).

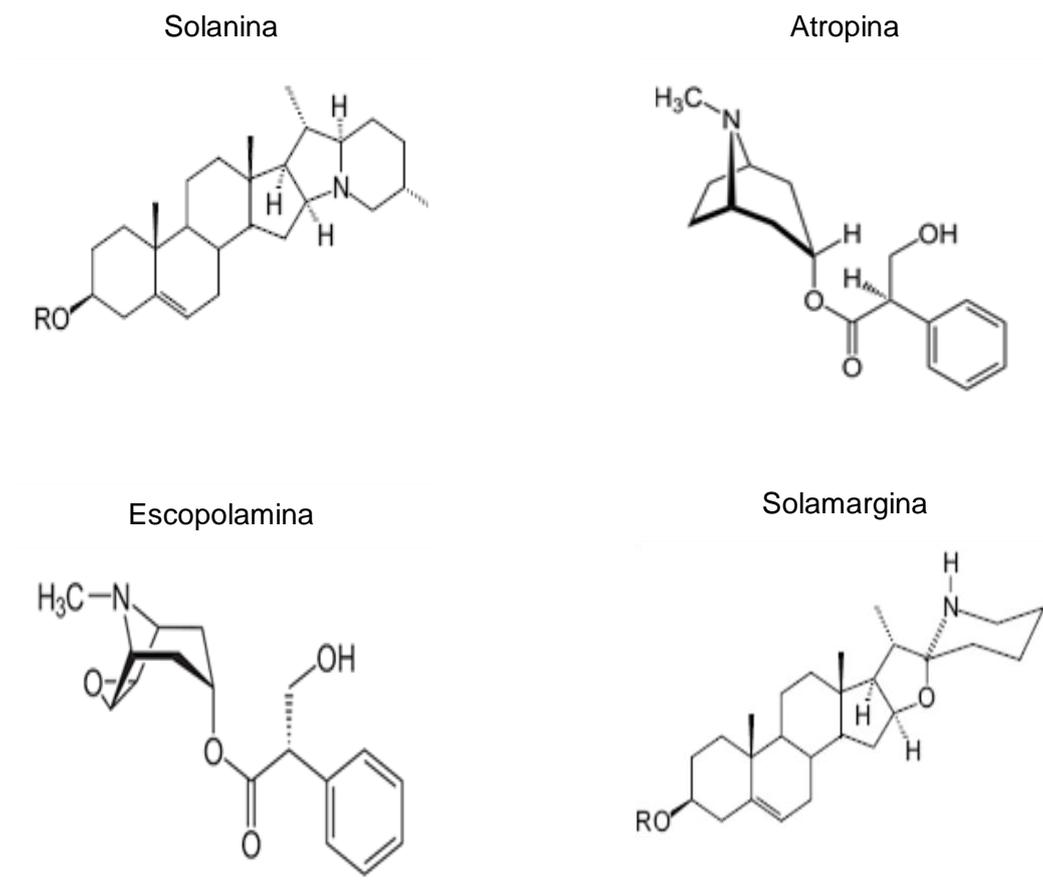


Figura 1. Estructuras de compuestos presentes en la familia Solanaceae.
Fuente: (Aguirre, 2005)
Elaborado por: (Autor, 2017)

2.8. Genero *Solanum*

Considerado como el género más grande de angiospermas, ya posee el mayor número de especies de la familia solanaceae con alrededor de 1000 a 1500 especies entre hierbas y árboles, distribuidas en trópicos, subtrópicos y son conocidas como fuentes de sustancias estructuralmente muy relacionadas con las saponinas esteroidales llamados glicoalcaloides, la más alta concentración de especies se encuentra en los Andes y en el Sur Este de Brasil ya que son especies que crecen en bosques húmedos tropicales. Dentro de su gran diversidad incluye especies importantes como tomate, tubérculos y plantas ornamentales que se caracterizan por poseer una gran actividad comercial por lo que se denominan económicamente importantes (Orozco & Beltrán, 2008).

2.9. *Solanum oblongifolium* Dunal

Es una especie vegetal perteneciente a la familia de las solanaceae, conocida comúnmente como "Turpe" o "Mataperros" de la cual se conoce que podría poseer algunos alcaloides esteroideos como fuente de su principal principio activo. Se encuentra presente en la sierra ecuatoriana y es usada por las comunidades como antiinflamatorio, antipirético, y purgante mediante infusión en frío de las mismas, sin embargo la sobredosis puede ser fatal. Las infusiones de las hojas de esta especie vegetal también se usan como insecticida popular para proteger cultivos de algunas enfermedades por hongos, nemátodos e insectos (Salinas, 2012).

Esta planta se caracteriza por poseer un olor desagradable, crece especialmente en los bosques secundarios o en los cercos y también es usado por las comunidades para el mal de aire en la cual se utilizan las ramas directamente mezcladas con ruda, romero, chilchil, y poleo grande. Su aplicación es mediante limpias por todo el cuerpo, excepto la cabeza (Andrade et al., 2009).

Se destaca también por su gran uso como estimulante del sistema nervioso central (SNC), aumentando la actividad motriz y cognitiva, reforzando el estado de alerta y la atención, con duración de efectos limitada ya que entre sus principios activos se puede encontrar la solafilidina, a la cual estudios farmacológicos la reportan como una droga activa que actúa sobre el sistema nervioso (Olortegui & Brañez, 2009).

Se caracteriza por ser un árbol de 4 a 8 m de altura posee flores blancas y frutos redondos verdes, hojas opuestas, imparipinadas. Hojuela en 5 a 7 pares, oblongolanceoladas, de 6 a 10 cm de largo por 4 a 5 cm de ancho, glabras, con bordes enteros, ápice redondeado o brevemente acuminado. La harina de la semilla se comporta como un convulsivante enérgico y ha sido utilizada por los naturales para la eliminación de perros y animales salvajes carnívoros, dentro de sus principales síntomas producto del efecto tóxico de su fruto son dolor estomacal, vomito, aumento de temperatura, parálisis y finalmente la muerte por fallo cardiaco (Schnee, 1984).

Esta especie vegetal se puede encontrar en varios países de Sudamérica como Perú, Colombia, Ecuador y Venezuela ya que se caracteriza por ser una especie propia de climas templados, frío y subparamo. En la mayoría de estos países dentro de las zonas rurales las hojas de esta planta también son utilizadas para tratar la inflamación muscular en los animales, específicamente en las acémilas, que se da por efecto de llevar carga muy pesada y ajustada por lo cual se usa el zumo de las hojas frescas es aplicado en las heridas para mejorar su cicatrización (Olortegui & Brañez, 2009).

2.10. Taxonomía de la especie *Solanum oblongifolium* Dunal



Figura 2. Fotografía de la especie *Solanum oblongifolium* Dunal

Fuente: Herbario UTPL

Elaborado por: (Autor, 2017)

Tabla 1. Descripción taxonómica de la especie *Solanum oblongifolium* Dunal

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum oblongifolium</i>

Fuente: (Olortegui, J., & Brañez, M. 2009)

Elaborado por: (Autor, 2017)

2.11. Metabolitos secundarios

Las plantas se han caracterizado por que poseen además de su metabolismo primario, uno secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios que se distribuyen diferencialmente en grupos taxonómicos, los cuales presentan propiedades biológicas y poseen funciones ecológicas, se caracterizan por sus usos y aplicaciones como en medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes (Ávalos & Garcia, 2009).

Estos poseen un amplia variedad de estructuras químicas y han sido de gran importancia para la industria farmacéutica mediante el empleo de nuevos principios activos, teniendo en cuenta que las plantas son la base para la obtención de los mismos ,cuya finalidad es avanzar con el desarrollo de la medicina moderna a través de la elaboración de nuevos fármacos (Ríos, J. Koziol, Borgtoft, & Granda, 2007). Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales detalladas a continuación (Figura 3):

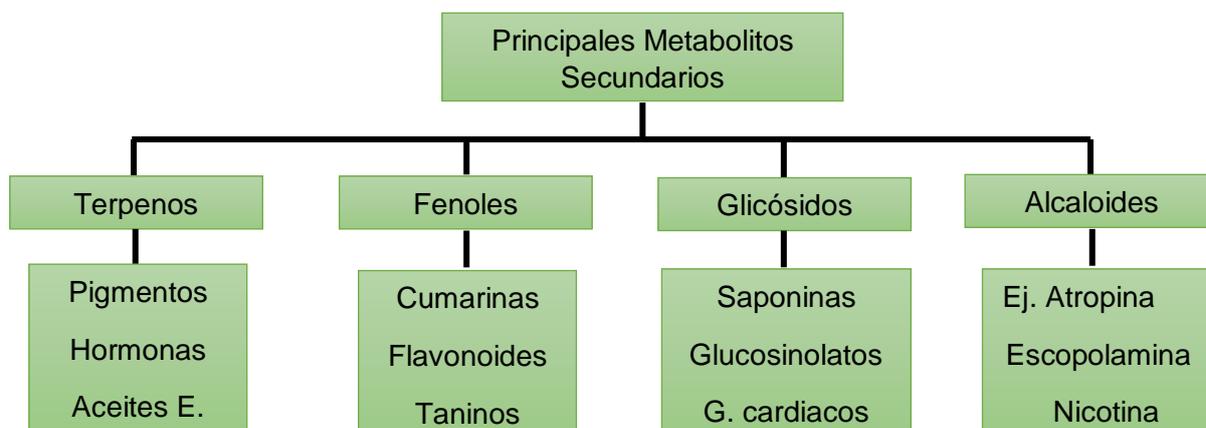


Figura 3. Clasificación de los metabolitos secundarios

Fuente:(Ríos et al., 2007)

Elaborado por: (Autor, 2017)

2.12. Flavonoides

Los flavonoides se caracterizan por ser compuestos químicos que abarcan varias clases de sustancias naturales, entre las cuales están muchas de las que les confieren los colores amarillo, naranja, rojo, violeta o azul a muchas hojas flores y frutos. Se han identificado más de 5000 flavonoides diferentes importantes en la salud humana por sus efectos positivos debido a su acción antiinflamatoria, antimicrobiana, antialérgica, anticancerígenas y antioxidantes (Escamilla, Cuevas, & Guevara, 2009).

Son compuestos de naturaleza fenólica de bajo peso molecular y se caracterizan por poseer 2 anillos fenólicos (A y B) ligados mediante un anillo pirano (C) a través de un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6. Los anillos denominados A, B y C pertenecientes a la estructura de los flavonoides se describen en la (Figura 4), los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6' (Cartaya & Reynaldo, 2001).

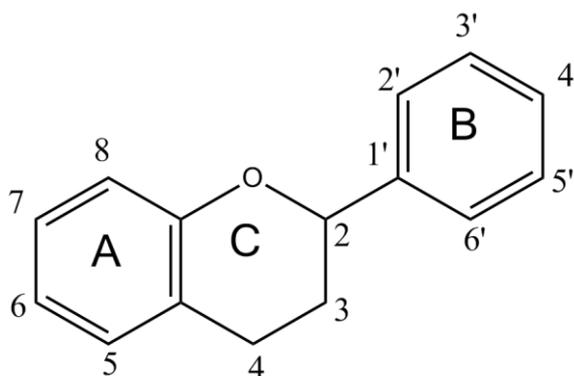


Figura 4. Estructura química del flavonoide

Fuente: (Cartaya & Reynaldo, 2001)

Elaborado por: (Autor, 2017)

De la gran variedad de flavonoides existen aquellos que suelen estar presentes en forma de glucósidos, que significa que están unidos con moléculas de azúcar como la glucosa, xilosa, ramnosa y arabinosa. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianidinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas (Lopez, 2017).

Las Flavonas, como la diosmetina, poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3 (Figura 5a); Isoflavona, su anillo fenólico B está unido al átomo C3 del anillo de la pirona (Figura 5b); Flavonoles, representados por la quercitina, posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C (Figura 5c) y Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Figura 5d) (Gonzalez, Martinez, & Tuñón, 2002).

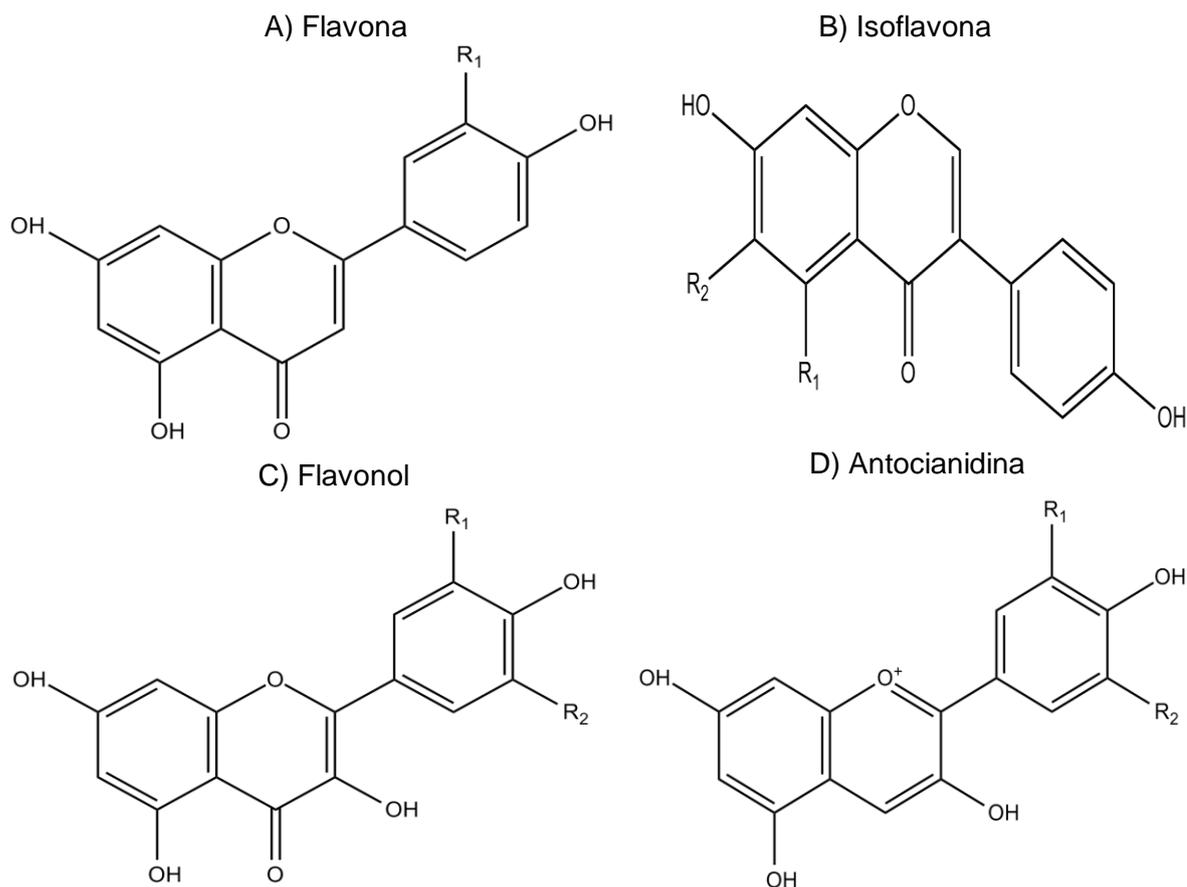


Figura 5. Estructura química de los principales tipos de flavonoides. **a.** Flavona. **b.** Isoflavona. **c.** Flavonol. **d.** Antocianidina.
Fuente: (Gonzalez et al., 2002)
Elaborado por: (Autor, 2017)

2.13. Cumarinas

Se caracterizan por ser un grupo muy amplio de compuestos químicos fenólicos, de origen natural o sintético y que han sido estudiadas desde hace mucho tiempo debido a su gran interés por sus propiedades farmacológicas como antiinflamatorio, antimicrobiano, antiespasmódico, antiviral, antioxidante. Se han aislado aproximadamente 1000 derivados de más de 800 especies, entre estos existen derivados tricíclicos o tetracíclicos de cumarinas que se comportan como intercalantes del ADN, por tanto tienen interés como antitumorales (Serra, 2006).

Este tipo de compuestos se identifican por su estructura heterocíclica en los que se destacan los metabolitos C3-C6 que son los más característicos en las cumarinas, la cual es la cabeza de una amplia clase de compuestos (Figura 6). Dentro de su sistema vegetal pueden

encontrarse en hojas, raíces, flores y frutos de diferentes familias de las angiospermas, tales como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Umbelliferae, entre otras. (Matos, 2013)

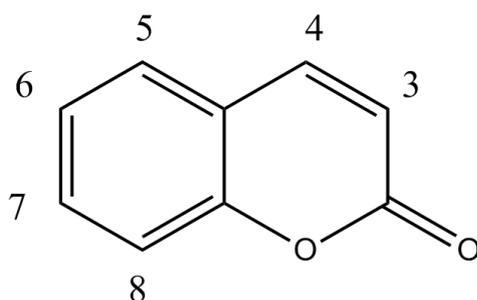


Figura 6. Estructura química de la cumarina
Fuente: (Matos, 2013)
Elaborado por: (Autor, 2017)

La diversidad en su estructura de los compuestos derivados de las cumarinas permite su clasificación en cumarinas simples o en cumarinas más complejas y cumarinas policíclicas entre las cuales tenemos las furanocumarinas que son fotosensibilizadoras de la piel, por ello su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel y las piranocumarinas que tienen acción antiespasmódica y vasodilatadora (Serra, 2006). A continuación se detallan principales estructuras de la clasificación de las cumarinas (Figura 7):

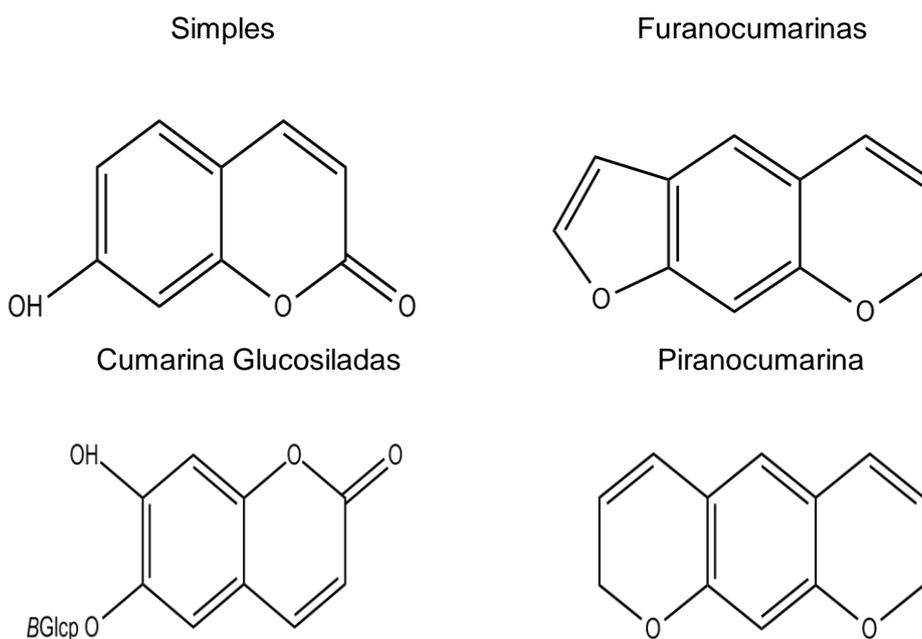


Figura 7. Características estructurales de las principales cumarinas
Fuente: (Serra, 2006)
Elaborado por: (Autor, 2017)

2.14. Fraccionamiento líquido – líquido (FLL)

Esta técnica se basa en el reparto o distribución de un compuesto deseado y de las impurezas u otros compuestos de polaridad diferente entre el medio orgánico y el medio acuoso. Se define el coeficiente de reparto (K) como la solubilidad del compuesto en el medio orgánico dividido por su solubilidad en el medio acuoso (Huerta, 2008).

El fraccionamiento líquido – líquido (FLL), se suele llevar a cabo mediante la utilización de una fase acuosa (agua, disoluciones acuosas ácidas, disoluciones acuosas básicas) y una fase orgánica de modo que el compuesto deseado suele extraerse a la fase orgánica dejando muchos compuestos polares en la fase acuosa. Generalmente el compuesto orgánico aislado no se lo obtiene puro pero es un primer paso de purificación que permite eliminar muchas de las impurezas que contiene dentro de la mezcla y por lo general no se realiza una sola extracción con todo el volumen de disolvente orgánico, sino que se realizan 2 o 3 extracciones ya que así se optimiza la extracción del compuesto deseado (Gándara, 1995).

Uno de los requisitos imprescindibles para el disolvente orgánico es que sea inmisible con el agua y el otro es que nos proporcione una constante de reparto lo mayor posible para optimizar la extracción del compuesto deseado al medio orgánico. Este proceso se lo lleva a cabo en un embudo de decantación en el cual se logra de manera efectiva mezclar y decantar las fases. La posición relativa de ambas fases (arriba o abajo) depende de la relación de densidades, los disolventes clorados como: cloroformo, cloruro de metileno, diclorometano quedan siempre en la parte inferior y disolventes como: éter etílico, acetato de etilo, tolueno, benceno, hexano quedan siempre en la capa superior. (García, 2013)

El compuesto a extraer denominado soluto (A) se pone en contacto con el líquido denominado solvente (B) forman una fase acuosa, si la fase acuosa se mezcla con el disolvente inmisible (C), el soluto (A) pasa al disolvente (C). Cumpléndose la condición de que la solubilidad del componente (A) en el disolvente (C) sea mayor que la del líquido en la que fue disuelto (B). A su vez, el líquido portador (B) debería ser prácticamente insoluble en el disolvente (C). (Figura 8).

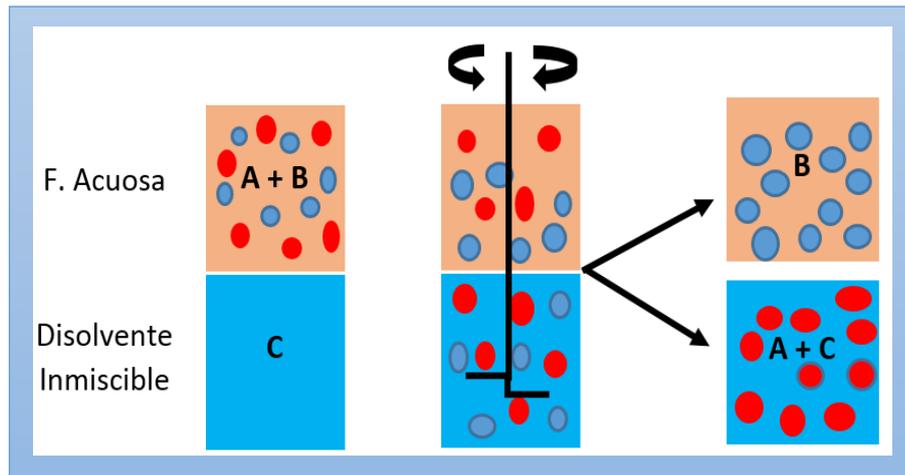


Figura 8. Fraccionamiento líquido – líquido.
Elaborado por: (Autor, 2017)

2.15. Técnicas cromatográficas

Estas técnicas se caracterizan por ser un método analítico de primer orden para separar, identificar y cuantificar compuestos químicos, mediante la separación de componentes que están estrechamente relacionados en mezclas complejas, los compuestos a separar se distribuyen entre dos fases, una móvil y otra fase estacionaria. El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos de sorción – desorción durante la migración del eluyente por capilaridad logrando separar por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla en análisis. (Whitaker, 2012)

Se caracteriza por ser una de las técnicas más efectivas para identificar los compuestos químicos, se afirma que el método fue desarrollado por el botánico ruso Mikhail Tswett, en 1906; pero, la primera descripción data de 1855 hecha por Karl Runge, un químico alemán, que separó materiales inorgánicos en papel; sin embargo, llegó a ser una técnica seria con los estudios de Archer Martin y John Synge en 1944, los mismos que recibieron el Premio Nobel por el desarrollo de la metodología de la cromatografía de reparto. Actualmente existen varios tipos de cromatografía como son: de absorción, de reparto, de intercambio iónico y de tamiz molecular y otras técnicas especializadas para usar en diferentes tipos como: cromatografía en columna, en papel, de capa fina y de gases. (Freifelder, 2003).

2.16. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina o TLC, permite la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente. Esta técnica cromatográfica consiste en una fase estacionaria polar (comúnmente se utiliza sílice gel) y una fase móvil que puede ser un disolvente o mezcla, cada compuesto muestra valores de R_f y colores característicos para determinados compuestos. La separación en TLC, muestra la migración de componentes en zonas características, estas zonas pueden ser observadas en luz visible UV-254 nm y UV-365 nm (Lewis & Moody, 1989).

2.16.1. Tipos de TLC.

Existen comercialmente diferentes tipos de placas cromatográficas, las más utilizadas son la sílice gel 60 F_{254} (Fase directa) y para el caso de la separación de compuestos más polares usamos la RP-18 F_{254} (Fase inversa). Cuando utilizamos las TLC fase reversa, se usa una fase móvil polar, mientras que en la cromatografía fase directa, se utiliza una fase móvil apolar o medianamente polar (Novo, Nieves, Díaz, & Ruiz, 2010).

2.16.2. Elución de la placa TLC.

La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil (Figura 9). El eluyente va migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada (Herrera & Vidal, 2015).

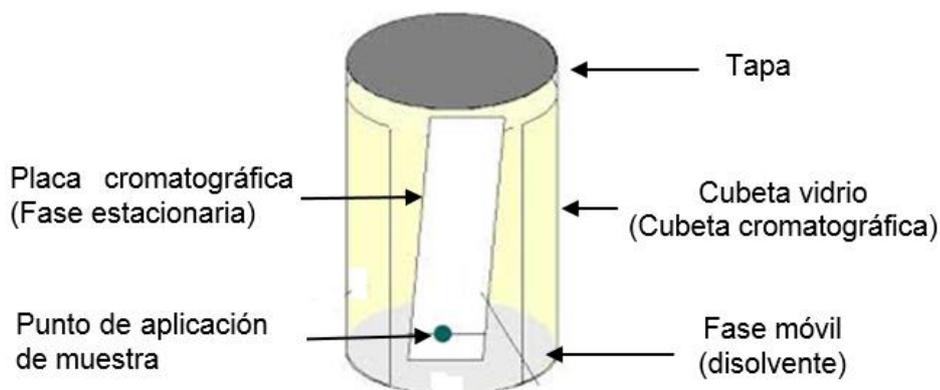


Figura 9. Modelo gráfico de la elución de placa TLC

Fuente: (Herrera & Vidal, 2015)

Elaborado por: (Autor, 2017)

2.16.3. Métodos de detección.

Con la finalidad de conocer la presencia de determinados compuestos, se utilizan ciertos reveladores como sustancias químicas que pueden reaccionar con algunos compuestos dando colores característicos, estos pueden ser ácido sulfúrico 5%, vainillina, sulfato sérico o reactivo dragendorff, para obtener la coloración producto de la oxidación se procede a calentar la placa en una plancha calefactora o con una secadora de aire. También se toma en cuenta el Rf o factor de retención que es la medida de la migración de una sustancia determinada en un solvente (Puma, Mayorga, & Lamas, 2013). Para calcular el Rf se aplica la fórmula detallada a continuación (Figura 10):

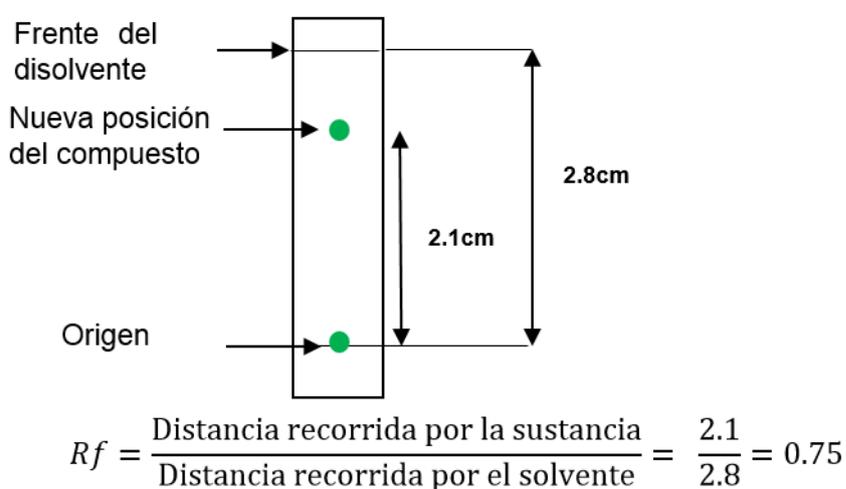


Figura 10. Detección de compuestos. Mediante cálculo de Rf.

Fuente: (Puma et al., 2013)

Elaborado por: (Autor, 2017)

2.17. Cromatografía en columna

Esta técnica se utiliza para separación y purificación de compuestos de una mezcla, en la que se usa una columna de vidrio cuya dimensión se determina dependiendo de la cantidad de extracto o mezcla a separar, se usa una fase móvil con un solo disolvente o mezcla de ellos y una fase estacionaria que generalmente el adsorbente que se usa es gel de sílice, que puede ser sílica gel 60 F₂₅₄ (Fase directa) o RP-18 F₂₅₄ (Fase inversa) dependiendo de la polaridad de los compuestos a separar, ya que si la fase móvil es menos polar que la estacionaria, los solutos menos polares serán eluidos primero y los más polares quedaran retenidos por lo que generalmente se aumenta la polaridad del disolvente utilizado. Los compuestos van saliendo por separado de la columna cromatográfica los cuales son finalmente recogidas en fracciones para su análisis en CCF (Martinez, 1997).

2.18. Técnicas Espectroscópicas

2.18.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Se caracteriza por ser una técnica potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas, la combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la han convertido en una técnica muy usada para determinar la confirmación o ausencia de un compuesto, mediante una comparación del cromatograma de la sustancia pura con el de la muestra, siempre que la obtención de ambos sean idénticos. El analito pasa en forma gaseosa a través de la columna, arrastrándola por una fase móvil gaseosa, llamada gas portador, la fase móvil normalmente es He, N₂ o H₂ y la fase estacionaria un líquido no volátil pero también puede ser un sólido, analito es un gas o líquido volátil (Romero, 2002).

La mezcla que se va analizar es inyectada en el cromatógrafo de gases que se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los compuestos aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas, en este proceso el espectrómetro de masas además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma, en efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico del área proporcional a la concentración del compuesto detectado, la combinación de estas dos técnicas permite la separación e identificación de compuestos con un gran porcentaje de eficacia (Gutiérrez, 2002).



Figura 11. Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
Fuente: (Autor, 2017)

2.18.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).

La resonancia magnética se considera , como el fenómeno de interacción entre una onda de radio frecuencia de entre 2 y 200 MHz y los núcleos atómicos, o protones sometidos a un campo magnético estático externamente aplicado. La tecnología de la resonancia magnética se basa en los momentos magnéticos que presentan los núcleos atómicos. El núcleo del átomo está constituido por un determinado número de protones y neutrones, los analizados con más frecuencia son ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P (Aristizábal, 2007).

La cual se basa en la medición de la absorción de radiación de radiofrecuencia que experimenta una muestra situada en un campo magnético fuerte, cuando los campos magnéticos son altos, es necesario utilizar instrumentos más sofisticados con campos magnéticos estables, actualmente los espectrómetros de resonancia magnética trabajan a 200, 300, 400, 500 , 600 MHz y son los que aportan señales a través de desplazamientos químicos dando información de la naturaleza de los hidrógenos o de carbonos . Este método como la espectrometría de masas y la de infrarrojo, son de gran importancia en la determinación de la estructura molecular de compuestos orgánicos y macromoléculas tanto bioquímico como sintéticas (Valcárcel & Gómez, 1988).



Figura 12. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear
Fuente: (Autor, 2017)

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Esquema metodológico

A continuación se detalla el esquema de la metodología utilizada en la presente investigación (Figura 13).

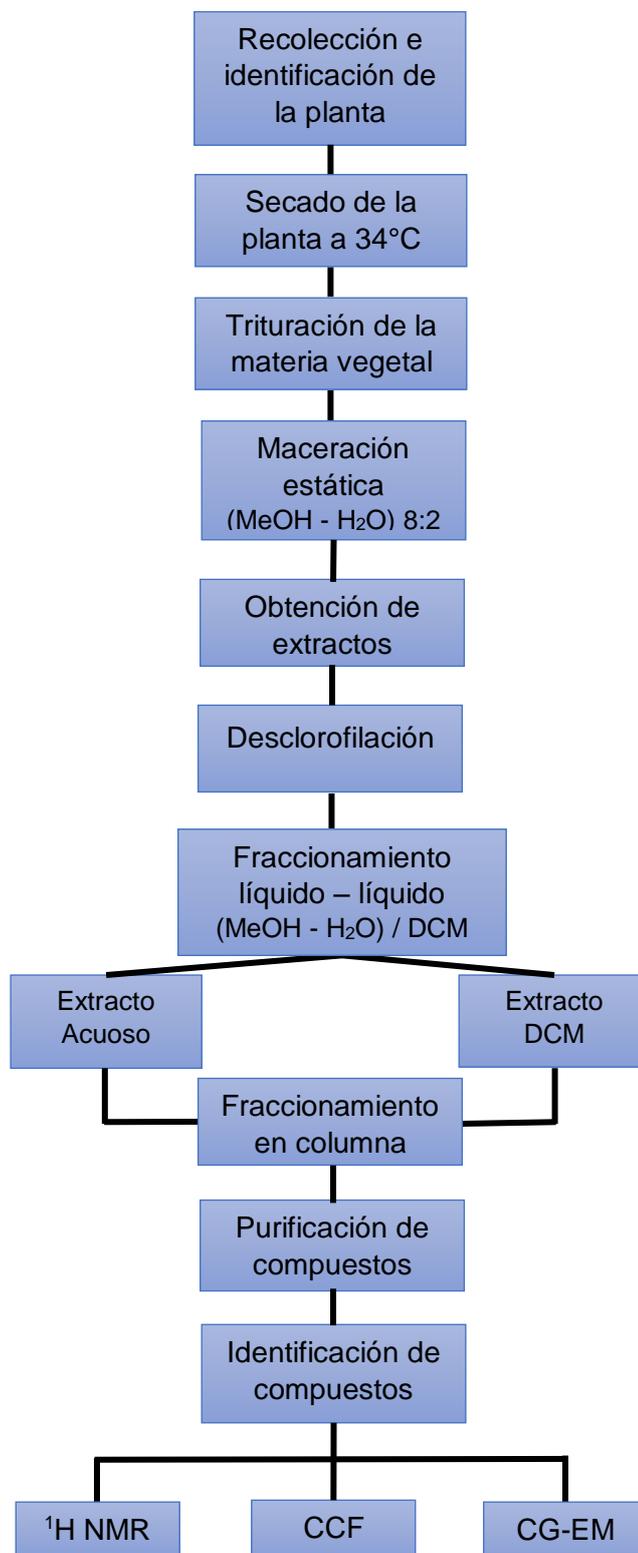


Figura 13. Esquema metodológico de la investigación
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.2. Recolección de la muestra

La muestra vegetal se recolectó en la parroquia San Lucas, Cantón, Provincia de Loja, las coordenadas geográficas del sitio de recolección son: 17692602E - 9590410N y una altitud de 2695 m s.n.m. Un ejemplar de la muestra se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con el código de voucher PPN-so-014.

3.3. Tratamiento de la muestra vegetal

Posterior a la recolección de la muestra en estudio, pasó por un tratamiento de clasificación retirando partes deterioradas e impurezas no pertenecientes a la especie, dejando solo las hojas para su análisis y así enviar al proceso de secado por 72 horas a una temperatura de 34°C, con el propósito de eliminar la mayor parte de agua contenida en las hojas (Figura 14a), para finalmente realizar su trituration (Figura 14b).



Figura 14. Tratamiento de la muestra. a. Secado b. Trituración de la muestra.
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.4. Obtención de extractos

Para obtener los extractos totales se realizó una extracción empleando un total de 500 g de materia vegetal seca y triturada. Para ello se realizó una maceración estática por 48 horas a temperatura ambiente, con una mezcla de disolventes MeOH - H₂O en proporción 8:2 (v/v) respectivamente, y una relación 1:10 planta: solvente (Figura 15a). Posteriormente se procedió a filtrar al vacío (Figura 15b), y se concentró por medio de un rota-evaporador a presión reducida, a una temperatura de 35°C hasta la total eliminación del disolvente (Figura 15c), obteniendo como producto final 10,72 g el extracto total seco.



Figura 15. Obtención de extractos. **a.** Maceración **b.** Filtración **c.** Rotaevaporación.
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.5. Análisis de extracto

Luego de la obtención del extracto total se procedió a realizar su análisis mediante CCF, utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Fase directa) y RP-18 F₂₅₄ (Fase inversa), usando como fase móvil disolventes con diferente polaridad. Se observó que el extracto presentaba una mayor riqueza y separación de los compuestos en fase inversa (Figura 16).

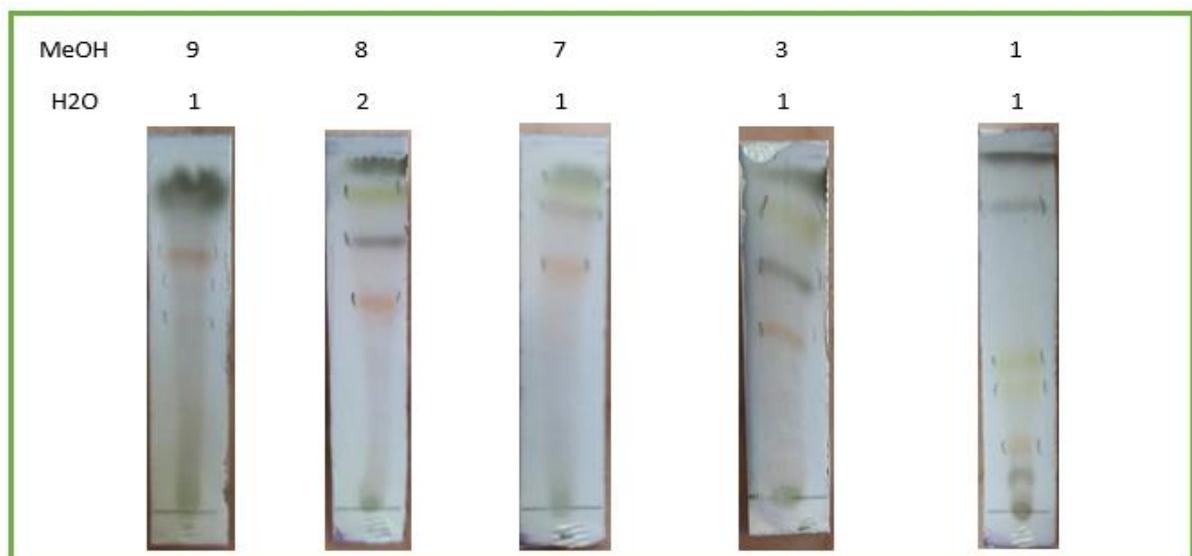


Figura 16. Análisis de extracto total.
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.6. Desclorofilación

Se pesó 5 g del extracto total obtenido en MeOH - H₂O con la finalidad de eliminar las clorofilas mediante un previo análisis en CCF para determinar la polaridad de los disolventes (Figura 17) y desclorofilar mediante la utilización de sílica gel fase inversa RP-18 F₂₅₄, con una relación 30:1(gramos de sílica – gramos de muestra) a través de una columna de vidrio, utilizando como eluyente una mezcla de MeOH - H₂O en proporción 1:1, en un sistema isocrático, obteniéndose 2,37 g de extracto desclorofilado.



Figura 17. Análisis en CCF. Para el proceso de desclorofilación.
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.7. Fraccionamiento líquido – líquido

Se usó este método con el objetivo de separar compuestos de una mezcla líquida, los compuestos van a separarse por su afinidad de solubilidad en uno de los dos disolventes inmiscibles utilizados, todo esto con la finalidad de que los compuestos de la mezcla se distribuyan por diferencia de polaridad entre las dos fases líquidas.

El extracto desclorofilado se solubilizó en 200 ml de la mezcla de MeOH - H₂O en proporción 9:1. El extracto solubilizado se transfirió a un embudo de decantación y se le añadieron 200 ml de DCM, se tapa el embudo y se coloca en posición horizontal para mezclar las dos fases con movimientos circulares. Como el diclorometano muestra una densidad más alta en comparación de la mezcla de metanol - agua, pasa a través de la fase polar en un contacto íntimo eluyendo sustancias de polaridad media.

El procedimiento fue realizado por triplicado con la parte acuosa y el disolvente seleccionado, con el objetivo de optimizar la separación de compuestos (Figura 18).

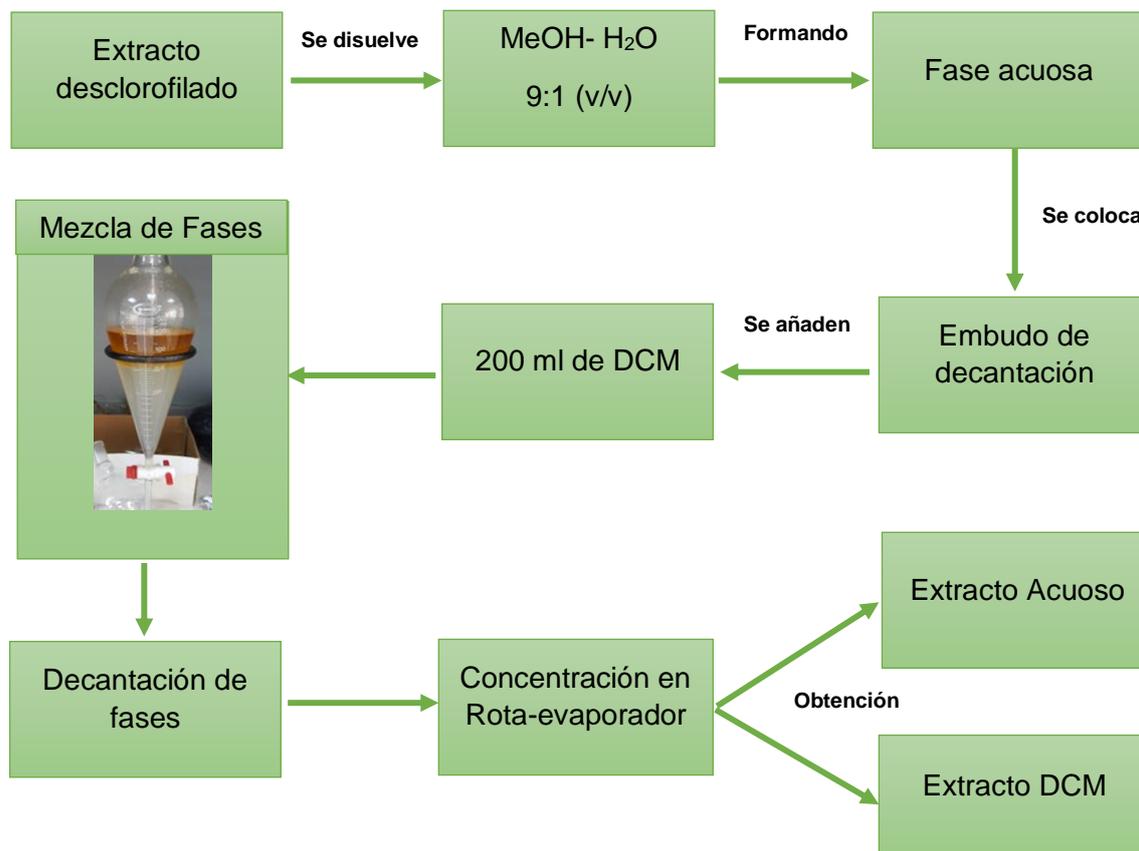


Figura 18. Extracción líquido - líquido.
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.8. Fraccionamiento en columna

El fraccionamiento en columna partió del extracto acuoso y del extracto de DCM producto del fraccionamiento líquido – líquido, por lo que se realizaron de manera inicial dos columnas, haciendo un previo análisis en cromatografía en capa fina (CCF) de cada extracto para fijar las condiciones de elución de cada columna y precisar el aislamiento de compuestos.

3.8.1. Fraccionamiento en columna del extracto DCM.

Se sembró 0.92 g del extracto producto de la extracción, para su fraccionamiento en columna en 100 g de sílica gel (Merk 0.0015-00) fase directa, con una relación de 1:100 (extracto – sílica). Los eluyentes utilizados fueron Hex - AcOEt en proporción 4:6, esta se la realizó en un sistema isocrático (Figura 19).

Producto del fraccionamiento se obtuvieron 80 fracciones, las mismas que fueron analizadas mediante CCF para determinar el perfil cromatográfico del compuesto.



Figura 19. Fraccionamiento en columna del extracto de DCM
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.8.2. Fraccionamiento en columna del extracto acuoso.

Se sembró 1,15 g de extracto acuoso, utilizando 100 g de silica gel fase inversa RP-18, con una relación de 1:100 (extracto-silica). Utilizando como eluyentes MeOH - H₂O en proporción 4:6 mediante un sistema isocrático (Figura 20). Se obtuvieron 120 fracciones a las cuales se le realizó el análisis cromatográfico.

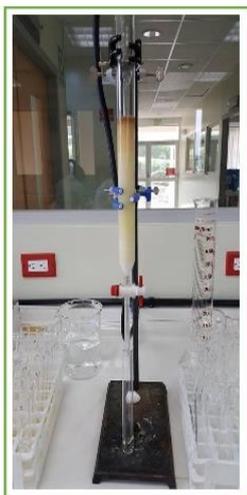


Figura 20. Fraccionamiento en columna del extracto acuoso
Elaborado por: (Autor, 2017)

3.9. Cromatografía en capa fina y unión de fracciones

Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC), para lo cual se utilizó placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase directa) y RP-18 F₂₅₄ (fase inversa).

Para el análisis de fracciones de la columna realizada en sílica gel fase directa se utilizó Hex - AcOEt en proporción 4:6 (v/v) como fase móvil, de la misma forma para el análisis de fracciones de la columna realizada en sílica gel fase inversa se utilizó MeOH - H₂O en proporción 1:1 (v/v) , con lo que permitió separar e identificar el compuesto a través de su visualización en la luz ultravioleta de 254nm - 365nm y mediante el revelado con ácido sulfúrico al 5% y vainillina, para luego someterlo al calor visualizando su reacción de coloración producto del compuesto en análisis. De esta manera se logró relacionar su R_f y la similitud visual de las manchas características que cada fracción poseía, por lo que se procedió a realizar la respectiva unión de los mismos.

3.10. Purificación cromatográfica

La purificación cromatográfica se realizó mediante un previo análisis en CCF de la fracción F5 para determinar el perfil cromatográfico, obteniendo una polaridad adecuada de los disolventes y proceder a realizar su purificación mediante microcolumna.

3.10.1. Purificación de la fracción F5 obtenida del extracto acuoso.

Producto del fraccionamiento en columna del extracto acuoso se obtuvo la fracción F5 con un peso de 25,7 mg, para el proceso de purificación se utilizó sílica gel fase inversa RP-18 F₂₅₄, con una relación 1:200 (muestra – sílica). Se eluyó con disolventes MeOH – H₂O en proporción 4:6 (v/v) mediante un sistema isocrático, de la misma se obtuvieron 50 fracciones a las cuales se las analizó mediante CCF para unir de acuerdo a la similitud del perfil cromatográfico, obteniendo 5mg de compuesto caracterizado como FL-3, para próximos análisis de identificación.

3.11. Identificación de los compuestos aislados

3.11.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de NMR fueron realizados en un equipo de resonancia magnética nuclear Varian Agilent – Premium Shielded con modelo de magneto MR Y 0021953, estos espectros fueron elaborados a 400 MHz para ^1H . Se usó disolventes como metanol deuterado y cloroformo deuterado, para finalmente obtener los desplazamientos químicos que se presentan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en hertz.

3.11.2. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

Se utilizó con la finalidad de obtener el peso molecular del compuesto aislado, presente en la fracción FC-4 obtenida como producto del fraccionamiento en columna del extracto de DCM, la muestra fue diluida en diclorometano al 99.9% y se inyectó 1 μL en el cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, el mismo que está dotado con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con un inyector automático Split/Splitless serie 7683.

La característica que presenta la columna capilar utilizada se encuentran en la (Tabla. 2) , y los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras para su posterior análisis se encuentran especificados en la (Figura 21).

Tabla 2. Característica de la columna capilar CG-EM utilizada.

Fracción	Columna	Temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$)	Grosor de la fase fija (μm)	Diámetro interno (mm)	Logitud (m)
FC-4	DB-5MS	350	0.25	0.25	30

Elaborado por: (Autor, 2017)

El equipo trabajo bajo los siguientes parametros operacionales (Figura 21).

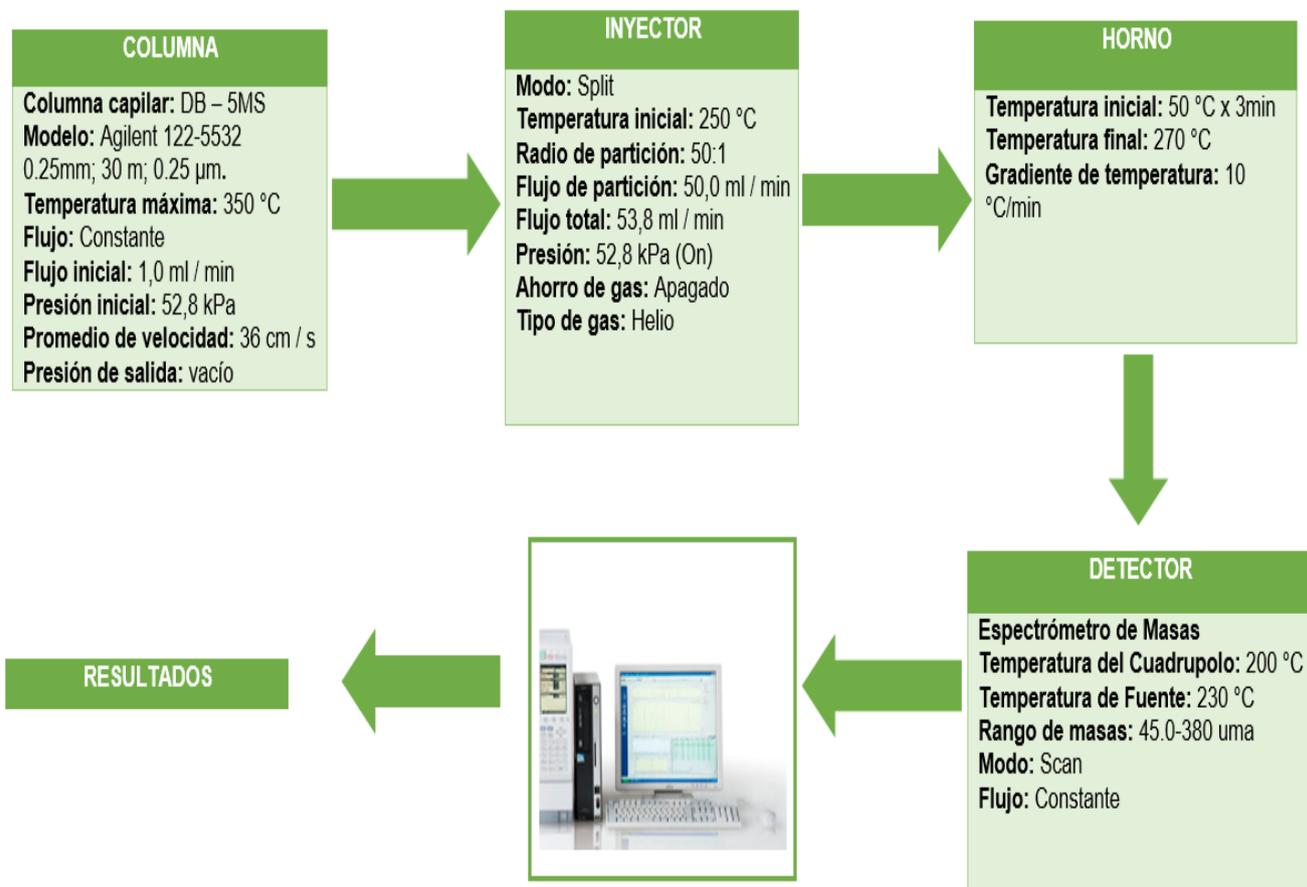


Figura 21. Condiciones de operación del CG-EM.
Elaborado por: (Autor, 2017)

CAPÍTULO IV
ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Extractos de la especie *Solanum oblongifolium* Dunal

En la tabla 3 se encuentra detallado el peso y rendimiento del extracto total obtenido a partir de 500 g de hojas secas trituradas y del extracto desclorofilado. Así como también se detalla el peso y rendimiento del extracto de diclorometano y extracto acuoso, resultante del fraccionamiento líquido – líquido realizado al extracto desclorofilado.

Tabla 3. Rendimiento de los extractos obtenidos.

EXTRACTO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	RENDIMIENTO %
Extracto Total (MeOH - H ₂ O)	500.00	10.72	2.14
Extracto desclorofilado	5.00	2.37	47.40
PARTICION DE EXTRACTO DESCLOROFILADO			
Extracto DCM	2.37	0.92	38.81
Extracto Acuoso	2.37	1.15	48.52

Elaborado por: (Autor, 2017)

4.2. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna (CC)

4.2.1. Escopoletina aislado del extracto de DCM.

Resultado de la cromatografía en columna se obtuvieron un total de 80 fracciones, que fueron unidas para obtener un producto final de 6 fracciones rotuladas como FC-1 hasta FC-6 en orden de obtención, a las cuales se les realizó un análisis en CCF, para determinar la presencia del compuesto. Obteniendo como resultado un compuesto puro resultante de la fracción caracterizada como FC-4.

Las fracciones obtenidas como producto del fraccionamiento en columna del extracto de diclorometano, se encuentran detalladas en la (Tabla. 4).

Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto de diclorometano

MUESTRA	FRACCIÓN	PESO (mg)	PROPORCIÓN %	MEZCLA DE DISOLVENTES
1-13	FC-1	117.3	40-60	Hex - AcOEt
14-18	FC-2	16.5	40-60	Hex - AcOEt
19-33	FC-3	242.6	40-60	Hex - AcOEt
34-39	FC-4	4.0	40-60	Hex - AcOEt
40-53	FC-5	192.4	40-60	Hex - AcOEt
54-80	FC-6	312.7	100	AcOEt

Elaborado por: (Autor, 2017)

La fracción de la cual se obtuvo el compuesto se encuentra especificada en la (Figura 22).

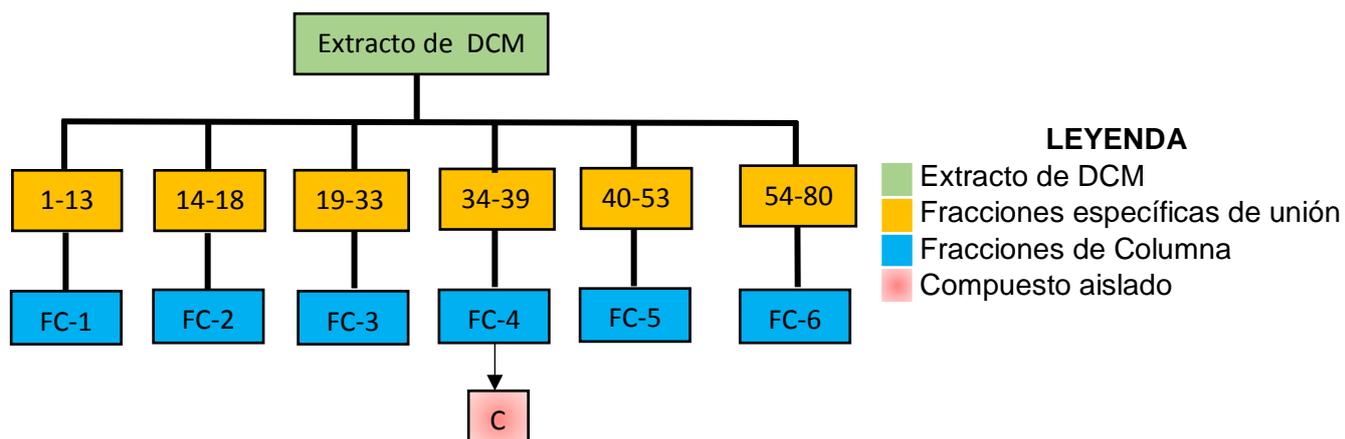


Figura 22. Especificación de obtención del compuesto FC-4.
Elaborado por: (Autor, 2017)

4.2.2. Isoquercitrina aislado del extracto acuoso.

Resultado de la cromatografía en columna se obtuvieron un total de 120 fracciones, que fueron unidas para obtener un producto final de 10 fracciones rotuladas como F1 hasta F10 en orden de obtención, a las cuales se les realizó un análisis en CCF, para determinar la presencia del compuesto.

Las fracciones obtenidas como producto del fraccionamiento del extracto acuoso, se encuentran detalladas en la (Tabla. 5)

Tabla 5. Fracciones obtenidas del extracto acuoso

MUESTRA	FRACCIÓN	PESO (mg)	PROPORCIÓN %	MEZCLA DE DISOLVENTES
1-8	F1	96.7	40 - 60	MeOH - H ₂ O
9-14	F2	78.1	40 - 60	MeOH - H ₂ O
15-21	F3	42.5	40 - 60	MeOH - H ₂ O
22-28	F4	34.8	40 - 60	MeOH - H ₂ O
29-45	F5	25.7	40 - 60	MeOH - H ₂ O
46-60	F6	124.8	40 - 60	MeOH - H ₂ O
61-78	F7	116.2	40 - 60	MeOH - H ₂ O
79- 95	F8	102.0	40 - 60	MeOH - H ₂ O
96-109	F9	164.1	40 - 60	MeOH - H ₂ O
110-120	F10	206.7	100	MeOH

Elaborado por: (Autor, 2017)

La localización del compuesto se lo presencia en la fracción F5, la cual es sometida a un proceso de purificación teniendo como resultado un total de 50 fracciones, que se procedieron a unir resultando un producto final de 6 fracciones, rotuladas como FL-1 hasta FL-6, a las mismas se les realizó un análisis en CCF, obteniendo un compuesto puro resultante de la fracción caracterizada como FL-3.

Las fracciones obtenidas como producto de la purificación de la fracción F5 se detallan en la (Tabla 6)

Tabla 6. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción F5

MUESTRA	FRACCIÓN	PESO (mg)	PROPORCIÓN %	MEZCLA DE DISOLVENTES
1-10	FL-1	5.7	40 - 60	MeOH - H ₂ O
11-17	FL-2	2.1	40 - 60	MeOH - H ₂ O
18-25	FL-3	5.0	40 - 60	MeOH - H ₂ O
26-35	FL-4	3.6	40 - 60	MeOH - H ₂ O
36-42	FL-5	2.9	40 - 60	MeOH - H ₂ O
43-50	FL-6	4.2	100	MeOH

Elaborado por: (Autor, 2017)

La fracción de la cual se obtuvo el compuesto se encuentra especificada en la (Figura 23)

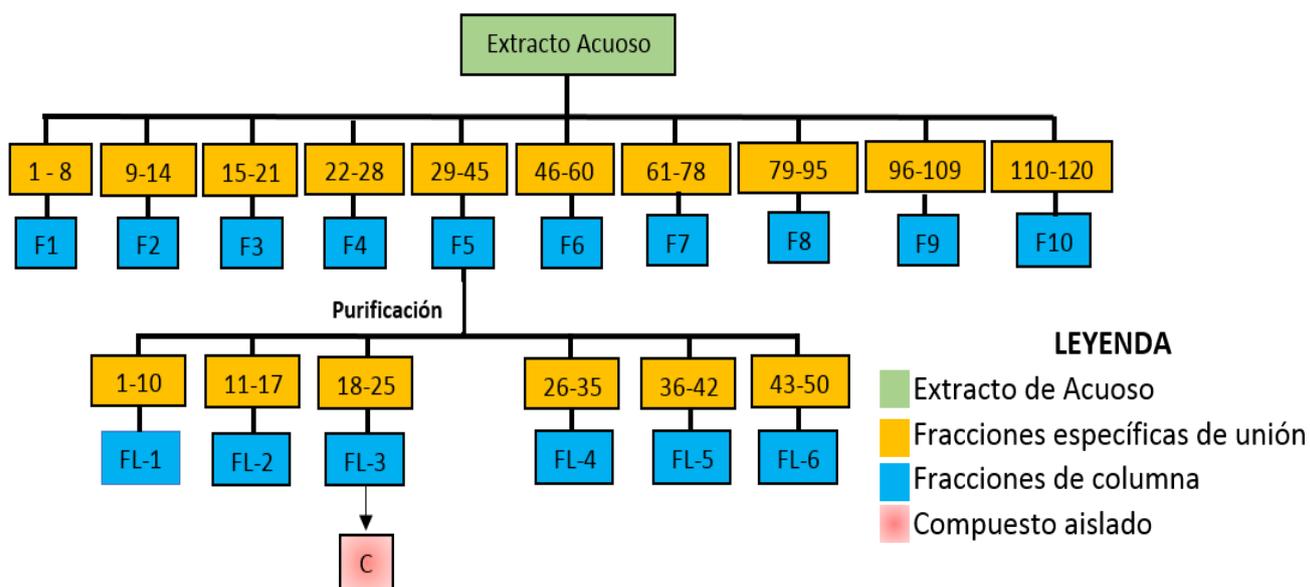


Figura 23. Especificación de obtención del compuesto FL-3

Elaborado por: (Autor, 2017)

Dunal.

4.3.1. Identificación de compuesto 1 (FC-4) escopoletina.

Producto del fraccionamiento del extracto de diclorometano obtenido de la partición liquido – liquido, se obtuvo un compuesto puro caracterizado por el investigador como FC-4, que eluyo en una polaridad 4:6 Hex – AcOEt. El espectro de ¹H-NMR que se consiguió de la resonancia magnética nuclear, puede ser observado en el anexo 1.

El compuesto aislado fue analizado mediante resultado espectroscópico de $^1\text{H-NMR}$ y comparado con literatura, se logró establecer su estructura molecular determinando que se trata de un metabolito secundario conocido como escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) (Khan & Hossain, 2015). Su estructura química se puede observar en la (Figura 25).

Los datos obtenidos como resultado de la identificación y descripción del compuesto se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Descripción del compuesto identificado

Nombre	Escopoletina
Formula molecular	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$
Peso molecular	192 g/mol
Aspecto físico	Polvo amorfo blanquecino
Peso	4mg
Rf	(Fase directa: Hex/AcOEt 4:6): 0.51

Fuente: (Khan & Hossain, 2015)

Elaborado por:(Autor, 2017)

4.3.2. Datos del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de la escopoletina.

$^1\text{H-NMR}$ se realizó en cloroformo deuterado obteniendo los siguientes resultados: (400MHz, CDCl_3 , δ ; ppm J/Hz): 3.95 (3H, s, OCH₃-6), 6.27 (1H, d, J=10 Hz, H-3), 6.84 (1H, s, H-8), 6.92 (1H, s, H-5), 7.59 (1H, d, J=8 Hz, H-4). (Anexo 1)

Los resultados obtenidos de $^1\text{H-NMR}$ se compararon con reportados (Khan & Hossain, 2015) ver tabla 8.

Tabla 8. Comparación del espectro $^1\text{H-NMR}$ de escopoletina aislado en *Ipomoea digitata*

Escopoletina extracto <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal	Escopoletina extracto <i>Ipomoea digitata</i> (Khan & Hossain, 2015)
3.95 (3H, s, OCH ₃ -6)	3.88 (3H, s, OCH ₃ -6)
6.27 (1H, d, J=10 Hz, H-3)	6.20 (1H, d, J=9.2 Hz, H-3)
6.84 (1H, s, H-8)	6.80 (1H, s, H-8)
6.92 (1H, s, H-5)	6.90 (1H, s, H-5)
7.59 (1H, d, J=8 Hz, H-4).	7.60 (1H, d, J=9.2 Hz, H-4).

Fuente: (Khan & Hossain, 2015)

Elaborado por: (Autor, 2017)

El $^1\text{H-NMR}$ muestra la presencia de dos dobletes en δ 6.27 ppm y δ 7.59 ppm característicos de los protones H-3 y H4 respectivamente del anillo de pirona de la cumarina. Además, dos protones aromáticos singuletes a δ 6.84 ppm y 6.92 ppm atribuidos a los protones H-5 y H-8 respectivamente, y un grupo metoxilo en singulete a δ 3.95 ppm.

4.3.3. Determinación del peso molecular del compuesto aislado.

EI-MS m/z (%): 192 (M, 100), 177(59), 149 (50), 164 (27), 69 (26), 121 (20), 79 (15), 51 (13), 92 (4), 105 (3), 135 (2), 60(1) (Anexo 2)

La veracidad del compuesto aislado se determinó en base a la comparación del espectro obtenido del compuesto, confrontado con el espectro presente en la base de datos Wiley 7n.l, que es una base de datos incorporada en el equipo MSD Agilent (Anexo 3).

Los resultados obtenidos también se compararon con los reportados en (Garibello, 2010), un estudio de hojas de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) ver Figura 24.

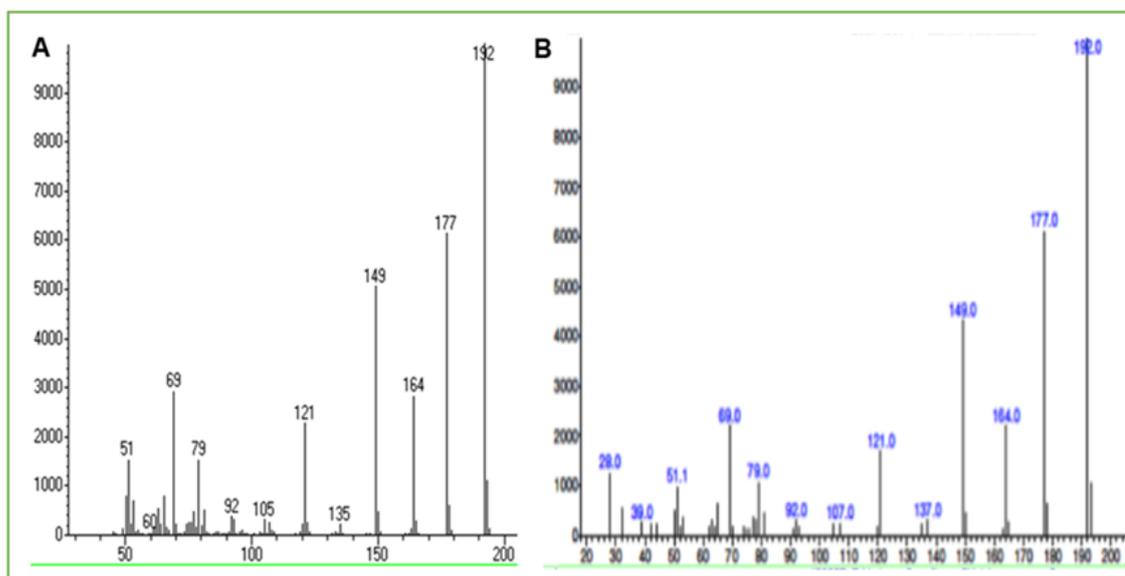


Figura 24. Espectro de masas **a.** Escopoletina identificada en fracción FC-4 **b.** Escopoletina aislado de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth)

Fuente: (Garibello, 2010)

Elaborado por: (Autor, 2017)

EL espectro obtenido del estudio de hojas de *Solanum oblongifolium* Dunal indica que se trata del 7-Hidroxi-6-metoxicumarina caracterizado por el ion molecular $[\text{M}+\bullet]$ m/z 192 (100%), m/z 177(60%) de mediana intensidad, característico de este compuesto, m/z 164 (27%) de baja intensidad, m/z 149 (50%) y el resto de picos de baja intensidad. Realizando el análisis comparativo del espectro obtenido de la muestra en investigación con el espectro obtenido en (Garibello, 2010), se puede determinar que existe una gran similitud con relación a los patrones de fragmentación de los iones moleculares (Anexo 4).

Comparando con la bibliografía determinamos que los datos espectrales resultantes de la investigación coinciden con los que se observan en (Khan & Hossain, 2015) y (Garibello, 2010). Las posiciones correspondientes a las señales de ^1H y los datos del espectro obtenido, nos indican que la estructura del compuesto y su peso molecular coincide con la que se encuentra propuesta en bibliografía, determinado así la identificación del compuesto como escopoletina. A continuación se observa la estructura química de escopoletina (Figura 25)

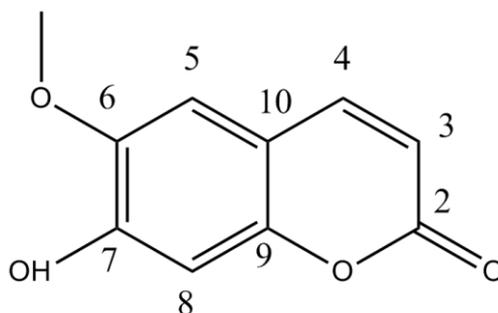


Figura 25. Estructura química de escopoletina
Fuente: (Khan & Hossain, 2015)
Elaborado por: (Autor, 2017)

En la Figura 26. Se muestra la CCF del compuesto aislado e identificado como escopoletina, la misma que se presenta como una mancha fluorescente azul con un (R_f) de 0,51.



Figura 26. CCF de FC-4 en Hex - AcOEt 4:6. Observado bajo la luz UV.
Elaborado por: (Autor, 2017)

La escopoletina se caracteriza por ser una cumarina fenólica, miembro importante del grupo de fitoalexinas, que se produce en diversas plantas que se han utilizado como medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades reumatóides. Se conoce una variedad de actividades biológicas como anti-inflamatorio, antialérgico y anti-angiogénesis, a menudo parece ser el producto más importante ya que este compuesto ha mostrado una fuerte actividad citotóxica frente a la línea celular de glándula mamaria, de adenocarcinoma humano (Garibello, 2010).

4.3.4. Identificación de compuesto 2 (FL-3) isoquercitrina.

Resultado del fraccionamiento del extracto acuoso, se logró obtener un compuesto puro caracterizado por el investigador como FL-3, que eluyo en una polaridad 4:6 MeOH - H₂O. El espectro de ¹H-NMR que se consiguió de la resonancia magnética nuclear, puede ser observado en el (Anexo 5).

El compuesto aislado fue analizado mediante resultado espectroscópico de ¹H-NMR y comparado con literatura, se logró establecer su estructura molecular e identificación determinando que se trata de un compuesto denominado como isoquercitrina (Estork et al., 2014).

Los datos obtenidos como resultado de la identificación y descripción del compuesto se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Descripción del compuesto identificado

Nombre	Isoquercitrina
Formula molecular	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Peso molecular	464 g/mol
Aspecto físico	Polvo amorfo amarillo
Peso	5mg
Rf	(Fase inversa: MeOH/H ₂ O 4:6):0.33

Fuente: (Estork et al., 2014)

Elaborado por: (Autor, 2017)

4.3.5. Datos del espectro de ¹H-NMR de la isoquercitrina.

¹H-NMR se realizó en metanol deuterado obteniendo los siguientes resultados: (400MHz, CD₃OD, δ; ppm J/Hz): 7.74 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 7.56 (1H, dd, J = 8.4 Hz, 2.0 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.26 (1H, d, J = 7.60 Hz, H-1").(Anexo 4)

Los resultados obtenidos de ¹H-NMR se compararon con reportados en (Estork et al., 2014) (ver Tabla 10).

Tabla 10. Comparación del espectro $^1\text{H-NMR}$ de isoquercitrina aislado en *Laetia suaveolens*.

Isoquercitrina extracto <i>Solanum oblongifolium</i> Dunal	Isoquercitrina extracto <i>Laetia suaveolens</i> (Estork et al., 2014)
7.74 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2')	7.71 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2')
7.56 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, 2.0 Hz, H-6')	7.59 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, 2.2 Hz, H-6')
6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5')	6.87 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5')
6.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8)	6.41 (1H, d, $J = 2.19$ Hz, H-8)
6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)	6.22 (1H, d, $J = 1.98$ Hz, H-6)
5.26 (1H, d, $J = 7.60$ Hz, H-1'')	5.26 (1H, d, $J = 7.76$ Hz, H-1'')

Fuente: (Estork et al., 2014)

Elaborado por: (Autor, 2017)

El $^1\text{H-NMR}$ muestra la presencia de una señal δ 7.56 ppm y δ 6.88 ppm correspondiente a los protones H-6' - H-5' pertenecientes a un acoplamiento orto presente en el anillo B. Las señales δ 7.56 ppm y δ 7.74 ppm correspondientes a los protones H-6' - H-2' que presentan un acoplamiento meta. La región aromática presenta señales δ 6.20 ppm y δ 6.39 ppm correspondientes a los protones H-6 - H-8 de un acoplamiento meta. Además de la presencia de una señal a δ 5.26 (d, $J = 7.60$ Hz, H-1'') seguida de otras señales adicionales que indican la presencia de un resto de azúcar en el carbono 3.

El análisis comparativo de los datos del espectro de la muestra en identificación y los datos del espectro de la bibliografía, muestran las posiciones correspondientes a las señales de ^1H las cuales nos indican la estructura del compuesto y que son similares con los que se observan en (Estork et al., 2014), determinado así la identificación del compuesto como isoquercitrina. A continuación se observa la estructura química de isoquercitrina (Figura 27.)

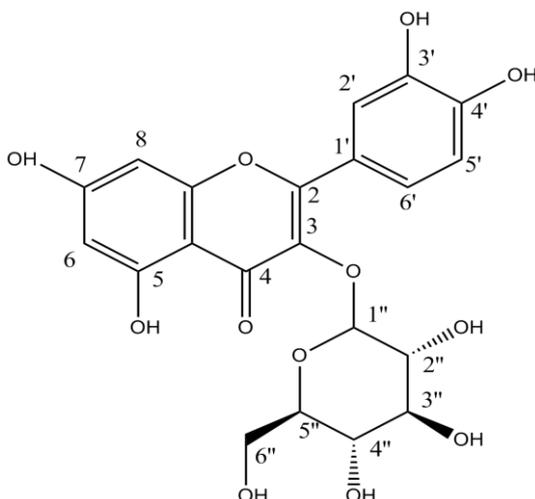


Figura 27. Estructura química de isoquercitrina

Fuente: (Estork et al., 2014)

Elaborado por: (Autor, 2017)

En la Figura 28. Se muestra la CCF del compuesto aislado e identificado como isoquercitrina, la cual se visualiza de un color fluorescente verde con un (R_f) de 0.33.



Figura 28. CCF de FL-3 en MeOH - H₂O 4:6. Observado bajo la luz UV.
Elaborado por: (Autor, 2017)

La isoquercitrina es un flavonoide glicosilado que se encuentra comúnmente en hierbas medicinales, frutas y verduras. Caracterizado por presentar una serie de efectos quimioprotectores contra el cáncer, trastornos cardiovasculares, la diabetes y reacciones alérgicas. También ha demostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria inclusive actividad contra el protozooario *Entoméia hystolitica* (Dos Santos, Oliveira, & Silva, 2014).

CONCLUSIONES

- La investigación realizada a partir de las partes aéreas de la especie vegetal *Solanum oblogifolium* Dunal, mediante la aplicación de técnicas cromatográficas y técnicas espectrales de $^1\text{H-NMR}$ y CG-EM se aislaron e identificaron dos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, confirmados a través de un análisis comparativo bibliográfico.
- Del extracto total de MeOH - H₂O, se obtuvo los extractos de diclorometano y extracto acuoso producto de la partición líquido – líquido, resultando el extracto acuoso con mayor rendimiento presentando un 48.52% con relación al extracto de diclorometano que posee un 38.81%.
- Del fraccionamiento en columna del extracto de diclorometano se aisló un compuesto, que mediante técnicas espectrales $^1\text{H-NMR}$ y CG-EM se identificó como una cumarina denominada escopoletina. Y del fraccionamiento del extracto acuoso se identificó un flavonoide denominado como isoquercitrina.
- Los compuestos aislados corroboran los conocimientos tradicionales de la planta dentro de las comunidades, ya que una de sus actividades biológicas es la actividad antiinflamatoria, la cual coincide con el uso etnobotánico y con estudios científicos reportados en literatura.

RECOMENDACIONES

- La especie *Solanum oblongifolium* Dunal, es una especie que según detalles bibliográficos no tiene una investigación a profundidad sobre la variedad de compuestos que posee, por lo que se puede continuar con el estudio fitoquímico de la especie vegetal.
- Se recomienda hacer maceración en diferentes disolventes como hexano y acetato de etilo, ya que la investigación se realizó con el extracto de MeOH - H₂O y extracto de diclorometano. Cabe destacar que es una planta que posee una gran variedad de compuestos que pueden considerarse en análisis para el avance farmacológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, F. C. (2005). *Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (Nicotiana tabacum)*. *Biotecnología e Ingeniería Genética*. Instituto Politecnico Nacional.
- Andrade, J. M., Armijos, C. P., Malagón, O. G., & Lucero, H. (2009). *Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas, Provincia de Loja - Ecuador*: Ediciones UTPL. Loja- Ecuador. 64p.
- Ansaloni, R., Wilches, I., Orellana, A., Tobar, V., Witte, P. De, & Leuven, U. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal, 23, 89–97.
- Aristizábal, I. D. (2007). La Resonancia Magnetica y sus Aplicaciones en la Agroindustria. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 60, 31.
- Ávalos, A., & Garcia, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas, 2(3), 119–145.
- Barquero, A. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. Andrea A. Barquero*. *Departamento de Química Biológica*, 53–69.
- Carmona, J., Gil, R., & Rodriguez, M. (2008). Descripción taxonómica , morfológica y etnobotánica de 26 hierbas comunes que crecen en la ciudad de Mérida – Venezuela * 1. *Universidad de Los Andes Venezuela*, 113–129.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides : características químicas y aplicaciones. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 22, 11.
- Chalán, L. V., & Guamán, M. (2015). *Embarazo , parto y postparto de las parteras tradicionales en las comunidades indígenas del Ecuador* *Facultad de Ciencias Medicas*. Universidad de Cuenca.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. (M. De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, Ed.). Quito
- Dos Santos, P., Oliveira, P., & Silva, E. (2014). Perfil de flavonoides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de bauhinia purpurea (fabaceae) da região amazônica. *Universidade Federal Do Amazonas*, 37(1), 89–94.
- Escamilla, I. C., Cuevas, E. Y., & Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Facultad de Ciencias UNAM*, 52(2), 73–75.
- Estork, D. M., Gusmão, D. F., Díaz, I. E. C., Varella, A. D., Younes, R. N., Reis, L. F. L., ... Suffredini, I. B. (2014). First Chemical Evaluation and Toxicity of Casinga-cheirosa to Balb-c Male Mice. *Research Center on Biodiversity*, (1), 3973–3987. <https://doi.org/10.3390/molecules19043973>
- Gándara, O. (1995). La etapa de contacto líquido-líquido operando en corriente cruzada. *Centro de Investigaciones Científicas*, 2, 5.
- Garcia, P. A. (2013). *Tipos de contacto en la extraccion líquido-líquido*. *Universidad Veracruzana*.

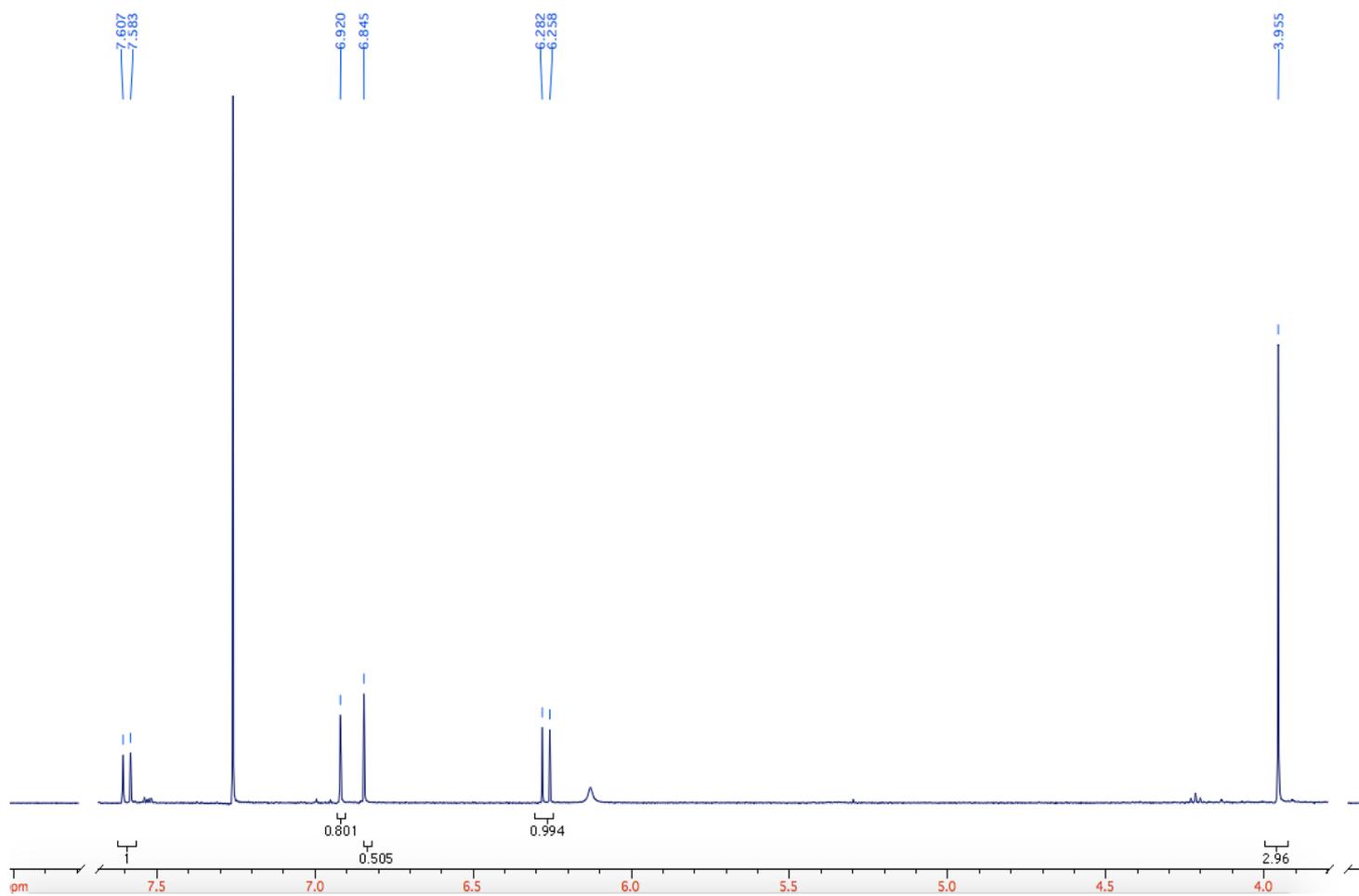
- Garibello, C. F. (2010). *Estudio de hojas de pentacalia vaccinioides (kunth) como nueva fuente natural de sustancias esteroideas y cumarinas*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Gomez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco Mexico. *Medicinal Plants in a small village in the state of Tabaco Mexico.*, 35(1), 43–49.
- Gonzalez, J., Martinez, S., & Tuñón, J. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes, 271–278.
- Gutiérrez, M. C. (2002). Identificación de compuestos volátiles. *Laboratorio de Control de La Contaminación Ambiental . Cataluña*, 35–41.
- Herrera, C., & Vidal, D. (2015). *Manual de prácticas de fitoquímica y farmacognosia. Escuela de Bioquímica y Farmacia*.
- Huerta, S. (2008). Extracción líquido-líquido para la recuperación de biomoléculas Definición de extracción. *Departamento de Biotecnología*, 58.
- Khan, N. M. M. U., & Hossain, S. (2015). Scopoletin and β -sitosterol glucoside from roots of Ipomoea digitata, 4(2), 5–7.
- Linares, N. (2013). Plantas medicinales. *upa madrid*, 67.
- Lopez Luengo, T. (2017). Propiedades de los Flavonoides. *Tecnología Farmaceutica*, 21, 6.
- Martinez, E. A. (1997). *Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios secundarios de Bougainvillea glabra*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Matos, M. J. C. P. C. de. (2013). *Cumarinas : Versatilidad estructural y aplicaciones en Química Farmacéutica*.
- Morales, G. T., Edith, B., & Pérez, E. (2015). *Plantas medicinales* (Primera Ed). Mexico.
- Mutis, J. C. (2013). Colecciones del Jardín Botánico de Bogotá. *Centro de Investigación Y Desarrollo Científico*, 120.
- Novo, J. V. J., Nieves, M., Díaz, A., & Ruiz, J. A. B. (2010). Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. *Campus Universitario de Rabanales*, 11.
- Olortegui, J., & Brañez, M. (2009). *Evaluación de la actividad citotóxica y antimicrobiana de glicoalcaloides esteroideas de las hojas de Solanum albidum Dunal y Solanum oblongifolium Dunal*.
- Orozco, C. I., & Beltrán, G. D. (2008). Listado de especies espinosas de Solanum L. *Especie Solanum*, 12.
- Pierre, N. (2013). *Manual de Plantas Medicinales del Antiplano de Guatemala* (1ra. Edici). Guatemala.
- Puma, A., Mayorga, E., & Lamas, G. (2013). *Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de Sebastiania longicuspis (Euphorbiaceae)*. Universidad Central del Ecuador.

- Rios, M., Michael, K., Borgtoft, H., & Granda, G. (2007). Plantas utiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas, *Primera Ed*, 652.
- Roldan, A. (2004). *100 Plantas Medicinales Escogidas: Guia de plantas de todo el mundo seleccionadas por su valor terapeutico* (4ta ed.). Madrid.
- Romero, A. S. (2002). Cromatografia de Gases. *Instituto de Biotecnologia UNAM*, 17.
- Salinas, P. (2012). Plantas toxicas comunes en el estado Merida. *Revista de La Facultad de Medicina de La Universidad de Los Andes*, 21, 93–104.
- Schnee, L. (1984). *Plantas comunes de Venezuela* (3^a). Maracay: Universidad Central de Venezuela.
- Serra, S. (2006). *Desarrollo de derivados de 4-hidroxicumarina con diferente actividad farmacológica*.
- Sierra, J. C., Siqueiros, M. E., & Moreno, O. (2015). Riqueza y distribucion de la familia Solanaceae. *Departamento de Biologia*, 93(1), 117. <https://doi.org/10.17129/botsci.63>
- Vides, A., & Alvarez, A. (2013). La medicina tradicional como un modelo de atención integral en salud. 25. Guatemala. Retrieved from [http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-25/7_la medicina tradicional.pdf](http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-25/7_la_medicina_tradicional.pdf)
- Whitaker, S. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Universidad Autonoma Metropolitana*, 11, 1–16.

ANEXOS

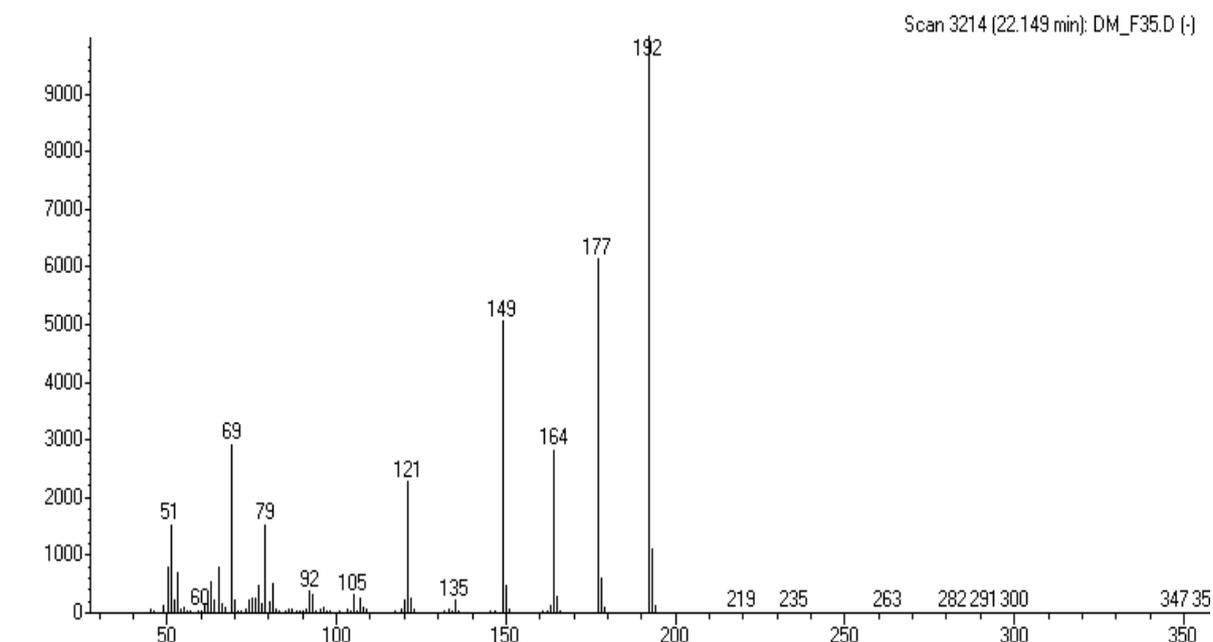
ANEXO 1.

Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de la fracción FC-4 (Escopoletina)



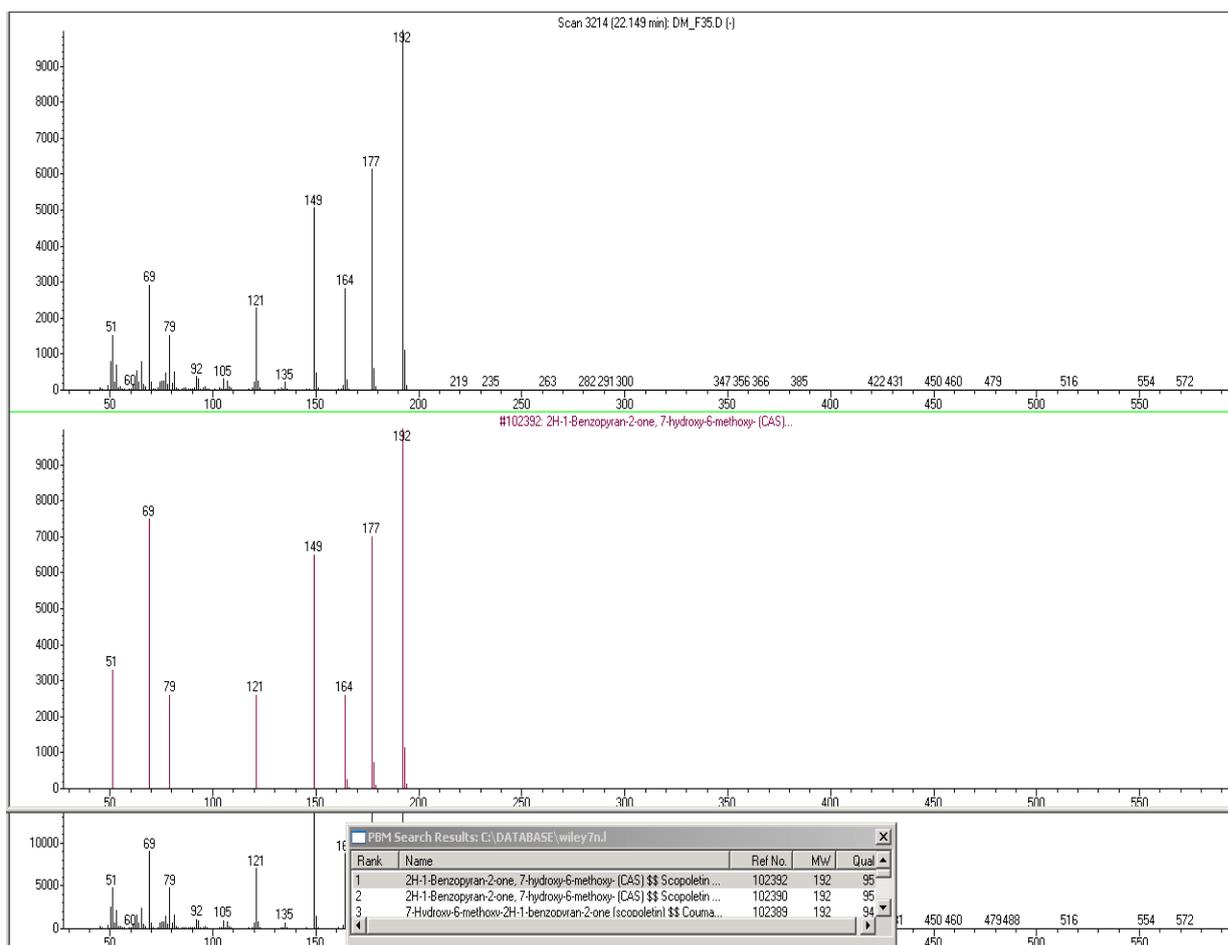
ANEXO 2.

CG-EM de la fracción FC-4 (Escopoletina)



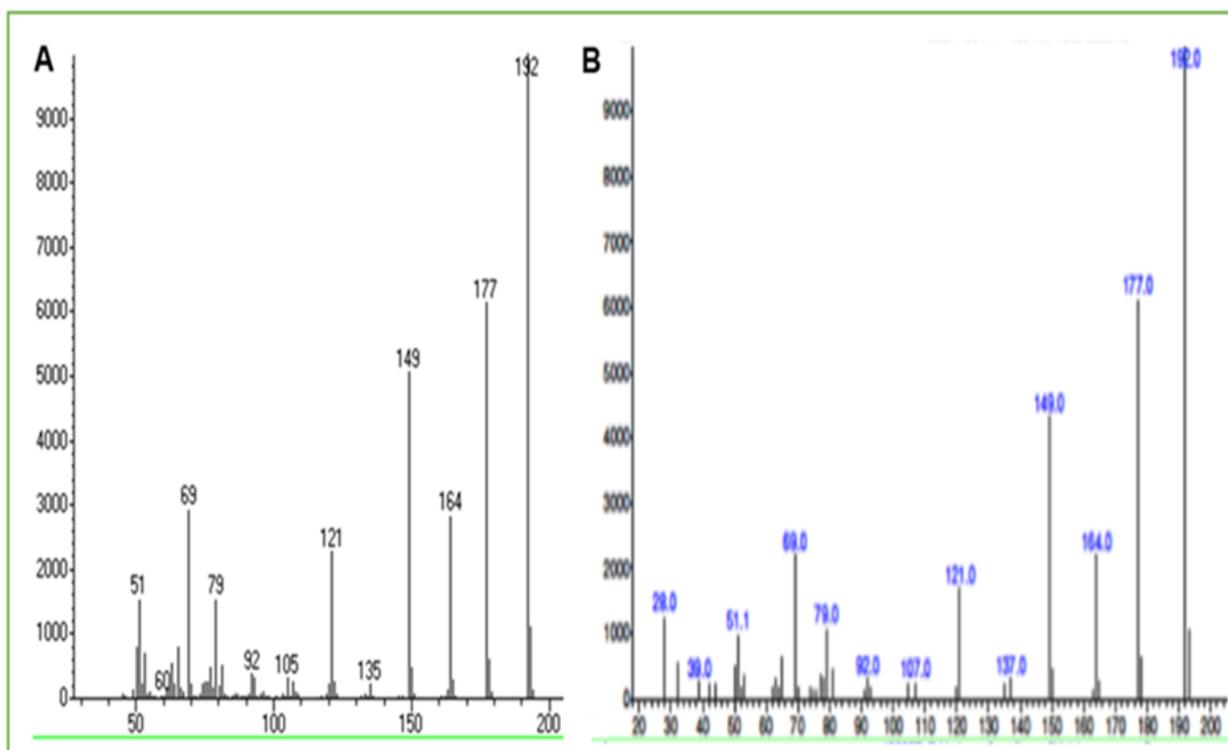
ANEXO 3.

CG-EM de escopoletina en la fracción FC-4 con relación del espectro de escopoletina de la base de datos Wiley 7nl.



ANEXO 4.

CG-EM de escopoletina en la fracción FC-4 con relación del espectro de escopoletina de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth).



ANEXO 5.

Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de la fracción FL-3 (Isoquercitrina)

