

Screening fitoquímico preliminar de *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J.M. Grimes

Miguel Martínez¹, Claudia Pereira², Fidelina González², Bonifacia Benítez F.²

¹ Departamento de Biología, Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

² Departamento de Biología, Herbario FACEN. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

E mail del autor: miguelangelquimi@hotmail.com

Screening fitoquímico preliminar de *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J.M. Grimes.

Para la realización del Screening Fitoquímico preliminar de la especie *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J.M. Grimes, se han tratado los extractos obtenidos que contienen a los metabolitos secundarios, con agentes cromógenos y sustancias que forman precipitados. Para la identificación se han empleado métodos de cromatografía en capa delgada (TLC) y localización de bandas de absorción en el espectro ultravioleta. La detección de alcaloides se realizó mediante una extracción previa con Na₂CO₃ en medio metanólico e identificación posterior por las pruebas de Dragendorff, Mayer, Wagner, Hager y confirmación por TLC. La extracción de flavonoides se realizó a través de metanol en caliente e identificación posterior por las pruebas de Shinoda, Marini-Bettólo, formación de color por disolución en ácido sulfúrico y confirmación por TLC. La identificación de catequinas fue posible al hervir el vegetal en ácido clorhídrico 2N, generando una coloración café-amarillenta, confirmando su presencia. Las saponinas, previa extracción metanólica, se identificaron por cromatografía en capa delgada (TLC), revelando la placa con reactivo vainillina-ácido sulfúrico y posterior calentamiento hasta reacción de color. La presencia de aminoácidos fue confirmada a través de la reacción con ninhidrina con la que forma el complejo denominado púrpura de Ruhemann. Los taninos fueron identificados precipitándolos con solución de gelatina-NaCl, y la presencia de esteroides y metil esteroides por medio de la prueba de Liebermann-Burchard. Las pruebas para la identificación de metabolitos secundarios generaron respuestas suficientemente óptimas, confirmandose la presencia de los mismos en la especie estudiada.

Palabras clave: *C. tenuiflorum* - agentes cromógenos – TLC - metabolitos secundarios

***Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J.M. Grimes, preliminary phytochemical screening.**

To carry out the phytochemical screening of species *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J.M. Grimes, the plants extracts containing secondary metabolites were treated with chromogenic agents and substances that form precipitates. Thin Layer Chromatography (TLC) and detection of certain absorption bands in the ultraviolet were used for identification. To perform alkaloids detection, samples were previously treated with hot methanol and Na₂CO₃, then, identified by Dragendorff, Mayer, Wagner, Hager tests and confirmed by TLC. For flavonoids extraction hot methanol was used and posterior identification by Shinoda, Marini-Bettólo and dissolution in sulphuric acid tests with TLC confirmation. Catechins identification was made by boiling the plant in 2N hydrochloric acid, turning into a brown-yellow colour, which confirmed their presence. Saponins identification were performed by TLC, with hot methanolic pre extraction, and developed by vanillin-sulfuric acid reagent sprinkling and hot plate heating until color reaction. Aminoacids presence was confirmed by a ninhidrydren reaction forming the purple Ruhemann complex. Tanins were identified by a reaction using gelatin-NaCl dissolution and sterols and methyl sterols by Liebermann-Burchard test. All tests for the identification of secondary metabolites generated optimal responses, confirming their presence in the tested species.

Key words: *C. tenuiflorum* - chromogenic agents – TLC - secondary metabolites

INTRODUCCION

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de múltiple uso para el hombre (Domínguez, 1973). Le proporcionan alimentos para la subsistencia, fibras textiles para vestirse y material para construir casas; deleitan por su aroma y colorido; curan o intoxican, según sus propiedades; y regeneran el aire que respira (Domínguez, 1973). Producto natural en términos amplios, lo es cualquier producto aislado de fuentes naturales vivas, ya sean éstas bacterias, hongos, plantas o animales (Marco, 2006). Cualquier organismo viviente contiene en su estructura una gran cantidad de productos químicos, en su mayoría orgánicos (es decir, carbonados) (Marco, 2006). Como estos compuestos químicos son el resultado de la actividad metabólica, es frecuente denominarlos también *metabolitos* (Marco, 2006). Los metabolitos secundarios se dan de manera restringida, generalmente en pequeñas cantidades, en ciertos tipos concretos de organismos y no en otros (Marco, 2006). Como su nombre indica, no son esenciales para la vida como tal, aunque ello no excluye la posibilidad de que puedan ser de gran utilidad para el organismo particular que los produce (Marco, 2006). Los tipos estructurales a los que pertenecen los metabolitos secundarios son, en contraste con los primarios, enormemente variados (Marco, 2006). A diferencia de la mayoría de estos últimos, no son casi nunca de naturaleza polimérica y sus pesos moleculares pocas veces sobrepasan los 1000 Da (Marco, 2006). Pueden definirse muchos tipos de criterios para intentar clasificar los metabolitos secundarios (Marco, 2006). Hasta hace pocas décadas, los criterios importantes solían aludir a

alguna característica estructural (por ejemplo, compuestos fenólicos, esteroides, etc.), a alguna propiedad química (por ejemplo, la basicidad propia de los alcaloides) o a alguna fuente de procedencia común (por ejemplo, glicósidos cardiotónicos del género *Digitalis*) (Marco, 2006). Las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde el punto de vista farmacéutico, porque muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de los medicamentos (Ortiz, 1995). En algunos casos, los medicamentos se preparan a partir de los extractos crudos de las plantas debido a que el principio activo no ha sido aislado, o bien porque el extracto total tiene una actividad en relación con otras sustancias que se encuentran asociadas al principio activo (Ortiz, 1995). Muchos de los constituyentes orgánicos de las plantas que se usan terapéuticamente, también se utilizan para la preparación de bebidas, condimentos para alimentos, colorantes, aromatizantes u odorizantes; por ejemplo, las hojas de té y los granos de café que producen la cafeína (Daniel, 2005), alcaloide de aplicación medicinal, se usan en la dieta alimenticia como bebidas; en el mismo caso está el ginger, que además de su uso farmacéutico se emplea en grandes cantidades en la fabricación de bebidas refrescantes (Ortiz, 1995). En este trabajo el propósito de realizar un screening fitoquímico de la especie *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J.M. Grimes, (tataré), es conocer cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en esta especie, de modo que a posteriori se pudiera profundizar más para conocer cuales metabolito(s) actúa(n) como sustancia(s) tintórea(s), para su aplicación en el ámbito

textil, que es la intención primaria de este trabajo que corresponde a la etapa inicial del trabajo general.

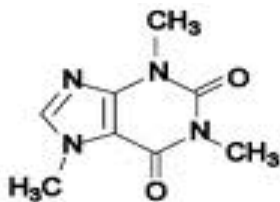


Fig.1. Cafeína, molécula

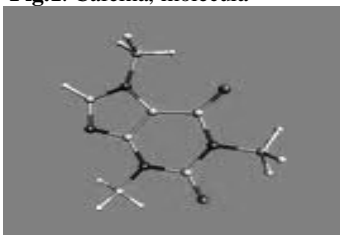


Fig. 2. Cafeína, modelos de Bolas y Varillas

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de obtención de muestras

El sitio de obtención de muestra corresponde a un ecosistema perturbado, zona urbana del Departamento Central, Distrito Capiatá con las siguientes Coordenadas Geográficas: 25° 21' 44" S 57° 29' 02" O.

Descripción de la planta

Es un árbol de 17 m de altura, con ramificación irregular de ramas muy densas. Con 1 o 2 espinas en los nudos. El tallo principal, corto, se presenta curvado y de aspecto tortuoso. La corteza externa es agrietada, de color amarillo, corchosa, gruesa y áspera, con surcos longitudinales muy marcados, se observa un fácil desprendimiento de la corteza más externa en trozos grandes. Al realizarse incisiones en

la corteza adquiere un color amarillento, que se vuelve ocráceo-rojiza después del corte, se observa una savia rojiza;. Hojas compuestas, de disposición alterna, bipinnadas, con 2, 3 y 4 pares de pinnas en cada hoja. Fruto en vaina espiralada, con una longitud de 12 cm, de color verde en su etapa inicial de fructificación y se vuelve negruzco con la madurez. Ver Fig. 3 a, b, c, d.

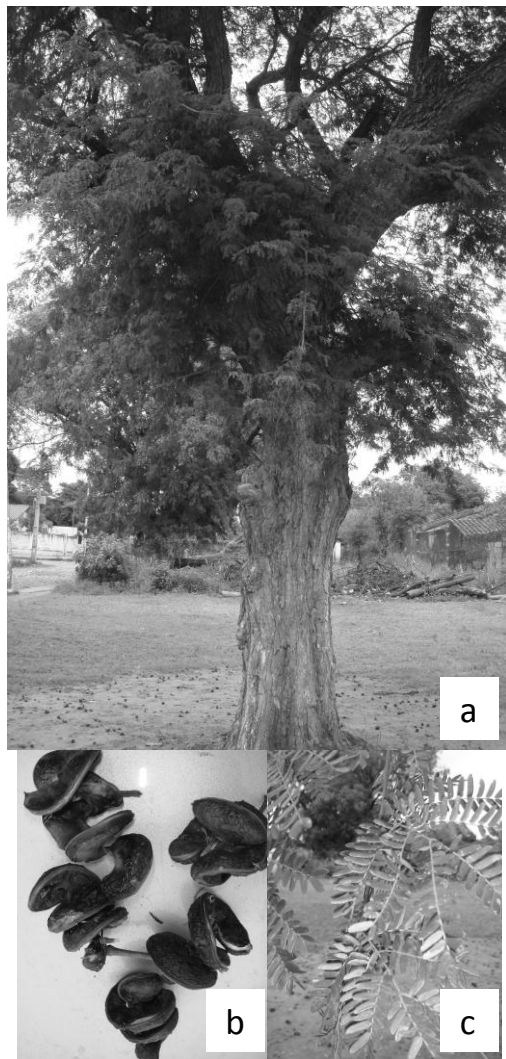




Fig. 3 a. Planta de *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J. W. Grimes - **b.** Fruto - **c.** Hojas - **d.** Corteza. (material testigo, Col.: Benítez, 1230)

Equipos

La observación de las manchas en las placas de TLC se realizó por medio de un revelador con luz UV de 264 y 366 nm de la línea Spectroline Q-22NF de Spectronics Corporation. Espectrofotómetro UV-Visible modelo Shimadzu serie 160A para la realización del barrido espectral en la zona ultravioleta.

Sustancias y preparados químicos

El agua utilizada para la preparación de reactivos fue calidad destilada. Los reactivos para la realización de ensayos cualitativos de los metabolitos secundarios fueron grado pro-análisis de las marcas Merck, Anedra y Cicarelli. Los reactivos utilizados fueron: ácido pícrico, yodo bisublimado, yoduro de potasio, carbonato de sodio, subnitrito de bismuto, cloruro de mercurio (II), magnesio en polvo, pentacloruro de antimonio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, metanol, cloroformo, acetato de etilo, tetracloruro de carbono, hidróxido de amonio, tolueno y etanol. Las placas de

TLC con base de aluminio utilizadas fueron de Silica gel 60F₂₅₄ previamente recubiertas, de la marca Merck.

Preparación del material vegetal

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente durante 15 días, molido con un molino de cuchillas (Fig. 4), y pasado a través de una malla ANALYSENSIEB RESTSCH de 0,5 mm (Fig. 5) para lograr la homogeneidad de la muestra.



Fig. 4. Corteza vegetal molida



Fig. 5. Tamizado de corteza vegetal

RESULTADOS

Tabla 1. Identificación de Alcaloides por reacción química y cromatografía en capa delgada

Parámetro	Mayer	Dragendorff	Hager	Wagner	Marquis	TLC
Alcaloides	++	+++	++	+++	-	+++



Fig. 6. Reacción con reactivo de Dragendorff



Fig. 7. Reacción con reactivo de Mayer

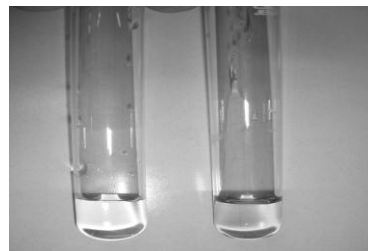


Fig. 8. Reacción con reactivo de Marquis

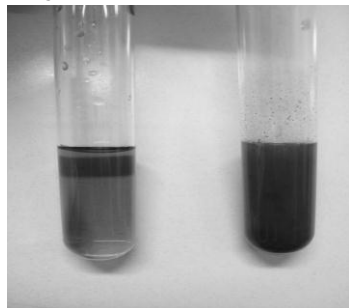


Fig. 9. Reacción con Reactivo de Wagner

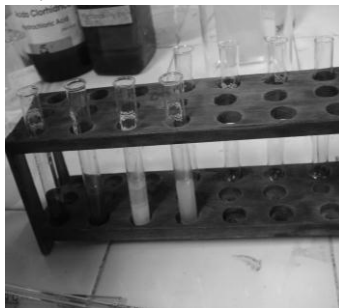


Fig. 10. Reacción con Reactivo de Hager



Fig. 11. Aplicación del extracto sobre la Placa de TLC



Fig. 12. Revelado del TLC con el reactivo de Dragendorff

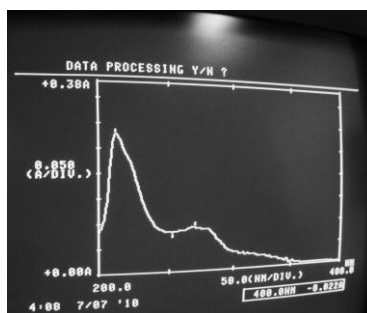


Fig. 13. Barrido espectral de alcaloides en la zona UV

Los alcaloides fueron separados por TLC de los demás componentes e identificados como positivos al generar manchas de color naranja (Fig. 12) al asperjar la placa de TLC con el reactivo Dragendorff, avalando de esta manera las reacciones coloridas realizadas a través de las pruebas de Wagner (Fig. 9), Mayer (Fig. 7) y Hager (Fig. 10) que generaron respuestas positivas a la presencia de alcaloides. La prueba de Marquis dio un resultado negativo (Fig. 8)

para éstos metabolitos. Los alcaloides presentes en el precipitado obtenido en la prueba de Dragendorff fueron liberados con solución de carbonato de sodio y extraídos con éter etílico para obtener el barrido espectral en la zona del ultravioleta, observándose dos picos característicos a 212 y 268 nm respectivamente, con la máxima absorción en el pico de 212 nm.

Tabla 2. Identificación de Flavonoides por reacción química y Cromatografía en Capa Delgada

Parámetro	Shinoda	Marini-Bettólo	Disolución en H ₂ SO ₄	Cloruro Férrico	Hervor en HCl 2N	TLC
Flavonoides	++	±	++	+++	++	+++

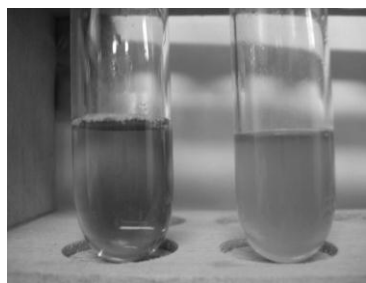


Fig. 14. Prueba de Shinoda

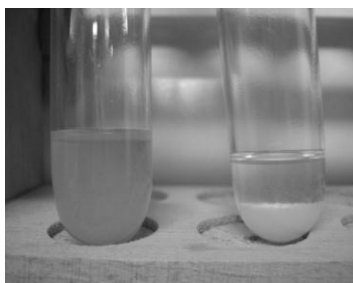


Fig.15. Prueba de Marini-Bettólo

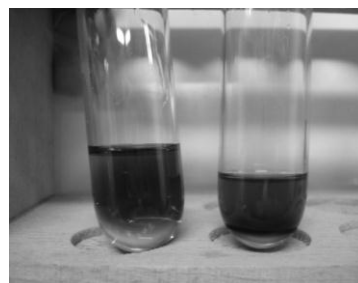


Fig. 16. Disolución con H₂SO₄

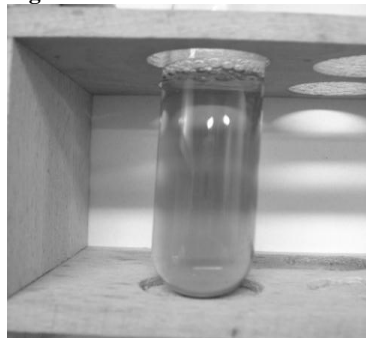


Fig. 17. Hervor con HCL 2N

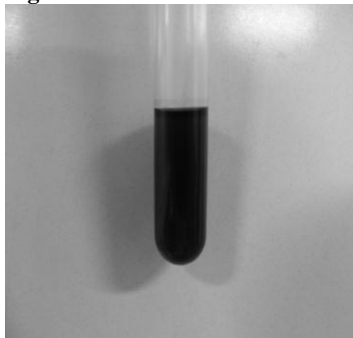


Fig. 18. Reacción con FeCl₃

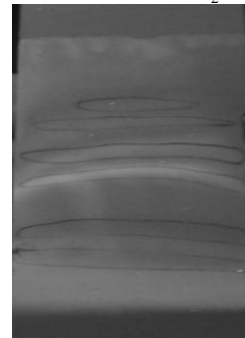


Fig. 19. Cromatografía en capa delgada

La reacción positiva a la prueba de Shinoda (Fig. 14) indica la posible presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas. La reacción positiva a la prueba de Marini-Bettólo (Fig. 15) formando un precipitado ligeramente amarillo podría deberse a la presencia de flavonas. La disolución con ácido sulfúrico concentrado (Fig. 16) generó un color amarillo en el fondo del tubo lo que podría deberse a la presencia de flavonas

y flavonoles. El hervor del vegetal en medio ácido clorhídrico genera un color café amarillento (Fig. 17) lo que indicaría la posible presencia de catequinas. La separación de los flavonoides por TLC generó seis manchas que fluorescen bajo la luz UV de 366 nm generando colores de las gammas azul y violeta (Fig. 19) lo que indicaría la posible existencia de seis tipos de flavonoides en la especie estudiada.

Tabla 3. Identificación de saponinas por agitación mecánica y Cromatografía en Capa Delgada

Parámetro	Prueba de la Espuma	TLC
Saponinas	+++	+++

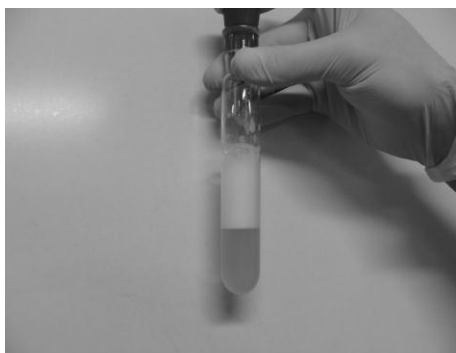


Fig. 20. Prueba de la espuma

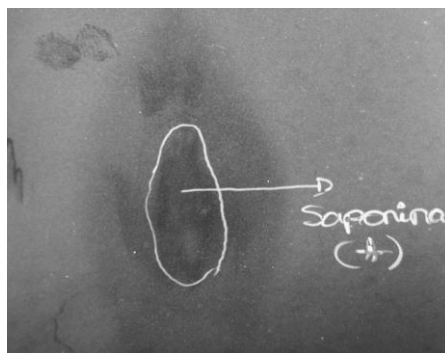


Fig. 21. TLC revelado con el reactivo Vainillina-H₂SO₄

En cuanto a las saponinas la identificación fue realizada por TLC según Plant Drug Análisis, generando una mancha de color morado (Fig. 21) característico que indica su presencia en la especie estudiada y

confirmada a través de la prueba de la espuma (Fig. 20) que permaneció durante más de 30 minutos a una altura bastante considerable.

Tabla 4. Identificación de Esteroles y metilesteroles por reacción química

Parámetro	Prueba de Liebermann-Burchard
Esteroles y metilesteroles	+++

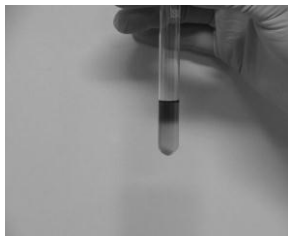


Fig. 22. Reacción cualitativa para esteroles y metilesteroles



Fig. 23. Vista de la capa superior verde indicativo de la presencia de esteroles y metilesteroles

La prueba de Liebermann-Burchard dio positivo generando un color verde (Fig. 22 y 23) indicando la posible presencia de esteroles y metilesteroles. Se habla de posible presencia debido a que no hay reacciones verdaderamente específicas para

estos metabolitos, ya que otros tipos de sustancias, tales como glicósidos cardiotónicos, esteroalcaloides, saponinas di y triterpenos también dan reacciones positivas a esta prueba debido a que poseen detalles estructurales comunes análogos.

Tabla 5. Identificación de Taninos por reacción química

Parámetro	Reacción con gelatina- NaCl
Taninos	+++

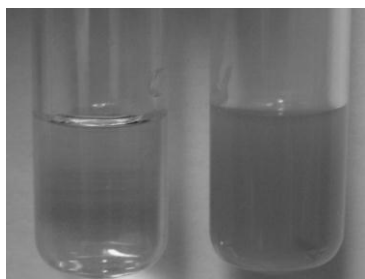


Fig. 24. Reacción con $FeCl_3$

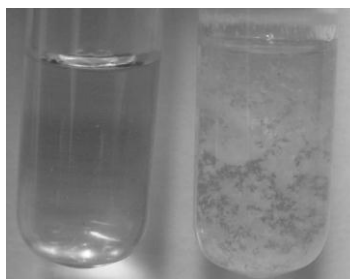


Fig. 25. Reacción con gelatina-NaCl

Taninos dieron positivos con la prueba de gelatina-cloruro de sodio a través de la formación de un precipitado blanco (Fig. 25) que se redisolvió con solución de urea al 10%. Una reacción con solución de cloruro férrico generó precipitado (Fig. 24) lo que implicaría la presencia de compuestos

fenólicos y/o taninos. Otra prueba confirmatoria para fenoles con solución de $FeCl_3$ generó un color verde-negro (Fig. 18).

Tabla 6. Identificación de Aminoácidos por reacción química

Parámetro	Reacción con ninhidrina
Aminoácidos	+++

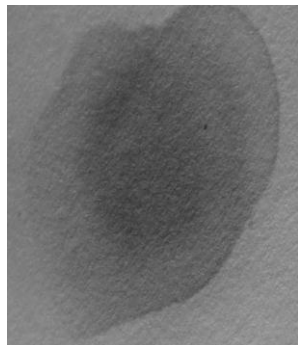


Fig. 26. Complejo morado púrpura de Ruhemann

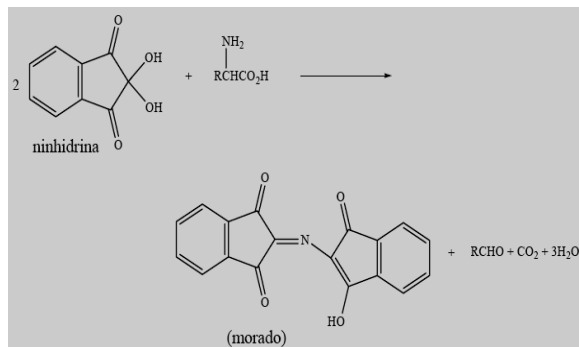


Fig. 27. Reacción general de la ninhidrina con un aminoácido

Finalmente una prueba para la detección de aminoácidos dio positiva con ninhidrina a través de un ensayo a la gota, visualizando su presencia a través de la formación de un complejo morado (Fig. 26) llamado púrpura de Ruhemann cuya reacción de formación se observa en la Fig. 27.

Leyenda: (-) ausencia, (±) dudoso, (+) presencia leve, (++) moderada, (+++) intensa

DISCUSIÓN

Para la identificación de alcaloides por TLC se utilizó el sistema de solventes **AL-5** en lugar del **AL-1** recomendado en el Plant Drug Análisis (pág. 54-1^o edición); debido a que con el sistema **AL-1** los alcaloides quedaron retenidos en la línea inicial de la placa de TLC donde se sembró el extracto. En la extracción de alcaloides, flavonoides y saponinas se utilizó una extracción metanólica en caliente pero por un tiempo más prolongado que el recomendado por el Plant Drug Análisis, con cuatro extracciones sucesivas y posterior concentración antes de

aplicar el extracto sobre la placa de TLC. Para la observación de las reacciones producidas para la identificación de flavonoides, se utilizó extracto metanólico de *Tagetes patula* L., antes de ensayar con la muestra. Posteriormente se hicieron las comparaciones entre ambos extractos, en donde la prueba de Marini-Bettólo generó un resultado dudoso debido a que en vez de generar un precipitado amarillo-naranja produjo un precipitado de color blanco.

CONCLUSIÓN

El screening fitoquímico preliminar de *Chloroleucon tenuiflorum* (Benth.) Barneby & J.M. Grimes, ha generado una serie de informaciones sobre dicha especie. Se ha confirmado la presencia positiva de alcaloides por medio de cinco pruebas distintas, saponinas por medio de dos pruebas, flavonoides, de interés principal en este trabajo, han sido identificados por medio de seis pruebas diferentes, entre ellas la de TLC que brinda la información sobre la existencia de seis posibles tipos de

flavonoides según la separación de las mismas sobre la placa y revelado bajo la luz ultravioleta. Se confirma la presencia además de esteroides y metilesteroides así como la de taninos y aminoácidos. Estos resultados preliminares permitirán seguir con estudios más profundos que serán generados en etapas posteriores a este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bruneton J. 2001. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales, Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza-España, 3º Edición. 1099 pp.
- Domínguez X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, S.A., México- México, 1º Edición. 281 pp.
- Evans W. C. 1991. Farmacognosia, Interamericana Mc Graw-Hill, 13º Edición. 901 pp.
- Harris, D. C. 2001. Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Reverté, 2ª edición. España. 981 pp.
- Marco J.A. 2006. Química de los productos naturales, Editorial Síntesis, S.A., Madrid-España. 284p.
- Ortiz C.V., 1995. Fundamentos de Fitoquímica, Editorial Trillas, S.A., México-México. 235p.
- Villar del Fresno A. M^a. 1999. Farmacognosia General, Editorial Síntesis. 335 pp.
- Wagner H., S. Bladt, E.M. Zgainski. 1983. Plant Drug Análisis, Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 1º Edición. 320 p.
- Zelada B. R., Estudio Taxonómico y Fitoquímico de *Flaveria bidentis* (L.) KUNTZE (ASTERACEAE), Tesis para optar el título profesional de Biólogo Mención Botánica (2003) 141.