



Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Ingeniería Bioquímica

“Evaluación de compuestos polifenólicos de extractos metanólicos de hojas de *Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor*”

Asesor de residencia:

DR. FEDERICO GUTIERREZ MICELI

Residente:

Alexei Robles Silva

Tuxtla Gutiérrez Chiapas 10 de Enero del 2014

Contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Justificación.....	3
3.	Caracterización del Área en que participó.....	4
4.	Objetivo	7
4.1.	Objetivo general.....	7
4.2.	Objetivo específico.....	7
5.	Antecedentes	8
5.1.	Familia Commelinaceae	11
5.2	<i>Callisia fragrans</i>	12
5.2.1	Taxonomía	12
5.3	Maguey Morado (<i>Rhoeo discolor</i>).....	13
5.3.1	Taxonomía	13
5.4	Estudios quimiotaxonómicos	14
5.5	Metabolitos Secundarios.....	14
5.5.1	Terpenos	17
5.5.2	Saponinas	19
5.5.3	Compuestos nitrogenados	20
5.5.4	Compuestos fenólicos	20
5.5.5	Flavonoides.....	21
5.5.6	Taninos	24
5.5.7	Cumarinas.....	26
6.	Metodología	28
6.1	Recolección del material vegetal.	28
6.2	Obtención de extracto.....	28
6.2.1	Metanólicos	28

6.3 Determinación de la composición fitoquímica de los extractos acuosos y metanólicos.....	28
6.3.1 Análisis cualitativo.....	28
6.3.1.1 Flavonoides.....	29
6.3.1.2 Taninos	29
6.3.1.3 Cumarinas.....	29
6.3.1.4 Saponinas	30
6.3.1.5 Alcaloides.....	30
6.3.2 Análisis cuantitativo.....	31
6.3.2.1 Fenoles totales (método colorimétrico de Folin- Ciocalteau).....	31
6.3.2.2 Flavonoides (método colorimétrico cloruro de aluminio).	31
6.3.2.3 saponinas totales.	32
6.3.2.4 proantocianidinas (taninos condensados).	32
6.3.2.5 cumarinas.	32
7. Resultados y Discusión.....	34
8. Conclusiones.....	40
9. Bibliografía	41
10. Anexos	44
10.1 Curvas patrón.	44
10.2 Cálculos para Cuantificación de Compuestos.	49

1. Introducción

En nuestros días, Es muy importante reconocer el estudio fitoquímico de un gran número de plantas, debido la variedad de metabolitos presentes en ellas a lo largo del mundo, sin embargo debido a que los procesos de extracción, separación, purificación e identificación de estos metabolitos son laboriosos, el campo aún no ha sido explotado por completo, sin embargo los resultados positivos que el estudio en esta área han demostrado son una gran motivación para seguir invirtiendo y profundizando en el conocimiento de las plantas, pero especialmente aquellas que poseen, por medio de su uso tradicional o artesanal, un efecto farmacéutico, dando paso al desarrollo de nuevas y efectivas tecnologías.

Callia fragrans o planta de canasta, es una planta ornamental común del estado de Chiapas, se ha reportado un gran potencial en cuanto a sus propiedades medicinales y su alto contenido en compuestos poli fenólicos, esto nos demuestra su gran potencial como fármaco, puesto que se ha demostrado sus propiedades anti virales, en este presente proyecto se pretende abarcar el estudio de dichos compuestos metanólicos y comprender en mayor medida su composición química, así mismo se pretende el estudio paralelo del Maguey Morado *Rhoeo discolor*, perteneciente a la familia de las comelináceas la cual posee dichos compuestos en altas cantidades, así mismo su alto contenido en antioxidantes (*Reyes-Munguía, 2009*) y compuestos de estructura flavónica con propiedades bactericidas

En el presente trabajo se pretende, separar e identificar los compuestos químicos Poli fenólicos, Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, son sustancias biológicamente activas y existen numerosas evidencias, epidemiológicas, estudios in vitro, estudios en modelos animales e intervenciones

en humanos, que indican que estos compuestos proporcionan un beneficio al organismo en contra diversas enfermedades (Mercado et al. 2013).

Entre las propiedades benéficas de los compuestos polifenólicos están la protección contra lesiones celulares y subcelulares, inhibición del crecimiento de tumores, activación de los sistemas de detoxificación hepáticos y bloqueo de las vías metabólicas que pueden ocasionar carcinogénesis. (González, 2007)

Los compuestos polifenólicos presentes en tallos y hojas se extraen generalmente con disolventes estos pueden ser acuosos y metanólicos, La extracción dependerá de la naturaleza química, del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia (Perez 2003), debido a ello se les debe manejar con mucho cuidado, para evitar los errores durante su extracción, para así poder identificarlos y aislarlos correctamente.

Siendo el grupo de los compuestos polifenólicos, una variedad sumamente útil de compuestos químicos para el tratamiento de un gran número de enfermedades se enfocará el objetivo principal de esta determinación es comprobar la actividad anti viral de los compuestos polifenólicos presentes en *Rhoeo discolor* y *Callisia fragrans*

2. Justificación

Es indudable la importancia de las plantas y árboles para la medicina moderna, durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico. Todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Núñez., 1982)

Estas propiedades curativas y/o nutricionales son aportadas gracias al metabolismo de las plantas y vegetales, los llamados metabolitos son producto del metabolismo secundario de las plantas, no se encuentran en estado puro en las mismas, sino en forma de complejos cuyos componentes se complementan en su acción sobre el organismo. Estas sustancias activas presentan un equilibrio fisiológico dentro de la planta y el organismo, debido a ello, resultan más asimilables por el cuerpo y carecen de efectos nocivos.

Dentro del estado de Chiapas la bio diversidad y las diferentes regiones fisiográficas nos brindan una diversidad botánica muy extensa, sin embargo, la falta de exploraciones botánicas solamente nos ha mostrado un pequeño panorama de lo que la diversidad botánica del estado de Chiapas puede aportarnos, gracias a esta amplio abanico de posibilidades, se decidió estudiar a las especies *Callisa fragrans* y *Rhoeo discolor*, puesto que son especies endémicas del estado de Chiapas, de uso ornamental, sin embargo, se han reportado altas cantidades de compuestos metanólicos presentes en tallos y hojas, dichos estudios y determinaciones nos dan la posibilidad de desarrollar tecnologías, tratamientos o medicamentos, a partir de especies endémicas del estado.

3. Caracterización del Área en que participó

El proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Investigación de biotecnología en el edificio “Z” y en el Edificio “J” en el área de tejidos vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en Carretera Panamericana Km 1080 de esta ciudad.

1.1 Políticas y normas

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

1.2 Objetivos de la institución

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

1.3 Servicios que presta la institución

- Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios, en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo regional. Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el postgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

- Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.
- Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.
- Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que cuenta el sistema.
- Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.
- Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

1.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaría de Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecido.

Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Las funciones del departamento son múltiples por lo que tiene que coordinarse con otros departamentos:

- ✓ Coordinar con las divisiones de estudios profesionales y postgrado e investigación, la aplicación de programas de estudios y con el departamento de desarrollo académico, los materiales y apoyos didácticos

a las asignaturas de las correspondientes a las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparten en Instituto Tecnológico y controlar el desarrollo.

- ✓ Coordinar con la división de estudios profesionales y postgrado e investigación, con el departamento de desarrollo académico, la formulación y aplicación de técnicas e instrumento para la evaluación del aprendizaje de las asignaturas correspondientes en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Coordinar los proyectos de investigación educativa, científica y tecnológica en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se llevan acabo en el Instituto Tecnológico con el sector productivo de bienes y servicios de la región, así como controlar su desarrollo.
- ✓ Proponer a la Subdirección Académica el desarrollo de recurso y eventos que propicie la superación y actualización profesional del personal docente de las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica, en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Apoyar a la División de Estudios Profesionales en el proceso de titulación de los alumnos del Instituto.
- ✓ Superar y evaluar el funcionamiento del departamento con las demás áreas y con base a los resultados, proponer las medidas que mejoren su operación.
- ✓ Coordinar las actividades del departamento con las demás áreas de la Subdirección Académica.
- ✓ Presentar reportes periódicos de las actividades desarrolladas a la Subdirección Académica.

En el área de Ingeniería Bioquímica se cuenta con laboratorios, los cuales son utilizados para realizar las actividades experimentales correspondientes a las distintas materias impartidas en la institución, así como para la realización de proyectos de investigación que se llevan a cabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación ya que cuentan con los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo

4. Objetivo

4.1. Objetivo general

Caracterizar fitoquímicamente los extractos Metanólicos de maguey morado (*Rhoeo discolor*) y planta de canasta (*Callisia fragrans*)

4.2. Objetivo específico

Evaluar Cuantitativamente la presencia de Fenoles totales, Cumarinas, Saponinas, Taninos obtenidos de las hojas de maguey morado (*Rhoeo discolor*).

Evaluar Cuantitativamente la presencia de Fenoles totales, Cumarinas, Saponinas, Taninos obtenidos de las hojas de planta canasta (*Callisia fragrans*).

5. Antecedentes

El tema de las plantas medicinales es quizá tan antiguo como el hombre mismo, sin embargo, los conocimientos al respecto siempre han estado diseminados. Las personas siguen recurriendo a los remedios vegetales para aliviar sus enfermedades comunes, los productos naturales representa un aporte muy significativo ya que son un recurso que debe conocerse y usarse, sin embargo, realizar estudios en productos vegetales y herbolarios, requiere de una gran inversión tanto de tiempo como de recursos, puesto que se precisan de un estudio adecuado de él espécimen a estudiar, aislamiento, selección, así como el conocimiento de su estructura química y su metabolismo, las plantas además de su metabolismo primario poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como insecticidas, herbicidas, colorantes y sus diversas capacidades como un fármaco potencial, puesto que el organismo de las especies herbolarias y vegetales existen cientos de compuestos derivados del metabolismo secundario, los cuales se encuentran a diferentes proporciones y varían según la especie, edad y estrés al que fue sometida la planta, dicho esto la tarea es un poco complicada y para ello se requiere de evaluaciones estrictas de identificación, aislamiento, biológicas, farmacológicas y toxicológicas, el uso adecuado de las plantas y en especial de especies herboreas se basa en el conocimiento de las mismas, de esta forma podemos usar de manera favorable.(Avalos, 2009)

En el mundo las plantas medicinales son de gran importancia debido a varias razones. Los metabolitos secundarios de las plantas son un recurso importante de las industrias farmacéuticas, experimentado en el comercio medicinal un incremento a nivel mundial en los últimos 15 años. Según la United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), en el mundo, 1.5 billones de personas pertenecientes a países en desarrollo continúan utilizando plantas

medicinales en la forma tradicional. Los productos naturales han empezado a ser nuevas estrategias comerciales y se han implementado en programas de salud alternativa en países desarrollados sin excluir a los no desarrollados. Por lo que la demanda de plantas medicinales ha crecido en Europa y todo el mundo. La comercialización de las plantas medicinales significa cada año un negocio de unos 20,000 millones de dólares en todo el mundo. Siendo un área de gran importancia a nivel internacional (Bye, 1999).

En México socialmente de acuerdo con cifras de la Secretaría de Salud, al menos el 90% de la población usa las plantas medicinales; de ese 90%, la mitad usa exclusivamente “yerbas” para atender sus problemas de salud; el otro 50%, además de las hierbas medicinales, usa la medicina alópata, Si se consideran los demás mercados de todas las capitales, los mercados regionales, y las empresas naturistas de provincia, se calcula que al menos se comercializan 3500 toneladas de plantas medicinales al mes en todo el país. Además, socioeconómicamente la herbolaria le da empleo a varios miles de familias campesinas, rurales y urbanas; aunque por ahora es muy difícil calcular los números, ya que la mayoría es por comercio informal. En el rubro de la salud para el 45% de la población nacional es el único recurso con el que cuentan (Challenger, 1998).

El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países. En México, los conocimientos sobre herbolaria se han transmitido en la población, principalmente de generación en generación. Las investigaciones sobre plantas medicinales han demostrado que éstas pueden presentar una gran variedad de compuestos y efectos farmacológicos, entre los que se incluyen antiinflamatorios, vasodilatadores, antimicrobianos, antivirales, anticonvulsivos, sedantes, antipiréticos, etc. Generalmente son usados como jugos, infusión, jarabe y compresas. Aproximadamente el 40% de los medicamentos actuales derivan de plantas medicinales y otros productos naturales empleados tradicionalmente. México cuenta con una gran biodiversidad y se estima que posee 30,000 especies de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documento 3000 con usos

medicinales y el IMSS cuenta con un herbario de 14000 ejemplares de plantas medicinales. A pesar de que los medicamentos herbolarios se han empleado durante muchos siglos como los referidos en el código Badiano escrito en Náhuatl y traducido al latín por el médico indígena Martín de La Cruz en el siglo XVI (Berlin & Berlin, 1999).

Desde el punto de vista de la importancia taxonómica, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas, después de China que tiene registradas 5000. En tercer lugar está Colombia con 2600 plantas. Estos son los primeros lugares mundiales en herbolaria. De esas sólo se han estudiado en toda la historia unas 500. Es primordial impulsar su estudio porque de toda la herbolaria mundial, se ha usado menos del 1% para el desarrollo de todos los medicamentos, unos 10,000 de todas las farmacias del mundo; así que tenemos un 99% de hierbas para desarrollar muchos más miles de nuevos medicamentos. En México, sólo se han estudiado unas quinientas plantas medicinales, tenemos pendientes al menos 4,000 (Ramamoorthy, 1998).

En el estado de Chiapas como resultado de la diversidad de climas, suelos, topografía y compleja estructura geológica (Miranda 1952), la presencia de numerosos grupos étnicos conservan aún conocimientos ancestrales sobre las propiedades y usos de las plantas medicinales, han sido reconocidas como fuente de mejora en la salud especialmente para tratar padecimientos gastrointestinales, respiratorios, febriles, reumáticos y dermatológicos. Sin embargo, solamente se han llevado a cabo pocas exploraciones botánicas en Chiapas y sus diferentes zonas fisiográficas (Vázquez, 1997). Entre dichas exploraciones podemos encontrar los trabajos realizados por Berlin et al. (1990), Berlin y Berlin (1993, 1996) en la Meseta Central; Isidro-Vázquez (1997) en la Depresión Central; Pimentel-Tort (1988) en las Montañas del Norte y el INI (1995) en la Sierra Madre de Chiapas.

Junto a esta riqueza existen un gran número de herbarios donde se encuentra información con relación a las plantas de carácter medicinal del estado de

Chiapas, estos son: Herbario del Instituto de Historia Natural de Chiapas (CHIP), ECOSUR, Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM), Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU), Herbario del Instituto de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), Herbario de la Universidad de Chapingo (XOLO); con el fin de obtener los datos etno-botánicos, que se encontraban en la ficha de recolecta de cada espécimen.

Siendo de tal importancia el potencial que nos ofrecen las plantas medicinales que podemos encontrar en México es de vital importancia que se destinen recursos para su investigación, dando pie al desarrollo de nuevos medicamentos, de esta manera abrir camino para el avance en el sector herbolario.

5.1. Familia Commelinaceae

Se conoce como commelináceas (*Commelinaceae*) a la familia de plantas monocotiledóneas que esta mayormente representada por Hierbas perennes, a veces suculentas, con tallos bien desarrollados que son más o menos hinchados en los nudos, o tallos a veces cortos. Muchas veces con células de mucílago o canales conteniendo rafidios. Pelos simples, de una capa de células de espesor o unicelulares.

En algunas especies, los pétalos están soldados en un tubo, mientras que raramente aparece uno de ellos reducido en tamaño; estambres con dos verticilos trímeros, a veces uno de ellos formado por estaminodios (en un género sólo un estambre funcional y ningún estaminodio), con filamentos normalmente libres y a veces adornados de pelos de colores vivos, con anteras de dehiscencia por poro apical; ovario súpero, con tres carpelos soldados, con tres cavidades, rara vez dos, cada carpelo con uno a varios óvulos ortótropos de placentación axilar; estilo único terminado, o bien en una cabezuela estigmática aplastada. (Heywood, 1985)

Se extienden por regiones tropicales o sub-tropicales desde el norte-centro de México hasta abarcar gran parte de Sudamérica, Muchos de los géneros importantes se localizan distribuidos en los Continentes Europeo, asiático, africano

y el Americano, dentro de la república mexicana podemos encontrar especies importante dentro del género, *Callisia Repens*, *callisia monandra*, *callisia fragrans*, *Commelina coelestis*, *Commelina congestispatha*, *Commelina dianthifolia*. (Espejo Serna, 2009)

5.2 *Callisia fragrans*

5.2.1 Taxonomía

Nombre científico: *Callisia Fragrans*

- Reino: Plantea
- División: Angiospermae
- Clase: Monocotyledoneae
- Subclase: Commelinidae
- Orden: Commelinales
- Familia: Commelinaceae
- Género: *Callisia*
- Especie: *C. fragrans*



Fig. 1 Planta de canasta (*Callisia fragrans*)

Estas plantas que se distinguen por poseer hojas carnosas, su uso principalmente es ornamental o de vivero, es una especie endémica de México y se extiende desde Tamaulipas hasta Yucatán pero que también se encuentra en América del norte y Sudamérica.

Las hojas son de 30 pulgadas de largo y 7 pulgadas de ancho, se caracterizan por su color verde brillante de forma elíptica-lanceolada de terminación puntiaguda y desnuda en el tronco, cuenta con sépalos de aproximadamente 3.5mm hasta 5mm de largo y 1.2 mm de ancho.

5.3 Maguey Morado (*Rhoeo discolor*)

5.3.1 Taxonomía

Nombre científico: *Rhoeo discolor* (L'Hér) Hance

- Reino: Plantea
- División: Angiospermae
- Clase: Monocotyledoneae
- Subclase: Commelinidae
- Orden: Commelinales
- Familia: Commelinaceae
- Género: Tradescantia
- Especie: *Rhoeo discolor* (L'Hér) Hance



Fig. 2 Maguey morado (*Rhoeo discolor*)

Es originaria de México y adaptada a otras regiones tropicales, esta planta se caracteriza por tener algunos usos terapéuticos como lavar heridas, asma, tos y dolor de cabeza, desinflamatorio, generalmente se utilizan las hojas.

Es una planta herbácea de hojas liner-lanceoladas, gruesas, suculentas, jugosas, acuminadas, sésiles de 20-25 cm de largo con 3.5 cm de ancho, imbricadas, lisas, de color morado-oscuro abajo; tallo erecto o reclinado, de 20 cm de longitud, plano, pero ranurado, llevando una densa roseta, vaina de 4 cm de ancho, flores blancas con tres pétalos ovalados de 5-8 mm de largo, densamente recostado en forma de barquilla, brácteas color púrpura, brotes en medio de la base de la hojas; semillas rugosas o ásperas de 3 mm de largo y de 1-1.5 mm de ancho (Maximino, 2002).

El maguey morado, ha sido utilizado tradicionalmente para tratar de prevenir enfermedades gastrointestinales y de la piel, algunos estudios sugieren que podrían prevenir el cáncer, aterosclerosis, lesiones hepáticas, lesiones renales, diabetes mellitus y otras relacionadas con el proceso de envejecimiento (Daniel, 2003).

5.4 Estudios quimiotaxonómicos

Aunque la familia Commelinaceae es muy numerosa, se han realizado estudios fitoquímicos detallados que caracterizan metabolitos secundarios de sus géneros aunque algunos de estos no han sido objeto de investigación química como es el caso de *Rhoeo discolor* y algunas especies de *Callisia*. Se han aislado e identificado algunos metabolitos contenidos en los pétalos de sus flores.

En esta familia también se han identificado compuestos de tipo flavonoide como la isoflavacomelitina aislado de *Commelina comunis* (Idaka, 2000).

5.5 Metabolitos Secundarios

Generalmente Cuando se habla de productos naturales se hace referencia a los extractos o sustancias que se obtienen de dichas plantas, específicamente de aquellas que poseen propiedades medicinales o son altamente nutricionales. De manera particular, se les llama productos naturales a los metabolitos secundarios

obtenidos de organismos vivos tales como bacterias, hongos, animales y vegetales. Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente (Castellanos y Espinosa, 2000)

Las características básicas de los metabolitos secundarios son:

Se producen por rutas anabólicas especializadas cuando no hay crecimiento, tiene un significado evolutivo controvertido por ser imprescindibles, pueden ser una estrategia para mantener en funcionamiento los sistemas metabólicos cuando no hay crecimiento. Son indicativos de diferenciación y se producen durante la idiofase de los cultivos. Los compuestos que derivan de este tipo de metabolismo se pueden clasificar de varias formas: 1) El ordenamiento estrictamente químico, basado en los principales grupos funcionales, es la forma más secuenciada de organización (Pellissier, 2004). 2) Por la complejidad ascendente de las cadenas carbonadas, basado en el fraccionamiento estructural para el caso particular de los compuestos fenólicos.

Para un mismo grupo funcional, además de la clasificación por las cadenas carbonadas presentes, la separación de los metabolitos secundarios también se realiza teniendo en cuenta la prioridad de organización de cada tipo de compuesto, la posición del grupo funcional, su configuración y la naturaleza de los residuos terminales. (Julkunen, 2001)

En el organismo vivo se puede diferenciar tres rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos secundarios. La ruta del ácido shikímico (alcaloides y fenilpropanoides), ruta de acetato-malonato (policétidos) y ruta del acetato-mevalonato (terpenos o isoprenoides). Las rutas biosintéticas que forman parte del metabolismo secundario es un tema que en los últimos años ha llamado poderosamente la atención. La síntesis específica de cada compuesto suele estar

restringida a estados específicos del desarrollo respectivo de cada tipo de organismo, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos. Este fenómeno se debe a la formación, dependiente de fase, de la correspondiente enzima, lo que significa que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación (Harbetson, 1999)

El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los compuestos de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario. Los compuestos secundarios se dividen en tres grandes grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura (Harborne, 1990).

a) El ácido shiquímico, por la ruta metabólica que lleva su nombre, da origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos, los ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas (Fount, 2001).

b) El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato y también los terpenos o isoprenoides son sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato. Todos los terpenos naturales proceden de unidades de acetato activo (acetil-Coenzima A), que se condensan y transforman para originar ácido mevalónico, unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos. La biosíntesis de las estructuras fenólicas se efectúa por dos rutas metabólicas esenciales: la del ácido shiquímico y la del ácido malónico (conocida como la de los policétidos); la primera es mayoritaria en las plantas superiores y la segunda es favorecida en los microorganismos (Graham, 2002).

c) Los aminoácidos son precursores de varios metabolitos secundarios. Por ejemplo la fenilalanina y la tirosina son intermediarios metabólicos en la biosíntesis de numerosos compuestos fenólicos, y el triptófano es el precursor de hormonas como el ácido indolacético. Los alcaloides se forman por rutas biosintéticas muy diversas, a partir de muchos aminoácidos como L-arginina, L-lisina, L-fenilalanina,

Los compuestos terpénicos se dividen en:

Monoterpenos: (dos isoprenos) se encuentran en los aceites esenciales de muchas plantas, a las que dan su olor y sabor característico: mentol, geraniol, limoneno, pineno, alcanfor etc (Meier et al., 2003).

Sesquiterpenos: (formados por tres moléculas de isopreno) al igual que los monoterpenos, muchos sesquiterpenos aparecen en los aceites esenciales. A su vez, actúan como fitoalexinas (antibióticos producidos por las plantas en respuesta al ataque de microorganismos) y como agente repelente de herbívoros.

Triterpenos: (seis isoprenos) se encuentran esteroides y esteroides derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroides. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C 22 y C 23.

Tetraterpenos: (ocho isoprenos) en este grupo son abundantes las xantofilas y carotenos, pigmentos vegetales amarillo y anaranjado respectivamente. Dan color a los frutos, raíces (zanahoria) flores etc (Meier et al. 2003). En la fotosíntesis desempeñan un papel clave absorbiendo energía luminosa de longitudes de onda distinta a las que capta la clorofila. El caroteno es precursor de la vitamina A (Bravo & Saura, 1999).

5.5.2 Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios terpénicos ampliamente distribuidas en plantas superiores; son de naturaleza glucosídica, ya que generalmente se encuentran unidas a un azúcar, los restos de azúcar pueden ser: glucosa, galactosa, ácido glucorónico, xilosa, rhamnosa o metil pentosa unidos a una aglucona hidrofóbica (sapogenina). La gran complejidad de la estructura de la saponina surge de la variabilidad de la estructura de la aglucona (Regelson & Formica , 2005).

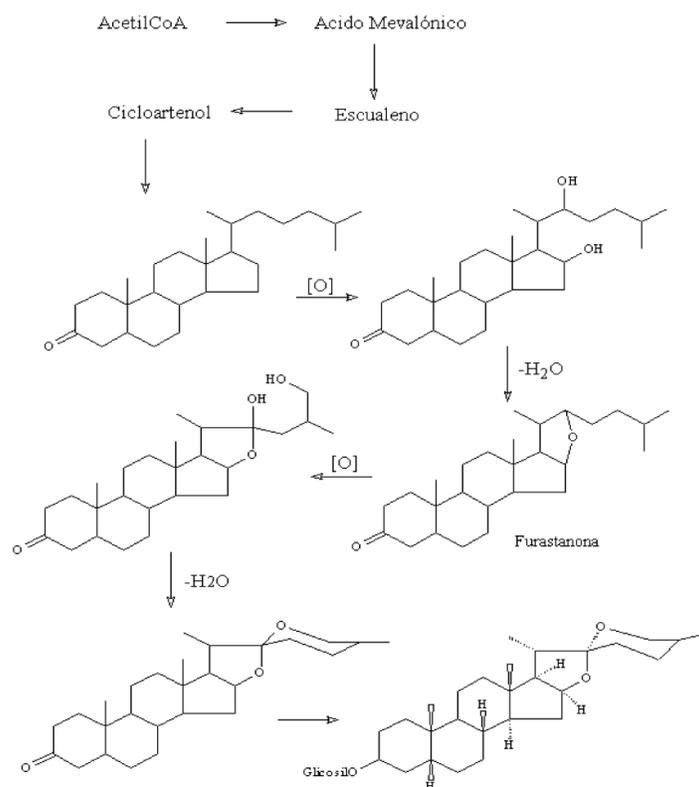


Fig. 4 Síntesis de Sapogeninas y Saponinas

En función de la estructura de la sapogenina las saponinas se dividen en: saponinas esteroideas (triterpenoide tetracíclico, con 27 carbonos), también llamadas saponinas neutras. Son ejemplos la dioscina (ñame mexicano) y los ginsenósidos (ginseng). Saponinas triterpénicas pentacíclicas, (con 30 carbonos) también llamadas saponinas ácidas. Un ejemplo es la glicirricina (regaliz) (Bravo et al. 1999).

5.5.3 Compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados son el grupo de metabolitos secundarios más estudiados por su toxicidad y efectos en los animales, además son de los más fáciles de reconocer. Entre los más importantes están los glucosinolatos, aminoácidos no proteicos, glucósidos cianogénicos y los alcaloides,

Los alcaloides se definen generalmente como sustancias de origen vegetal que poseen nitrógeno en su composición y que son farmacológicamente activas. Debido a su gran actividad biológica, los alcaloides tienen gran aplicación en medicina, entre los diferentes usos que se les da en este campo se puede destacar:

- Actividad sobre el sistema nervioso central
- Actividad antitumoral
- Vasoconstrictores
- Anestésicos
- Antimicrobianos

Diversos estudios acerca de la actividad antiviral que poseen los alcaloides presentes en algunas plantas (Género *Thalictrum*).

5.5.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles, son las sustancias que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etc.) (Macheix et al. 1990)

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas.

Los fenoles son sintetizados de *novo* por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta

que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable.

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinados con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero. Actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. las antocianinas son las responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable (Evans, 2000).

Los fenoles se encuentran casi en todos los alimentos de origen vegetal. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor (Maximino, 2002).

5.5.5 Flavonoides

Los flavonoides, uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- γ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C₆-C₃-C₆. Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos y antocianinas. El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) y reciclado en un anillo furano (auronas) (García Nava, 2009).

Tres características estructurales son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Letan, 2002). La quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera. A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glucósidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-rhamnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglucona. Los glucósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglucona o flavonoide respectivo. Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7 (Harborne, 1990)

Podemos encontrar Flavonoides mayormente en las hojas y en el exterior de algunas plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercetina (Hertog, 2003).

En la actualidad se han identificado cerca de 5,000 flavonoides, pero de entre ellos podemos destacar algunos como:

- Flavonoles: quercetina, hesperidina, rutina, narangina y limoneno. La quercetina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La narangina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima (Hertog, 2003).
- Isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, tofu, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeina (Harborne, 1990)

- Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino (Hertog & Putte , 2003).
- Antocianidinas: Son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas (Hertog & Putte , 2003).
- Ácido elágico: Es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras (Hertog, & Putte , 2003).
- Catequina: El té verde y negro son buenas fuentes (Hertog & Putte , 2003).
- Kaemferol: Aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja (Hertog & Putte , 2003).

5.5.6 Taninos

Sustancias no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol, acetona, poco solubles en éter, de sabor astringente y con la propiedad de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable, fijándose sobre sus proteínas, la fórmula condensada de los taninos es $C_{14}H_{14}O_{11}$, (considerada como la del tanino común), es sólo aproximada, ya que son polímeros complejos.

Los taninos solubles en agua son precipitados de sus soluciones por sales de metales pesados (Cu, Fe, Hg, Pb, Zn, Sn), rara vez se los obtiene cristalinos y los agentes oxidantes los transforman en productos de color oscuro llamados flobafenos, por poseer $-OH$ fenólicos se colorean con las sales férricas, los galotaninos y elegitaninos dan coloración azul-negro, mientras que los taninos catéquicos dan coloración marrón-verdoso. Precipitan con los alcaloides, molibdato de amonio, tungstato de sodio y soluciones de albúmina (gelatina). Los taninos catéquicos son precipitados por el agua de bromo, el formol clorhídrico. Todos los taninos son fácilmente oxidables sobre todo en medio alcalino. Estudios recientes (Asquith, 2006) han demostrado que las catequinas y flavonoides son fuente de protección por sus propiedades antioxidantes. Por la similitud estructural con los taninos condensados, fueron estudiados éstos en especies forestales (pino, casuarina, mimosa, eucaliptus) frente a la capacidad protectora de los rayos UV. Los estudios demostraron la eficiencia en la protección de las bacterias contra el daño de los UV (Asquith, 2006)

Taninos Hidrolizables: Son ésteres de ácidos fenoles y de osas, se denominan así por ser fácilmente hidrolizables por ácidos, bases o enzimas. Antiguamente se les llamaban taninos pirogálicos, porque procedían del pirogalol, por destilación seca. Se diferencian dos grupos, los galotaninos y los elagitaninos (Asquith, 2006).

Galotaninos: son ésteres del ácido gálico y del ácido digálico unidos entre sí por funciones ésteres entre el $-COOH$ de uno de ellos y el $-OH$ del otro. A su vez unidos a la glucosa, a veces la hamamelosa (derivada de la ribosa). A este grupo pertenece el tanino de la nuez de Agalla, la glucogalina del ruibardo, el hamamelitanino de las hojas de hamamelis, los taninos de los arces etc. El tanino de Agalla da por hidrólisis, por cada molécula de glucosa 9 a 10 moléculas de ácido gálico. Otro posible isómero es el que tiene en la glucosa el $-OH$ del carbono 1 esterificado por un ácido penta-galoil-gálico (Asquit, 2006)

Elagitaninos: Taninos elágicos. Son sustancias complejas, que dejan un depósito insoluble durante el curtido de las pieles (tanado), ello es debido a la precipitación del ácido elágico (dilactona, unión de dos ácidos gálicos) que en el vegetal vivo estarían unidos a azúcares. Esta dilactona se forma durante la extracción del tanino en agua hirviendo. Su hidrólisis produce glucosa, ácido elágico y ácido gálico (Asquit, 2006)

Taninos no hidrolizables, condensados o catéquicos. Estas sustancias no son hidrolizables por los ácidos ni por las enzimas. Los ácidos fuertes en caliente o los agentes de oxidación los convierten en sustancias rojas u oscuras, insolubles en la mayor parte de los solventes, llamados “flobafenos”. Estos taninos no son derivados del ácido gálico sino que derivan de los catecoles, a los que se les considera protaninos. Poseen estructura relacionada con los flavonoides y por ser no glucídicos son poco solubles en agua y en lugar de hidrolizarse cuando se los hace hervir en ácido diluido, se transforman en producto de condensación. Las catequinas se consideran precursores de los taninos condensados. Los taninos presentes en las uvas son catequinas y sobre todo leucoantocianidinas (Harbertson, 1999).

5.5.7 Cumarinas

se conoce con el nombre de Cumarinas a los compuesto químico orgánico perteneciente a la familia de las benzopironas, cuyo nombre según la IUPAC es 2H-cromen-2-ona. En su estado normal (estándar) se caracteriza por una estructura cristalina e incolora. A este esqueleto se le pueden adicionar diferentes residuos formando la familia de las cumarinas. Las cumarinas se consideran un grupo de metabolitos secundarios de las plantas, Son compuestos heterocíclicos derivados del ácido cinámico, tiene un núcleo formado por un anillo bencénico condensado con un anillo piránico. Un tercer anillo heterocíclico puede fusionarse a esta estructura. Sobre esta se dispone sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas. Prácticamente todas las cumarinas poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7 ya sea libre como en la umbeliferoma o combinado (metilo azúcares). Estos compuestos presentan un amplio rango de actividad biológica, podemos citar: la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la acción estrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de ciertas furanocumarinas, etc., se destaca además, el uso de cumarinas como saborizantes y en perfumería (Murray, 2002) También son antagonistas de la vitamina K e inducen su deficiencia. La vitamina K interviene en el proceso de coagulación de la sangre activando la protombina y una deficiencia de esta puede traer consigo hemorragias.

Las cumarinas se clasifican en: cumarinas simples y cumarinas complejas, estas últimas a su vez, se clasifican en furanocumarinas y piranocumarinas, las cuales, dependiendo de la posición del anillo furano o pirano, se subclasifican en lineales y angulares (Murray, The Natural Coumarins, 2002).

Las cumarinas simples pueden tener sustituciones oxigenadas en las posiciones 6, 7 y 8 del núcleo bencénico. También pueden poseer hidroxilos adicionales libres o combinados. Ejemplo de ellas son el esculetol del castaño de indias con dos hidroxilos libres sobre los carbonos C-5 y C-7 o el escopoletol presentes en

algunas solanáceas que poseen un hidroximetilo en C-5 y un hidroxilo libre en C-7 (Berenbaum, 2000)

Cumarinas complejas Es cuando en el anillo cumarínico básico, generalmente hidroxilado en C-7, se sitúan sobre los carbonos 6 u 8 radicales isoprenílicos de 5, 10 o 15 átomos de carbono, que por su alta reactividad pueden originar anillos adicionales de tipo furánico o piránico. se originan a partir del ácido shikímico las llamadas cumarinas piránicas y furánicas, estas a la vez se dividen en lineales y angulares dependiendo de la posición donde se condensa el isopentenil pirofosfato para luego ciclarse y formar el heterociclo (Berenbaum, 2000).

Furanocumarinas en 1934 se aisló el primero de estos compuestos, el bergapteno (psoroleno metoxilado en posición 5) de *Citrus bergamia* y posteriormente la xantotoxina (8 metoxi psoroleno); en 1940 se identificaron estos compuestos como los responsables de producir fotodermatitis, estos compuestos son altamente fluorescentes bajo luz UV y aun en la región visible (Berenbaum, 2000). (Berenbaum, 2000)

Las piranocumarinas tienen el núcleo pirano unido en posiciones 6-7: tipo xantiletina y 7-8: tipo sesilina (Pelliser, 2004)

6. Metodología

6.1 Recolección del material vegetal.

El material vegetal maguey morado (*Rhoeo discolor*) y Planta de Canasta (*Callisia fragrans*) fue colectado en el municipio de Tuxtla Gutiérrez del estado de Chiapas, la muestra colectada fue trasladada al laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez Chiapas donde fueron lavadas cortadas y expuestas a un secado por calor en un secador solar en un periodo de 4y 5 días para posteriormente trasladar el material vegetal seco a envases de color ámbar, donde fueron almacenados hasta su uso.

6.2 Obtención de extracto

6.2.1 Metanólicos

Se pesaron 20 g hojas pulverizadas, los cuales se colocaron envaso de precipitados de 1 Lt, al cual se le adicionaron 450 mL de metanol al 100%, fue sometido a sonicación durante 2 h a temperatura ambiente, se filtró con papel Whatman No. 1 y posteriormente se colocó el extracto en tubos falcon de 50 ml, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se evaporó a vacío en un rota vapor, a una temperatura de 45 °C. El residuo se re-suspendió en 15 mL de metanol y se almacenó a -20°C hasta su uso en un frasco ámbar.

6.3 Determinación de la composición fitoquímica de los extractos acuosos y metanólicos.

6.3.1 Análisis cualitativo.

Las pruebas cualitativas para determinar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de *Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor*, se realizaron por cromatografía en capa fina (CCF); empleando como fase estacionaria, placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (marca Merck) de 10 x 20 cm y como fase móvil el sistema de solventes cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) para el extracto metanólico.

6.3.1.1 Flavonoides.

Se aplicó 5 µL de cada extracto y de los estándares en la placa de gel de sílice, posteriormente la placa se colocó en una cámara para cromatografía en capa fina (CCF) previamente saturada durante 45 minutos con 10 ml de el sistema de solventes cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1), Debido a que todos los flavonoides tienen la capacidad de causar fluorescencia amarilla, azul o verde dependiendo de la estructura que posean, la placa desarrollada fue revelada con el reactivo citrobórico, se calentó a 100°C en estufa durante 5 minutos y se visualizó en una lámpara fluorescente de luz ultravioleta de onda corta.

6.3.1.2 Taninos

Para realizar la siguiente determinación se colocaron 5 µL de extracto correspondiente sobre la placa de gel de sílice, las soluciones en la fase móvil utilizada para el desarrollo de la cromatografía fueron cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) para ambas placas (*Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor*), Una vez desarrolladas las placas se rociaron con reactivo Vainillina al 5% en HCl. Se revelaron zonas que muestran una coloración roja o roja púrpura lo cual nos indica la presencia de taninos y/o flavanonas.

8.3.1.3 Cumarinas.

Se colocaron 5 µL de cada uno de los extractos sobre la placa de gel de sílice y se desarrolló la CCF en una cámara vertical previamente saturada con los sistemas de solventes cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) para ambas placas (*Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor*), Las placas desarrolladas fue revelada con una solución de KOH al 5% en etanol. La aparición de zonas con fluorescencia azul revelará la presencia de cumarinas (Wagner et al., 1996).

6.3.1.4 Saponinas

Para la identificación de saponinas, el estándar fue diosgenina. Las placas se desarrollaron en una cámara vertical previamente saturada con los sistemas de solventes compuestos por cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) para ambas placas (*Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor*). Las placas fueron reveladas con el reactivo de vainillina-ácido sulfúrico: primero se rociaron los cromatófolios con una solución de ácido sulfúrico al 5% en etanol y luego con una solución de vainillina al 1 % en etanol, posteriormente se calentó a 110°C por 10 min. La presencia de saponinas en las muestras es positiva si se observan zonas azules o verdes (saponinas esteroidales) y violetas (triterpenoides).

6.3.1.5 Alcaloides

Para las pruebas en CCF, los sistemas de solventes utilizados fueron cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) para ambas placas (*Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor*) las placas se revelaron con el reactivo de Dragendorff. La presencia de alcaloides es positiva si se observan manchas de color naranja en las placas.

6.3.2 Análisis cuantitativo

6.3.2.1 Fenoles totales (método colorimétrico de Folin- Ciocalteu)

La concentración de fenoles totales fue determinada por el reactivo Folin-Ciocalteu, para ello se realizó una curva patrón con las siguientes concentraciones de ácido gálico: 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 ppm.

En tubos de ensayo se agregaron 0.05 ml (5 μ l) de cada concentración de ácido gálico, luego se agregaron 2.1 ml de agua destilada, se agregaron 0.25 ml (250 μ l) de reactivo de Folin – Ciocalteu, se agitaron los tubos durante 1 minuto en un vortex, posteriormente se añadió 0.5 ml (500 μ l) de solución de carbonato de sodio al 20%, nuevamente se agregan 2.1 ml de agua destilada y se dejaron reposar por dos horas en la oscuridad, transcurrido el tiempo se midieron absorbancias a 765 nm. Para realizar el blanco se añadieron 50 μ l de agua destilada en lugar de la solución de ácido gálico. Se realizaron pruebas por triplicado. Para cuantificar el extracto únicamente se agregaron 50 μ l de los extractos con una disolución 1:50, en lugar del ácido gálico lo demás se realizó de la misma manera. Las pruebas se realizaron por triplicado.

6.3.2.2 Flavonoides (método colorimétrico cloruro de aluminio).

Se realizó una solución patrón de quercetina, la cual se elaboró de la siguiente manera: se disolvieron 10 mg de quercetina al 80% en agua destilada y se obtuvieron las concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 μ g \cdot mL⁻¹ a partir de esta solución y etanol al 80%.

Se agregaron en un tubo de ensayo 0.5 mL de solución de quercetina, se le adiciono 1.5 mL de etanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. Posteriormente se incubo a temperatura ambiente por 30 min y se midió la absorbancia de la mezcla reaccionante a 415 nm. Para el blanco, la cantidad de quercetina 0.5 mL se sustituyó por la misma cantidad de agua destilada y se añadieron 0.5 mL de etanol al 80%. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Para realizar la cuantificación de los extractos se sustituyó la solución de quercetina por 0.5 mL de extracto (500 µL) en dilución 1:100. Se realizaron las pruebas por triplicado.

6.3.2.3 saponinas totales.

Para esta determinación se preparó una solución patrón de diosgenina a una concentración de 1 mg/ml en cloroformo. Después de la solución patrón se colocaron en tubos de ensayo concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mg/ml, de estos tubos se tomaron 20 µl de solución de diosgenina de cada concentración, posteriormente se evaporó el cloroformo a 70°C, se adicionaron 200 µl de vainillina al 5% y 800 µl de ácido perclórico, se mantuvo a 70°C por 15 minutos para el desarrollo de color y se enfrió a 0°C por 2 minutos, se llevó a 2.5 ml con ácido acético glacial, luego se estabilizó por 30 minutos y se midió la absorbancia a 454 nm. El blanco lleva ácido acético glacial en lugar de solución estándar. Para cuantificar los extractos se agregaron 250 µl de cada extracto en dilución 1:50 en lugar de la solución de diosgenina. Se realizaron las pruebas por triplicado.

6.3.2.4 proantocianidinas (taninos condensados).

Se realizó una solución patrón de catequina de 0.12mg/ml en metanol y a partir de esta se llevaron a concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.11 y 0.12 mg/ml, se tomó 1 ml de cada una de estas concentraciones de solución estándar y se adicionó 2.5 ml de vainillina al 1% en metanol, 2.5 ml de HCl en metanol y se dejó reposar a 35°C por 15 minutos, se tomó la lectura a 500 nm. Para el blanco se adicionó 1 ml de metanol en lugar de solución estándar; para cuantificar los extractos se adicionó 1 ml de cada extracto con una dilución de 1:50 en lugar de la solución estándar. Se realizaron las pruebas por triplicado.

6.3.2.5 cumarinas.

Se utilizó una solución patrón de umbeliferona con una concentración de 0.2 mg/ml en etanol y agua, en concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.1 mg/ml, posteriormente se añadió 500 µl de acetato de plomo al 5%, se aforo a 10 ml con agua destilada posteriormente se centrifugo a 3500 rpm por 10 minutos, luego se transfirió 1 ml de sobrenadante a un tubo de ensayo

y se añadió 4ml de de solución de HCl 0.1 M, se leyó en el espectro a 320 nm, usando un blanco de solución de HCl 0.1 M. para cuantificar los extractos se cambia la solución estándar de umbeliferona por 1 ml de los extractos en dilución 1:30. Se realizaron las pruebas por triplicado.

7. Resultados y Discusión

Cuadro 1. Composición fitoquímica de hojas de *Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor* obtenida por cromatografía en placa fina (CCF).

Componentes	Color	<i>C.fragrans</i>	<i>Rhoeo discolor</i>
Flavonoides	Amarillo y Azul	Presentes	Presentes
Taninos	Rojo	Presentes	Presentes
Cumarinas	Azul o verde	Presentes	Presentes
Saponinas	Azul, verde y violeta	Presentes	Presentes
Alcaloides	Naranja	Presentes en bajas cantidades	Presentes en bajas cantidades

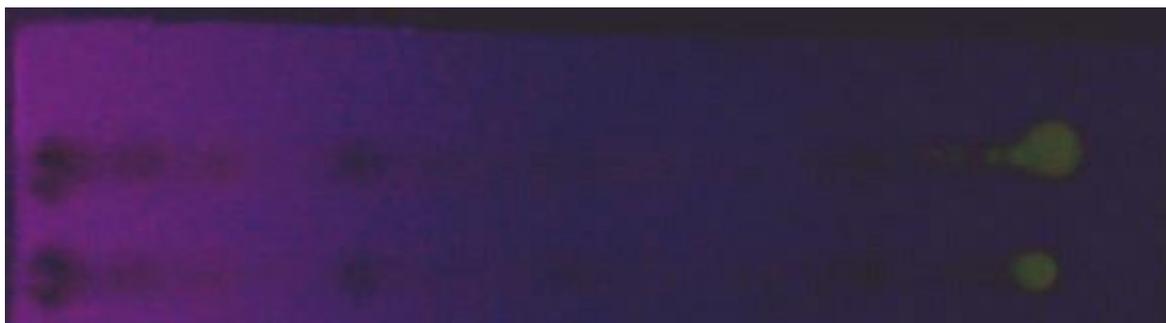


Fig. 6 Los Flavonoides por lo general presentan Fluorescencia azul o verde



Fig. 7 Las zonas rojas nos revelan la presencia de taninos.



Fig. 8 Las zonas con fluorescencia azul nos revela la presencia de cumarinas.



Fig. 9 Las zonas de coloración naranja nos revelan la presencia de alcaloides, la coloración fue demasiado opaca

Para evaluar las hojas secas de *Callisia fragans* y *Rhoeo discolor*, se elaboró una serie de curvas patrón.

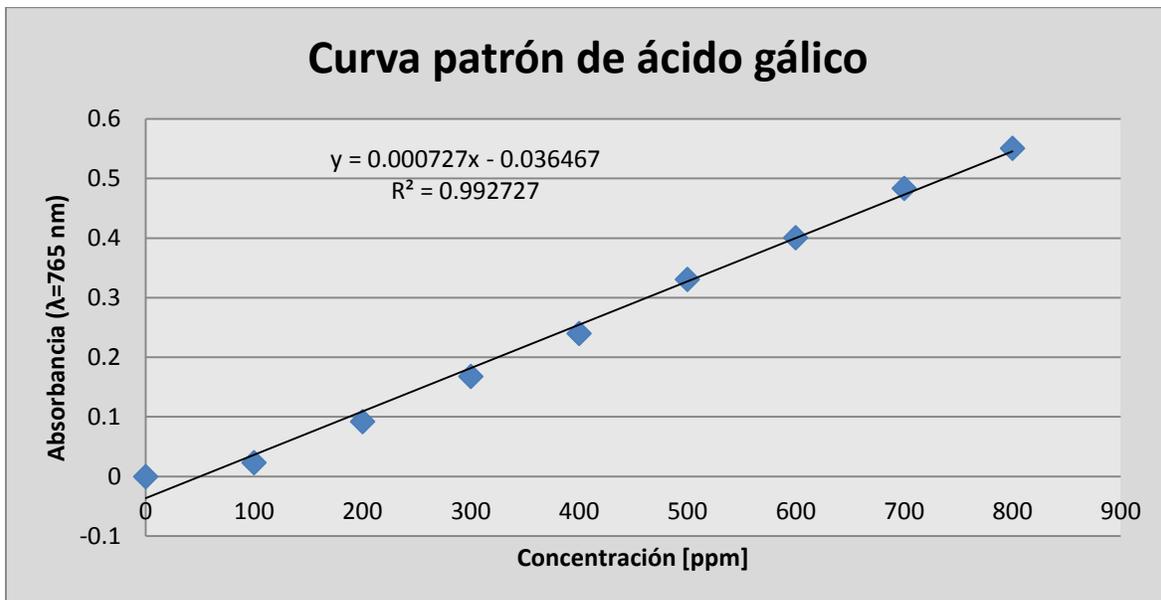


Fig. 10 Curva patrón de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales

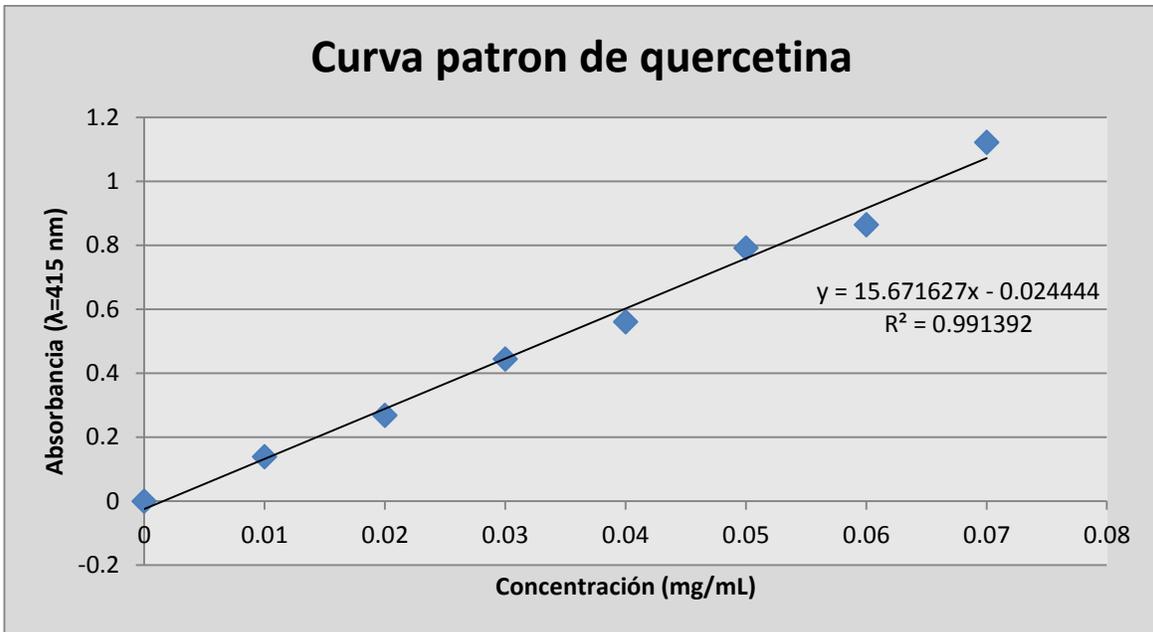


Fig. 11 Curva patrón de quercetina para cuantificación de Flavonoides

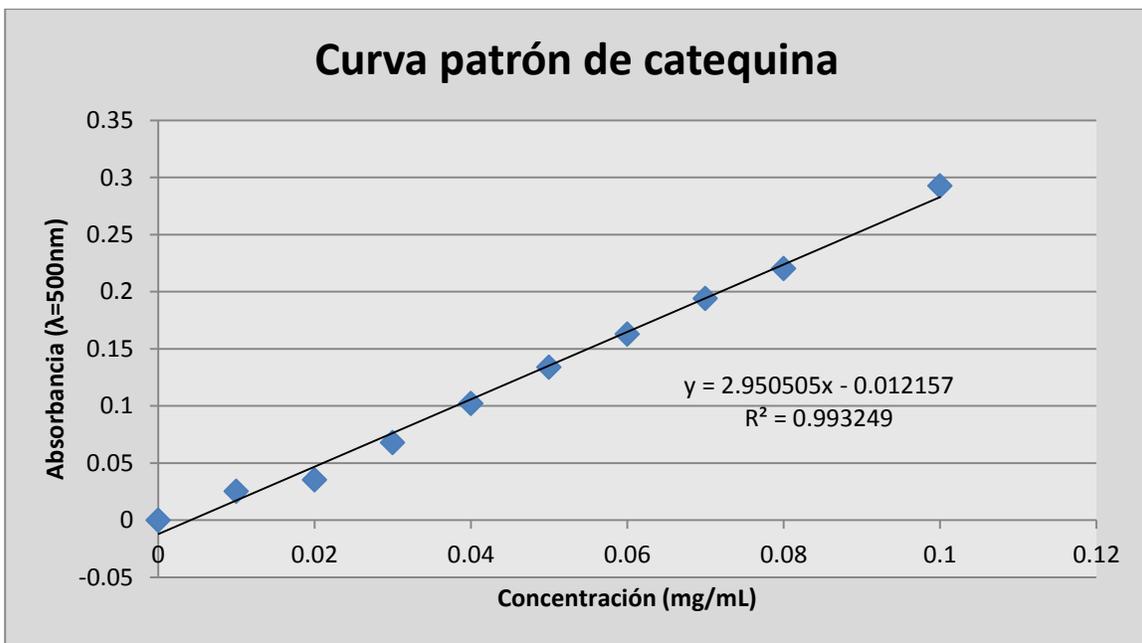


Fig. 12 Curva patrón de catequina para cuantificación de taninos

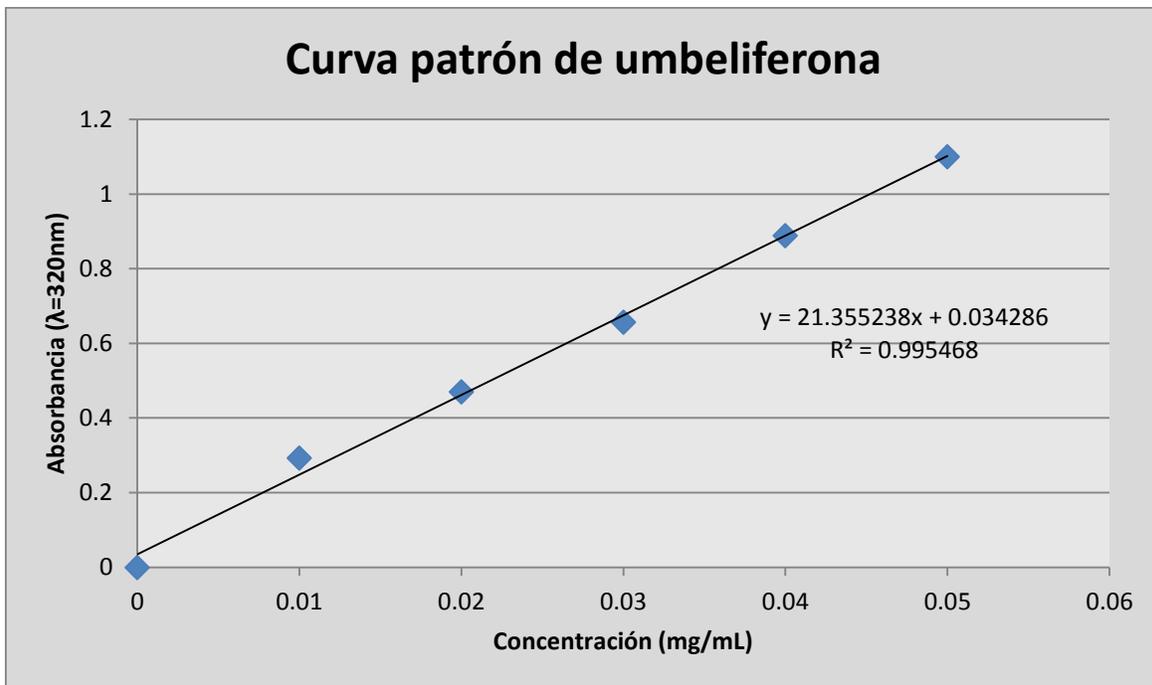


Fig. 13 Curva patrón de umbeliferona para cuantificación de cumarinas

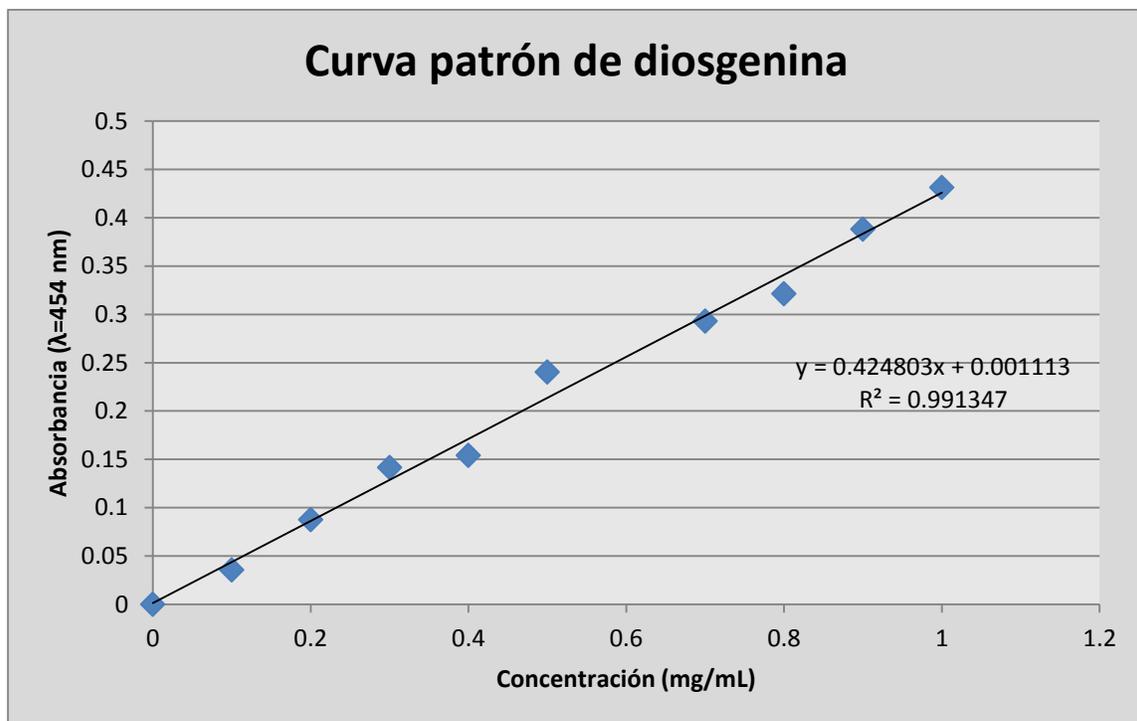


Fig. 14 Curva patrón para cuantificación de saponinas

Cuadro 1 Contenido de Compuestos Fenólicos en *Callisia fragrans*

Compuestos en <i>Callisia fragrans</i>	Extractos Metanólicos
Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de hoja)	3.046 mg/g
Flavonoides (Mg Equivalentes de quercetina / g hoja seca)	0.7139 mg/g
Taninos Condensados (Mg Equivalentes de catequina / g hoja seca)	2.144 mg/g
Cumarinas (Mg Equivalentes de umbeliferona / g hoja seca)	0.511894 mg/g
Saponinas (Mg Equivalentes de diosgenina/ g hoja seca)	6.7515 mg/g

Cuadro 2 Contenido de Compuestos Fenólicos en *Rhoeo discolor*

Compuestos en <i>rhoeo discolor</i>	Extractos Metanólicos
Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de hoja)	2.2574 mg/g
Flavonoides (Mg Equivalentes de quercetina / g hoja seca)	0.672367 mg/g
Taninos Condensados (Mg Equivalentes de catequina / g hoja seca)	1.5921 mg/g
Cumarinas (Mg Equivalentes de umbeliferona / g hoja seca)	0.511894 mg/g
Saponinas (Mg Equivalentes de diosgenina / g hoja seca)	10.3193 mg/g

Los contenidos Metanólicos son parámetros importantes dentro del estudio de las plantas en el mundo, ya que esto nos define el potencial biológico que esta puede aportarnos, las cantidades de extractos metanólicos reportadas nos indican un total de extractos metanólicos de 24.36 mg/g en base seca para hojas de *Atriplex halimus*, (Benhammou, 2009) y 17.84 mg/g en base seca para lechuguilla (*Agave lechuguilla*) (Hernández S., 2005), en comparación con los extractos totales de *Callisia f.* con 13.3 mg/g y *Rhoeo d.* con un total de 15.105 mg/g en base seca.

Los dos compuestos que se encontraron mayoritariamente fueron Taninos y Saponinas, en la tabla siguiente se compara con *Atriplex halimus* la cantidad de saponinas y taninos reportadas.

	<i>Callisia fragrans</i>	<i>Rhoeo discolor</i>	<i>Atriplex halimus</i>
Taninos	2.144 mg/g	1.5921 mg/g	4.75mg/g
Saponinas	6.71 mg/g	10.313 mg/g	7.64 mg/g

Cuadro 3. Comparación de taninos y saponinas en 3 especies distintas

La familia de las comelináceas es una especie endémica del estado de Chiapas, siendo muy común encontrarla en viveros para su venta como planta de ornato, sin embargo el estudio demostró una cantidad considerable de compuestos polifenolicos, lo cual nos sugiere un potencial o una alternativa de uso para su evaluación anti viral, anti oxidante o fungicida.

8. Conclusiones

- Se cuantificaron los extractos metanólicos de *Callisia fragrans* y *Rhoeo discolor* para conocer en que concentración y cantidades se encuentran, para ello se llevó a cabo una técnica de cromatografía en capa fina para identificar los compuestos como así mismo una espectrofotometría para cuantificar los contenidos de dichos compuestos metanólicos.
- El extracto en mayor abundancia dentro de la especie *Callisia fragrans* fueron las saponinas con un total de 6.7515 mg de diosgenina por gramo de hoja
- Se cuantificaron los fenoles totales con un contenido de 3.046 mg del compuesto por gramo de hoja pulverizada de *Callisia fragrans*, siendo este el segundo compuesto más abundante. Los compuestos con menos presencia en el extracto fueron Flavonoides con 0.7139 mg/g y cumarinas, con 0.511894 mg/g respectivamente.
- Para el extracto Metanólico de *rhoeo discolor* se reportó como compuesto más abundante a las Saponinas con un total de 10.3193 mg de compuesto por gramo de hoja pulverizada, así como 2.2574 mg/g para fenoles totales. Dentro de los extractos metanolicos de *rhoeo discolor* el compuesto menos abundante fueron los flavonoides con 0.672367 mg/g.

9. Bibliografía

- Asquith T (2006). Interaction of condensed tannin. Academic Press. 1591-1593
- Avalos A. (2009), Metabolismo secundario en plantas, Reduca (Biología).Serie Fisiología Vegetal. Madrid, 119-145
- Bye R (1999). The role of humans in the diversification of plants in Mexico. New York: Oxford University Press, 50
- Berlin B & Berlin E(1999). Medical ethnobiology of the highland of México. Nueva Jersey:Princeton University Press, 56-59
- Bravo L, Abia R & Saura F (1999). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 81, 1182-1187.
- Castellanos & Espinosa F (2000). Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects a test with sitophilus. Biochemical Systematics and Ecology. 591-602.
- Challenger A (1998). Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México pasado, presente y futuro. México : Mc Graw- Hill, 118-128
- Chang C, Yang M, Wen, H, & Chern, J (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10, 178-182
- Cody V (2002). Plant Flavonoids in biology and medicine. New York: A.R.Liss.
- E. Serna, J.Romero, Lopez A. (2009) Flora del bajío y de regiones adyacentes, Fasiculo 162
- Evans C (2000). Plant polyphenols free radical scavengers or chain-breaking antioxidants. Biochem Society Sym, 103-116
- Fount Q (2001). Plantas Medicinales. España: Labor Barcelona, 315-316.

Gonzalez, R., Reyes, M., Preza, A., Rosales, M., Morales, J., Gallegos, J. (2007). Antioxidant evaluation and chemoprotection of phenolic extracts from apple seeds.

Garcia N. (2009) Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma De Querétaro.

Graham J (2002). Timely Test Spots TB "in hours". New Scientist, 15-21.

Harbertson J (1999). Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wine. Journal Enology Viticultural, 120-128.

Hertog MGL, Hollman P & Putte v (2003). Content of phenolics. Journal Agricultural and Food Chemistry, 41,1242-1246

Idaka E & Yoshiharu O (2000). Structure of Zebrin, A novel acylated anthocyanin isolated from *Zebrina pendula*. Tetrahedron Lett.

Maximino M (2002). Plantas medicinales de México. México: Ediciones Bota, 123-130

Mercado G., Carrillo, A. Díaz, Parrilla (2013) Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México

Murray R (2002). The Natural Coumarins. New York: John Wiley & sons Ltd, 22-25.

Perez G. (2003), Caracterización de compuestos polifenólicos, Universidad Complutense de Madrid, 178-183.

Ramamoorthy T (1998). Mexico diversity, distribution, evolution and endemism. New York: Oxford University Press, 67-75

Regelson & Formica J (2005). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol, 67-80

Valdés, R & Balbín MI (2000). Curso de fisiología y bioquímica vegetal, UNAH. Habana, Cuba: Academic Press, 89-92

W B & Heller W (2003). Flavonoids as antioxidants determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343-355.

10. Anexos

10.1 Curvas patrón.

Fenoles Totales

Se partió de una solución patrón de Ácido gálico de una concentración de 1mg/ml. Para preparar la solución se pesaron 0.05 g o 50 mg de ácido gálico y se aforo a 50 ml con agua destilada, se realizaron diluciones de la siguiente forma para obtener las siguientes concentraciones.

Concentraciones			
Mg/ml	concentración (ppm)	Vol. De Solución patrón(μl)	Vol. De Agua (μl)
0.1	100	200	1800
0.2	200	400	1600
0.3	300	600	1400
0.4	400	800	1200
0.5	500	1000	1000
0.6	600	1200	800
0.7	700	1400	600
0.8	800	1600	400
0.9	900	1800	200
1	1000	2000	0

Flavonoides

Se empleó una solución patrón de quercetina a una concentración de 0.1 mg/ml de la cual se tomaron alícuotas para obtener soluciones a diferentes concentraciones de acuerdo a la siguiente tabla.

Mg/ml	Concentración (µg/ml)	Vol. De Solución patrón (µl)	Vol. Metanol 80%(µl)
0.01	10	200	1800
0.02	20	400	1600
0.03	30	600	1400
0.04	40	800	1200
0.05	50	1000	1000
0.06	60	1200	800
0.07	70	1400	600
0.08	80	1600	400
0.09	90	1800	200
0.1	100	2000	0

Saponinas

Se partió de una solución patrón de diosgenina de una concentración de 1mg/ml.

A 0.1 g de diosgenina, aforar a 10 ml de cloroformo.

$$(200 \text{ ml})(1\text{mg}/1000 \text{ ml})= 0.2 \text{ mg}/ 2 \text{ ml} = 0.1 \text{ mg/ml}$$

Concentración (mg/ml)	Vol. De solución (ml)	Vol. Cloroformo (ml)
0.1	200	1800
0.2	400	1600
0.3	600	1400
0.4	800	1200
0.5	1000	1000
0.6	1200	800
0.7	1400	600
0.8	1600	400
0.9	1800	200
1	2000	0

M= 0.1 g de diosgenina aforar a 10 ml de cloroformo

Taninos

Se partió de una solución patrón de catequina de una concentración de 0.02 mg/ml, de la cual se tomaron alícuotas para realizar soluciones de acuerdo a la siguiente tabla.

Solución estándar de 120 mg/l = 0.12 mg/ml en metanol

1000 ml (0.12 mg/1000 ml)= 0.12 mg/ 6 ml = 0.02 mg/ml

Concentración (mg/ml)	Vol. De solución (µl)	Volumen de Metanol (µl)
0.01	500	5500
0.02	1000	5000
0.03	1500	4500
0.04	2000	4000
0.05	2500	3500
0.06	3000	3000
0.07	3500	2500
0.08	4000	2000
0.09	4500	1500
0.1	5000	1000
0.11	5500	500
0.12	6000	0

Cumarinas.

Se partió de una solución patrón de una concentración de 0.01 mg/ml de umbeliferona, se tomaron alícuotas de acuerdo a la siguiente tabla para llegar a las concentraciones buscadas.

$$(500 \text{ ml}) (0.2 \text{ mg} / 1000 \text{ ml}) = 0.01 \text{ mg} / 1 \text{ ml} = 0.01 \text{ mg/ml}$$

Concentración (mg/ml)	Vol. Solución patrón (ml)	Etanol (ml)
0.01	50	950
0.02	100	900
0.03	150	850
0.04	200	800
0.05	250	750
0.06	300	700
0.07	350	650
0.08	400	600
0.09	450	550
0.1	500	500

10.2 Cálculos para Cuantificación de Compuestos.

Extracto de Maguey morado, Dilución 1:30

Formula

$$\frac{(RE)(FD)}{1000} \left(\frac{vol. extracto}{Muestra\ seca} \right)$$

- Dónde: RE= resultado de la ecuación de la curva patrón.
- FD= factor de dilución

Fenoles Totales (*Rhoeo discolor*)

Usando la Ecuación obtenida en la Curva patrón, partimos hacia un despeje para obtener la formula $X=1428.5714 (Y) + 52.1428$, Sustituyendo en las absorbancias obtenidas por triplicado tenemos que:

$$X_1=1428.5714 (0.037) + 52.1428 = 104.9999 \text{ ppm}$$

$$X_2=1428.5714 (0.032) + 52.1428 = 99.2856 \text{ ppm}$$

$$X_3=1428.5714 (0.030) + 52.1428 = 96.4285 \text{ ppm}$$

Pasamos de ppm a mg/ml de la siguiente manera:

$$104.99 \frac{mg}{l} \left(\frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.1049 \frac{mg}{ml}$$

$$99.28 \frac{mg}{l} \left(\frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.0992 \frac{mg}{ml}$$

$$96.42 \frac{mg}{l} \left(\frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.0964 \frac{mg}{ml}$$

Multiplicamos por nuestra dilución (1:30)

$$0.1040 \frac{mg}{ml} \times 30 = 3.147 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0992 \frac{mg}{ml} \times 30 = 2.9760 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0964 \frac{mg}{ml} \times 30 = 2.907 \frac{mg}{ml}$$

$$3.147 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 2.46 \frac{mg}{g}$$

$$2.976 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 2.232 \frac{mg}{g}$$

$$2.907 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 2.180 \frac{mg}{g}$$

Al final obtenemos el Promedio de los resultados por Triplicado:

$$\text{Fenoles totales en } \textit{Rhoeo discolor}: 2.2474 \frac{mg}{g}$$

Fenoles Totales (*Callisia Fragrans*)

Extracto *Callisia Fragrans*, dilución 1:30

$$X_1 = 1428.5714 (0.063) + 52.1428 = 104.9999 \text{ ppm}$$

$$X_2 = 1428.5714 (0.061) + 52.1428 = 99.2856 \text{ ppm}$$

$$X_3 = 1428.5714 (0.0519) + 52.1428 = 96.4285 \text{ ppm}$$

Pasamos de ppm a mg/ml de la siguiente manera:

$$142.1427 \frac{mg}{l} \left(\frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.1421 \frac{mg}{ml}$$

$$139.28 \frac{mg}{l} \left(\frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.13828 \frac{mg}{ml}$$

$$124.99 \frac{mg}{l} \left(\frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.1249 \frac{mg}{ml}$$

Multiplicamos por nuestra dilución (1:30)

$$0.1421 \frac{mg}{ml} \times 30 = 4.2642 \frac{mg}{ml}$$

$$0.13828 \frac{mg}{ml} \times 30 = 4.14 \frac{mg}{ml}$$

$$0.1249 \frac{mg}{ml} \times 30 = 3.74 \frac{mg}{ml}$$

$$4.2642 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 3.19 \frac{mg}{g}$$

$$4.14 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 3.11 \frac{mg}{g}$$

$$3.74 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 2.81 \frac{mg}{g}$$

Al final obtenemos el Promedio de los resultados por Triplicado:

Fenoles Totales *C. fragrans*: 3.0406 mg/g

Flavonoides (*Rhoeo discolor*)

Dilución 1:30, Absorbancias (0.436), (0.448), (0.446)

$$X_1 = 0.0638 (0.436) + 0.001557 = 0.02938 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.0638 (0.448) + 0.001557 = 0.03020 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.0638 (0.446) + 0.001557 = 0.03007 \frac{mg}{ml}$$

$$0.02938 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.8814 \frac{mg}{ml}$$

$$0.03020 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.906 \frac{mg}{ml}$$

$$0.03007 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.9022 \frac{mg}{ml}$$

$$0.8814 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.6609 \frac{mg}{g}$$

$$0.906 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.6795 \frac{mg}{g}$$

$$0.9022 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.6767 \frac{mg}{g}$$

Flavonoides en *Rhoeo discolor*: $0.6723 \frac{mg}{g}$

Flavonoides (*Callisia fragrans*)

Dilución 1:30, Absorbancias

$$X_1 = 0.0638 (0.471) + 0.001557 = 0.0316 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.0638 (0.495) + 0.001557 = 0.0332 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.0638 (0.448) + 0.001557 = 0.03020 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0316 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.9482 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0332 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.9975 \frac{mg}{ml}$$

$$0.03020 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.9060 \frac{mg}{ml}$$

$$0.9482 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.7115 \frac{mg}{g}$$

$$0.9975 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.7484 \frac{mg}{g}$$

$$0.9060 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.6795 \frac{mg}{g}$$

Flavonoides en *C. fragrans*: 0.7130 $\frac{mg}{g}$

Taninos (Rhoeo discolor)

$$X_1 = 0.3389 (0.076) + 0.004135 = 0.0298 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.3389 (0.076) + 0.004135 = 0.0298 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.3389 (0.075) + 0.004135 = 0.0295 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0298 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.8967 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0298 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.8967 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0295 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.8865 \frac{mg}{ml}$$

$$0.8967 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.6655 \frac{mg}{g}$$

$$0.8967 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.6655 \frac{mg}{g}$$

$$0.8865 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.6649 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 0.6653 \frac{mg}{g}$$

$$X_t = \text{Fenoles} - \text{Taninos} = 2.2574 \frac{mg}{g} - 0.6653 \frac{mg}{g} = 1.5921 \frac{mg}{g}$$

Taninos (*Callisia fragrans*)

$$X_1 = 0.3389 (0.104) + 0.004135 = 0.03938 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.3389 (0.108) + 0.004135 = 0.04073 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.3389 (0.104) + 0.004135 = 0.03938 \frac{mg}{ml}$$

$$0.03938 \frac{mg}{ml} \times 30 = 1.1814 \frac{mg}{ml}$$

$$0.04073 \frac{mg}{ml} \times 30 = 1.22 \frac{mg}{ml}$$

$$0.03938 \frac{mg}{ml} \times 30 = 1.1814 \frac{mg}{ml}$$

$$1.1814 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.886 \frac{mg}{g}$$

$$1.22 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.9165 \frac{mg}{g}$$

$$1.1814 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{20g} \right) = 0.886 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 0.8962 \frac{mg}{g}$$

$$X_t = \text{Fenoles} - \text{Taninos} = 3.0406 \frac{mg}{g} - 0.8962 \frac{mg}{g} = 2.144 \frac{mg}{g}$$

Cumarinas (*Rhoeo discolor*)

$$X_1 = 0.0468 (0.466) - 0.001606 = 0.02020 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.489) - 0.001606 = 0.02127 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.497) - 0.001606 = 0.02165 \frac{mg}{ml}$$

$$0.02020 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.606 \frac{mg}{ml}$$

$$0.02127 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.6381 \frac{mg}{ml}$$

$$0.02165 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.6496 \frac{mg}{ml}$$

$$0.606 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 0.4545 \frac{mg}{g}$$

$$0.6381 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 0.4785 \frac{mg}{g}$$

$$0.6496 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 0.4872 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 0.4734 \frac{mg}{g}$$

Cumarinas (*Callisia fragrans*)

$$X_1 = 0.0468 (0.527) - 0.001606 = 0.02305 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.526) - 0.001606 = 0.023 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.509) - 0.001606 = 0.0222 \frac{mg}{ml}$$

$$0.02305 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.6917 \frac{mg}{ml}$$

$$0.023 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.69032 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0222 \frac{mg}{ml} \times 30 = 0.6664 \frac{mg}{ml}$$

$$0.6917 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 0.5181 \frac{mg}{g}$$

$$0.69032 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 0.5177 \frac{mg}{g}$$

$$0.6664 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 0.4999 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 0.5118 \frac{mg}{g}$$

Saponinas (*Rhoeo discolor*)

$$X_1 = 2.354 (0.174) - 0.002589 = 0.4070 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.204) - 0.002589 = 0.4776 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.210) - 0.002589 = 0.4917 \frac{mg}{ml}$$

$$0.4070 \frac{mg}{ml} \times 30 = 12.21 \frac{mg}{ml}$$

$$0.4776 \frac{mg}{ml} \times 30 = 14.32 \frac{mg}{ml}$$

$$0.4917 \frac{mg}{ml} \times 30 = 14.75 \frac{mg}{ml}$$

$$12.21 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 9.15 \frac{mg}{g}$$

$$14.32 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 10.74 \frac{mg}{g}$$

$$14.75 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 11.06 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 10.3193 \frac{mg}{g}$$

Saponinas (*Callisia Fragrans*)

$$X_1 = 2.354 (0.113) - 0.002589 = 0.2634 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.151) - 0.002589 = 0.3528 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.126) - 0.002589 = 0.2940 \frac{mg}{ml}$$

$$0.2634 \frac{mg}{ml} \times 30 = 7.60 \frac{mg}{ml}$$

$$0.3528 \frac{mg}{ml} \times 30 = 10.58 \frac{mg}{ml}$$

$$0.2940 \frac{mg}{ml} \times 30 = 8.82 \frac{mg}{ml}$$

$$7.60 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 5.7017 \frac{mg}{g}$$

$$10.582 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 7.9 \frac{mg}{g}$$

$$8.82 \frac{mg}{ml} \left(\frac{15ml}{120g} \right) = 6.615 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 6.7515 \frac{mg}{g}$$