

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



CUANTIFICACIÓN DE β -SITOSTEROL Y LUPEOL POR DENSITOMETRÍA ÓPTICA EN FRACCIONES
DE *Ruellia tuberosa* L. Y SU EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN SOBRE EL SISTEMA ENZIMÁTICO
GLUCOSA-6-FOSFATASA

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Br., **Natasha Liduska
Rodríguez Rondón**, para optar al título
de Licenciado en Química, Opción
Tecnología.

Tutores: Dra. María Rodríguez
Dr. Jairo Bermúdez

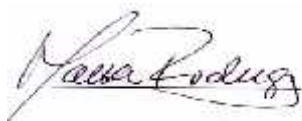
Caracas, Mayo de 2018.

Nosotros, Profesora María Rodríguez y Profesor Jairo Bermúdez, Investigadores del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, certificamos que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“CUANTIFICACIÓN DE β -SITOSTEROL Y LUPEOL POR DENSITOMETRÍA ÓPTICA EN FRACCIONES DE *Ruellia tuberosa* L. Y SU EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN SOBRE EL SISTEMA ENZIMÁTICO GLUCOSA-6-FOSFATASA”

Que presenta la Br. Natasha Liduska Rodríguez Rondón, para aspirar al título de Licenciado en Química, se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Química Orgánica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2013-2018 y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo de 2018.



Dra. María Rodríguez.
(Tutor)



Dr. Jairo Bermúdez
(Tutor).

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

**“CUANTIFICACIÓN DE β -SITOSTEROL Y LUPEOL POR
DENSITOMETRÍA ÓPTICA EN FRACCIONES DE *Ruellia tuberosa* L. Y SU
EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN SOBRE EL SISTEMA ENZIMÁTICO
GLUCOSA-6-FOSFATASA”**

Presentado por la Br. Natasha Liduska Rodríguez Rondón, C.I, V-18.366.329
certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por el Reglamento
vigente de Trabajo Especial de Grado de la Escuela de Química.

Dra. María Rodríguez

(Tutor)

Dr. Jairo Bermúdez

(Tutor)

Dra. Beth Díaz

(Jurado)

Dra. Rosa Amaro

(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, quien me puso en este camino de la Ciencia y me dio la salud y la decisión para culminar esta etapa de mi vida de una manera satisfactoria.

A mi madre María Elena Rondón, por dar todo y más para verme cumplir este sueño de las dos, por ser el pilar de nuestro hogar y mi ejemplo a seguir. También tengo que agradecer a mi padre Antonio Rodríguez quien desde el cielo me cuida y fue el que cultivó las ganas de estudiar una carrera científica. Sencillamente este logro se los debo a ustedes.

A mi familia materna, por siempre tener un cariño enorme hacia mí y creer que podía lograr esta meta, sobre todo a mi tío Baltazar y mi tío Manuel, que son la figura paterna que he tenido desde la partida de mi papá. Los adoro mucho.

A mi tutora de tesis María Rodríguez, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, por sus consejos, paciencia, por el tiempo que dedicó para que este trabajo culminara exitosamente.

A mi otro tutor, Jairo Bermúdez quien fue una pieza clave en la realización y culminación de esta investigación, sin su amistad, apoyo y experiencia hubiera sido muy difícil culminar esta meta. Simplemente gracias por tu apoyo incondicional.

A Adrian Manrique, quien llegó a mi vida para darme determinación para culminar este ciclo y comenzar nuevas metas en mi vida. Gracias por tu apoyo y por creer siempre en mí y recordarme que puedo con este tipo de retos y más.

A todo el equipo de Productos Naturales por ser una segunda familia mientras el trayecto de esta investigación.

A mis amigos de la universidad, Gabriela Marquéz, Daniella Fuentes, Leonardo Prato, Diana Pachón, Orlando Medina, Adhres Martínez, Jose Ignacio González, Ynes Rojas y a todos los demás que hicieron de mi experiencia en esta casa de estudio única, siempre tendrán un espacio importante en mi corazón.

A mis compañeros y jefes de Laboratorios Vargas, quienes también pusieron un granito de arena para

que lograra culminar esta etapa de mi vida. Muchas gracias por su ayuda y consideración.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, tuvo como objetivo cuantificar β -sitosterol y lupeol en las fracciones solubles en metanol-agua e insolubles en acetona de *Ruellia tuberosa* L. por densitometría óptica sobre placas de HPTLC y evaluar la inhibición de estas sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). Para ello, se sometieron a extracción y separación los extractos metanólicos de las partes aéreas (tallos/hojas) y raíces de la planta por separado.

La metodología para la cuantificación de estos compuestos se basó en preparar soluciones de concentraciones conocidas de los extractos de la especie estudiada y patrones, en placas de Cromatografía de Capa Fina de Alta Eficiencia (HPTLC), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como agente de coloración. Luego, se desarrolló cada placa utilizando como fase móvil, la mezcla de solventes más idónea que permitiese la identificación comparativa del metabolito a ser cuantificado. La cuantificación se realizó a través de la digitalización de la imagen en el visible de la placa desarrollada por medio de un escáner. Estas imágenes se analizaron con un programa denominado en este trabajo como UCV-Matlab realizado por el Laboratorio de Espectroscopia Laser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, a través del programa MATLAB 7.5.0., el cual genera densitogramas que permiten relacionar la densidad óptica de cada mancha en la placa con la concentración relativa de un determinado compuesto en el extracto y cuantificar por comparación con una curva de calibración del patrón puro del compuesto que se desea cuantificar.

Los resultados mostraron que las raíces de *Ruellia tuberosa* L., posee $(167,4 \pm 6,8)$ ppm del esteroide, β -sitosterol y $(129,36 \pm 0,69)$ ppm del triterpeno, lupeol. Además, el método de cuantificación desarrollado es preciso ($\%CV < 5\%$), lineal ($R^2 > 0,99$) y con límites de detección de 6,3–31,1 ppm y 13,1–16,3 ppm; y de cuantificación de 21,1–103,5 ppm y 43,7–54,3 ppm. Por otra parte, el método resultó ser simple, económico y rápido, en comparación con otras técnicas cromatográficas.

Adicionalmente, se realizaron estudios de inhibición sobre el sistema glucosa-6-fosfatasa en microsomas intactos, sin histonas (–H), y en microsomas permeabilizados con histonas (+H). Las fracciones que se obtuvieron a partir de los extractos metanólicos de las raíces y partes aéreas de *Ruellia tuberosa* L., presentaron mayor porcentaje de inhibición sobre el sistema enzimático G6Pasa en microsomas intactos, es decir, son inhibidores del transportador T1. Las fracciones pertenecientes a las raíces presentaron mayor porcentaje de inhibición sobre la G6Pasa en comparación con las provenientes

de las partes aéreas. Por otro lado, las fracciones de mayor polaridad mostraron un porcentaje de inhibición considerable (>50% a 400 mg/L), atribuido a los derivados de ácidos fenilpropenoides, detectados por HPLC-UV/Vis. Dicho comportamiento también fue observado en las fracciones polares tanto de raíces como de partes aéreas.

Palabras clave: *Ruellia tuberosa* L., CCFAF, HPTLC, *Ruellia*, sitosterol, Lupeol, Betulina, Densitometría Óptica, Cuantificación, G-6-Pasa, Glucosa-6-Fosfatasa, Inhibición.

RESUMEN.....	i
Lista de abreviaturas	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	xi
Lista de esquemas	xii
1.-INTRODUCCIÓN	1
1.1.-Tipos de cromatografía utilizados como método de separación.	2
1.1.1.-Cromatografía de adsorción.....	2
1.1.2.-Cromatografía de partición.....	4
1.1.3.-Cromatografía en papel.	4
1.1.4.-Cromatografía en capa fina.....	5
1.1.5.-Cromatografía de intercambio iónico.	2
1.1.6.-Cromatografía de gel.	2
1.1.7.-Cromatografía de contracorriente.	2
Uso del UCV-Software.	9
1.2.-Reproducibilidad.	13
1.3.-Linealidad del método.	13
1.4.-Límites de detección y cuantificación.	14
1.5.-Exactitud.....	14
1.6.-Metabolitos aislados de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	15
1.6.1.-Flavonoides.	15
1.6.2.-Quinonas.	15
1.6.3.-Alcaloides.	16
1.6.4.-Terpenos.	16
1.7.-Diabetes Mellitus.....	16
1.8.-Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa).....	17
2.1.- Revisión fitoquímica y farmacológica del género <i>Ruellia</i>	20

2.1.1.- <i>Ruellia brittoniana</i>	21
2.1.2.- <i>Ruellia menthoides</i>	22
2.1.3.- <i>Ruellia patula</i> Jacq.	24
2.1.4.- <i>Ruellia praetermissa</i> Sceinf.ex.Lindau.....	27
2.1.5.- <i>Ruellia prostrata</i> Poir.....	28
2.1.6.- <i>Ruellia rosea</i>	30
2.1.7.- <i>Ruellia tuberosa</i> L.	30
2.1.7.1.-Descripción Botánica:	30
2.1.7.2.- Tipos de metabolitos aislados:.....	32
2.1.7.2.1.-Flavonoides.....	32
2.1.7.2.2.-Quinonas.....	33
2.1.7.2.3.-Alcaloides.....	34
2.1.7.2.4.-Terpenos e hidrocarburos lineales.....	35
2.1.7.2.5. Feniletanoides.....	36
2.2.- Cuantificación de metabolitos secundarios por densitometria optica sobre placas de Cromatografía de Capa Fina de Alta Eficiencia (HPTLC, siglas en inglés).....	37
2.3.- Justificación.....	41
3.-OBJETIVOS.....	42
3.1.-Objetivo general	42
3.2.-Objetivos específicos	42
4.-MÉTODO EXPERIMENTAL	43
4.1.- Materiales.....	43
4.1.1.- Material Vegetal	43
4.1.2.- Solventes y reactivos utilizados en la realización de esta investigación	43
4.1.3.-Reactivos para bioensayos	44
4.2.- Preparación del extracto metanólico.....	44
4.3.- Fraccionamiento propuesto del material vegetal	44

4.4.- Análisis cualitativo del fraccionamiento de las partes aéreas y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.....	50
4.5.- Análisis cuantitativo de los metabolitos existentes en las raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	59
4.5.1.- Preparación de la solución madre de β -sitosterol y lupeol.	59
4.5.2.- Metodología para el desarrollo cromatográfico.....	60
4.5.3.-Metodología para la cuantificación de los metabolitos.	60
4.5.4.- Metodología para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación de desarrollado.....	61
4.5.5.- Determinación de la exactitud del método.....	62
4.5.6.- Cuantificación de lupeol en la fracción RtR-K proveniente del extracto metanólico de las raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.....	63
4.5.7.- Cuantificación de β sistosterol en la fracción RtR-K proveniente del extracto metanólico de las raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.....	67
4.5.8.- Cuantificación de betulina en la fracción RtR-K proveniente del extracto metanólico de las raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.....	71
4.6.- Metodología para la determinación de inhibición sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) de las fracciones y subfracciones del extracto metanólico de las partes aéreas y raíces de la especie <i>Ruellia tuberosa</i> L	74
4.6.1.- Preparación de los microsomas.....	74
4.6.2.- Ensayo general sobre la G6Pasa.	75
4.6.3.- Determinación de proteínas.....	76
4.6.4. Resultados de los ensayos de inhibición de las fracciones y subfracciones del extracto metanólico de las partes aéreas y raíces de la especie <i>Ruellia tuberosa</i> L.	78
5.- CONCLUSIONES	81
6.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

Lista de Abreviaturas

Siglas	Significado
Abs	Absorbancia.
ACN	Acetonitrilo.
AcOEt	Acetato de etilo.
AcOH	Ácido acético.
<i>n</i> -BuOH	1-butanol.
<i>t</i> -BuOMe	<i>tert</i> -Butilmetiléter.
C	Grados centígrados.
CC	Cromatografía en columna.
CHCl ₃	Cloroformo.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
DM	Diabetes mellitus.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
EDTA	Etilendiamintetraacetato.
EtOH	Etanol.
<i>F</i>	Flujo, caudal.
g	Gramos.
G	Glucosa.
GLB	Glibencamida.
Gli	Glicósido.
Glu	Glucopiranososa.
G6P	Glucosa-6-fosfato.
G6Pasa	Glucosa-6-Fosfatasa.
h	Horas.
Hex	1-hexano.
HCl	Ácido clorhídrico
HCO ₂ H	Ácido fórmico.
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico.
+H	Con histonas.
-H	Sin histonas.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria para la mitad de población estudiada, por sus siglas en inglés, Inhibitory Concentration.
IDDM	Diabetes tipo-1.
IR	Infrarrojo.
HEPES	Ácido [N-(2-hidroxietil)-piperazin- <i>N'</i> -2(2-etil)]-sulfónico, por sus siglas en inglés, 4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonic Acid.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno, agua oxigenada.
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento, por sus siglas en inglés, High-Performace Liquid Chromatography.
K _D	Coeficiente de distribución.
Kg	Kilogramo.
M	Molar.

Siglas	Significado
MeOH	Metanol.
MeOD- d_4	Metanol deuterado.
mg	Miligramos.
min	Minutos.
mL	Mililitros.
mL/min	Mililitros por minutos.
mM	Milimolar.
NA	No-asignado.
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
ND	No-determinado.
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio.
NIDDM	Diabetes tipo-2.
nm	Nanometros.
Pi	Fosfato inorgánico.
POD	Enzima peroxidada.
PP	Células que secretan al polipéptido pancreático.
PPi	Pirofosfato inorgánico.
ppm	Partes por millón.
RE	Retículo endoplasmático.
Rf	Factor de retención.
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear del isótopo de carbono-trece.
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear del isótopo de hidrógeno-uno.
rpm	Revoluciones por minuto.
Rs	Resolución cromatográfica.
Rt	<i>Ruellia tuberosa</i> L., partes aéreas.
RtX	Fracciones de las partes aéreas de <i>R. tuberosa</i> L., X = A, B, C, D, etc.
RtR	<i>Ruellia tuberosa</i> L., raíces.
RtR-X	Fracciones de las raíces de <i>R. tuberosa</i> L., X = A, B, C, D, etc.
s	Segundos.
s	Singlete.
SDS	Dodecil sulfato de sodio, por sus siglas en inglés, Dodecyl Sulfate, Sodium salt.
SGLT1	Co-transportador de Na ⁺ -glucosa, por sus siglas en inglés, Sodium Glucose Transport-1.
SP	Proteína estabilizadora, por sus siglas en inglés, Stability Protein.
STZ	Estreptozotocina, por sus siglas en inglés, Streptozotocin.
SUC	Sub-unidad catalítica del sistema enzimático G6Pasa.
T	Temperatura.
t	Tiempo.
T1	Transportador de G6P hacia el lumen del RE.
T2	Transportador de G fuera del lumen del RE.
T3	Transportador de Pi fuera del lumen del RE.
TFA	Ácido trifluoroacético, por sus siglas en inglés, Trifluoroacetic Acid.
THF	Tetrahidrofurano.

Siglas	Significado
UV	Ultravioleta.
UV-Vis.	Detector de ultravioleta en el visible.
α	- En términos biológicos: Células que secretan glucagon. - En términos cromatográficos: Factor de selectividad. - En términos químicos: Disposición espacial de un enlace químico.
β	- En términos biológicos: Células que secretan insulina. - En términos químicos: Disposición espacial de un enlace químico.
δ	- En términos biológicos: Células que secretan somastatina. - En términos espectroscópicos: desplazamiento químico.
μ	Micro.
λ	Longitud de onda.
%	Porcentaje.

Lista de figuras

Nº	Título	Pág.,
1	Modelo de las placas empleadas para la cuantificación de los metabolitos estudiados	11
2	Montaje experimental para la captura de las imágenes con la cámara fotográfica	11
3	Captura de pantalla del UCV-Software al cargar la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF	13
4	Captura de pantalla de la selección del fondo en la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF	14
5	Captura de pantalla de la selección del perfil de la muestra y patrones de la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF	14
6	Captura de pantalla del densitograma generado por el UCV-Software de la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF	15
7	Densitogramas de las soluciones metanólicas de <i>Saraca asoca</i> (A) y de (+)-catequina (B) publicado por Rathe y col. 2010.	15
8	Captura de pantalla de la ventana que muestra el área de los picos del densitograma de la imagen en blanco y negro sin invertir de una placa de cuantificación de un análisis de CCF	16
9	Diagrama esquemático del metabolismo de la glucosa hepática	23
10	Hexaacetato del glicósido 2-O- α -D-galactopiranosilglicerol	26
11	α -etilgalactosa	27
12	Compuestos aislados de la fracción de acetato de etilo <i>Ruellia brittoniana</i>	27

13	1,8-Cineol	28
14	(S)-(-)-Alcanfor	28
15	β -sitosterol	30
16	Lupeol	30
17	Apigenina-7-O-rutinosido	30
18	Rupasido y lioniresinol-9-O- β -D-glucopiranosido	31
19	S-5,5-dimetoxi-larici-resinol-9-O- β -D-glicopiranosido	31
20	α -etilgalactosa	32
21	β -D-fructuosa	32
22	β -D-Glucosa	32
23	Luteolina	34
24	Apigenina	34
25	Taxifilina	34
26	Ácido 8-epi-deoxilogánico	34
27	Stigmasterol	36
28	24-metilcolesterol	36
29	Colesterol	36
30	Brassicasterol	36
31	7-glucósido luteolina	36
32	7-glucorónido apigenina	36
33	7-glucósido apigenina	36
34	Tetrametilputrescina	37
35	<i>Ruellia tuberosa</i> L	38
36	Compuestos de tipo flavonoides reportados para <i>Ruellia tuberosa</i> L.	39
37	Apigenina-7-O-D-glucuronido	40
38	Malvidin-3,5-diglucopiranosido (antocianina)	40
39	2,6-dimetoxiquinona	41
40	cartamona (quinona -C15)	41
41	Tylocebrina	42
42	Indol-3-carboxaldehído	42
43	21-metildammaran-22-en-3 β ,18,27-triol	43
44	Betulina	43
45	Campesterol	43
46	<i>n</i> -triacontano	43

47	Triacontan-6-ona	44
48	5-hidroxitetracontan-9-ona	44
49	Compuestos feniletanóides encontrados en <i>R. tuberosa</i>	44
50	Primera huella de izquierda a derecha pertenece al extracto de éter de petróleo	45
51	Fotografía de las placas a) <i>Crataegus oxycantha</i> , b) <i>Echinacea purpurea</i> , c) <i>Hydrastis canadensis</i>	48
52	Cromatogramas de HPLC del extracto metanólico Rt y la fracción RtJ	58
53	Placa de CCF en donde se evidencia la separación de las fracciones RtQ y RtS	60
54	Cromatograma HPLC comparativo de RtS y RtQ y espectros de UV de los compuestos en las fracciones	61
55	Cromatograma HPLC de las fracciones polifenólicas (RtS _{ac}) y terpenoidal (RtS _{org}) provenientes de RtS, así como los espectros UV-Vis de los distintos picos cromatográficos	63
56	Cromatogramas HPLC comparativo para las fracciones RtS _{ac} y RtQ _{ac} ; enriquecidas en polifenoles.	64
57	Placa de CCF en donde se identificaron los compuestos existentes en mayor proporción en la fracción RtR-K.	66
58	Cromatograma por HPLC-sistema-1 donde fracciones provenientes de las raíces de <i>R. tuberosa</i> L. (Esquema 4.5, pág. 81) $\lambda = 330\text{nm}$ a) RtR-Nac, RtR-Norg; b) RtR-Mac, RtR-Nac.	68
59	Modelo de placa a emplear para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación desarrollado	71
60	Placas cromatográficas utilizadas en la cuantificación de lupeol en la fracción RtR-K de (378 ± 4) ppm. 1) RtR-K; 2), 3) y 4) [Lupeol] de 51,9; 105 y 211 ppm, respectivamente	74
61	Placas cromatográficas utilizadas en la cuantificación de β -sitosterol en la fracción RtR-K de (1000 ± 7) ppm. 1) RtR-K; 2), 3), 4) y 5) [β -sitosterol] de 31,5; 62,6; 125 y 250 ppm, respectivamente.	78
62	Placas cromatográficas utilizadas en la cuantificación de lupeol, β -sitosterol y betulina en la fracción RtR-K de (1000 ± 7) ppm.	82

Lista de tablas

N°	Título	Pág.,
2.1	Aceites esenciales encontrados en <i>Ruellia menthoides</i> , cromatografía de gases	29
2.2	Resultados del análisis estadístico del método HPTLC	46
4.1	Disoluciones madres utilizadas en la cuantificación de lupeol y β -sitosterol por densitometría óptica en la fracción RtR-K.	68
4.2	Exactitud del método de cuantificación desarrollado.	72
4.3	Exactitud reportada por otros autores en sus investigaciones sobre CCFAE	72
4.4	Concentración de los patrones empleados en la curva de calibración para la determinación de lupeol y β -sitosterol, usando alícuotas de sus respectivas soluciones madres reportadas en la tabla 4.1	73
4.5	Áreas de los patrones de lupeol y la solución de RtR-K de (378 ± 4) ppm para la cuantificación de lupeol por densitometría óptica.	74
4.6	Determinación de la concentración de lupeol (mgL^{-1}) en una solución de RtR-K de (378 ± 4) ppm.	75
4.7	Determinación del contenido porcentual de lupeol (%) en una solución de RtR-K de (378 ± 4) ppm.	75
4.8	Límites de detección y cuantificación de lupeol en RtR-K.	76
4.9	Áreas de los patrones de β -sitosterol y la solución de RtR-K de (1000 ± 7) ppm para la cuantificación de β -sitosterol por densitometría óptica.	77
4.10	Determinación de la concentración de β -sitosterol (mgL^{-1}) en una solución de RtR-K de (1000 ± 7) ppm.	79
4.11	Determinación del contenido porcentual de β -sitosterol (%) en una solución de RtR-K de (1000 ± 7) ppm.	79
4.12	Límites de detección y cuantificación de β -sitosterol en RtR-K.	80
4.13	Áreas obtenidas por densitometría óptica en la muestra RtR-K de (1000 ± 7) ppm para la cuantificación porcentual de cada valor de R_f mostrado en la figura 63	82
4.14	Composición porcentual calculada en la muestra RtR-K de (1000 ± 7) ppm para cada valor de R_f mostrado en la figura 63	82
4.15	Inhibición de G6Pasa de las fracciones de <i>Ruellia tuberosa</i> L a 400 ppm.	88

Lista de esquemas

N°	Título	Pág.,
4.1	Fraccionamiento del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Ruellia tuberosa</i> L	54
4.2	Fraccionamiento del extracto metanólico de las raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L	55
4.3	Fraccionamiento de la Fracción RtR-C de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	56
4.4	Fraccionamiento del extracto de metanólico de las raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	57
4.5	Fraccionamiento detallado de la fracción RtR-L de las raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	66
4.6	Procedimiento para el aislamiento de los Microsomas.	84
4.7	Ensayo general de inhibición sobre la enzima G6Pasa.	86
4.8	Procedimiento para la cuantificación de proteínas.	87

1.-INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, las plantas han proporcionado recursos medicinales a la humanidad. Hasta el momento, el hombre solo ha podido identificar poco más de 20.000 especies de plantas con importancia medicinal de las aproximadamente 600.000 especies de plantas que habitan en nuestro planeta. Finalizando el siglo diecinueve, los fármacos provenientes de las plantas monopolizaban la terapéutica de la época. Hoy en día, se confía menos en las plantas medicinales, muchas de las cuales han sido descartadas por profesionales de la medicina porque es posible conseguir el principio o principios activos en formulaciones purificadas o de origen sintético. La estrategia de aislar los principios activos de las plantas y luego la fabricación de un procedimiento farmacológico se convirtió en algo popular^[1]. Luego del conocimiento de las estructuras químicas de algunos principios activos, se realizaron numerosos intentos por sintetizarlos. Así, las moléculas de productos naturales fueron usadas como plantillas base para el desarrollo de agentes terapéuticos clínicos. En el presente, muchas plantas son utilizadas en la medicina occidental, siendo un cuarto de los ingredientes de las prescripciones dadas. Las drogas derivadas de plantas utilizadas actualmente contienen alcaloides, antraquinonas, iridoides, lignanos, terpenoides, entre otros muchos tipos de compuestos.^[1] Vale la pena acotar que la mayoría de estos compuestos naturales siguen siendo aislados de plantas, puesto que sintetizarlos no siempre es viable económicamente.^[1]

Para realizar estas formulaciones, se realizan procesos de extracción y fraccionamiento de la planta. Dependiendo de los objetivos que se deseen, varía el método de aislamiento; si se persigue el aislamiento de materiales sensibles al calor, deberán emplearse métodos fríos de extracción y purificación, pero si el trabajo va dirigido al aislamiento de sustancias para la comprobación de actividad biológica, la extracción del material vegetal debe ser en agua o con solución isotónica (0,9% NaCl) y evitarse cualquier elevación de la temperatura.^[2]

De los métodos más empleados, tanto para la separación como para la purificación de los extractos y finalmente de los compuestos, la cromatografía tiene lugar prioritario. Asimismo, es utilizada como monitor de las estrategias de aislamiento en su variante analítica.^[2]

1.1.-Tipos de cromatografía utilizados como método de separación.

1.1.1.-Cromatografía de intercambio iónico.

Un intercambiador es un material insoluble en agua que tiene grupos funcionales capaces de intercambiar iones de carga similar de la solución circundante. Hay materiales sintéticos y naturales, orgánicos e inorgánicos; entre estos últimos se encuentran zeolitas, óxidos y fosfatos de metales del grupo IV. El proceso es un simple equilibrio ácido-base, donde la reversibilidad depende de la concentración y de la fuerza de los iones.^[2]

1.1.2.-Cromatografía de gel.

El principio de esta técnica es la separación de las moléculas por su tamaño y forma. Tiene su principal aplicación en el estudio de polímeros, pues cubre un amplio rango de peso molecular. Se conoce a veces como filtración de gel; los geles que se usan como material filtrante tienen poros y canales y sólo serán retenidas dentro de éstos las moléculas cuyo peso molecular tenga hasta un cierto valor, aquellas mayores pasarán.^[2]

1.1.3.-Cromatografía de contracorriente.

Es un método líquido-líquido, sin fases sólidas, esta técnica se basa en la partición de una mezcla de sustancias en un sistema de solventes inmiscibles, para obtener la separación. Este tipo de cromatografía tiene un gran número ventajas sobre los métodos tradicionales de separación líquido-sólido:

- no existe adsorción irreversible,
- recuperación de la inyección total de la mezcla,
- bajo consumo de solventes,
- bajo riesgo de desnaturalización de la mezcla,

- económicamente favorable ya que no requiere columnas costosas y los solventes son los usados comúnmente,
- otra ventaja de la cromatografía en contracorriente es la habilidad para revertir la dirección del flujo e intercambiar las fases móvil y estacionaria (lo que llamamos fase reversa).

Esta técnica es una excelente alternativa para solucionar los problemas asociados con los adsorbentes usados en la fase sólida y preservar la integridad química de las mezclas sujetas a fraccionamiento. Con estas ventajas la cromatografía en contra-corriente es popular para la purificación de productos naturales, y especialmente en el fraccionamiento de compuestos aislados de las plantas que se someten a bioensayos.^[2]

El tipo de cromatografía más utilizada para el aislamiento y purificación de compuestos es la de adsorción, la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasa por la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consiguiente separación dependen de la capacidad de los átomos que se encuentran en la superficie para remover los solutos de la fase móvil y adsorberlos de manera temporal por medio de fuerzas electrostáticas.^[3] Este tipo de cromatografía se realiza, principalmente, a través de dos modalidades; en columna o en capa fina. La diferencia se encuentra en la forma de soportar el adsorbente; en la cromatografía en columna la fase estacionaria se introduce en un tubo o columna (generalmente de vidrio), mientras que en la cromatografía de capa fina el adsorbente se deposita en forma de capa delgada sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico.^[4]

1.1.4.-Cromatografía de adsorción.

En esta técnica la distribución tiene lugar entre un adsorbente sólido (fase estacionaria) y un eluyente líquido (fase móvil) en la cromatografía líquida, o entre un adsorbente sólido o líquido y un eluyente gaseoso, en el caso de la cromatografía de gases. Dependiendo de la naturaleza del adsorbente la técnica puede ser en fase normal o reversa. Entre los tipos de adsorbentes más usados se tiene: ^[2]

- **Sílica gel:** destinado para separar compuestos no polares o poco polares.
- **Alúmina (óxido de aluminio):** para compuestos menos polares, tiene mayor poder de adsorción, y permite a veces separar isómeros.
- **Silicato de magnesio:** adsorbancia intermedia, para separar lípidos, glicósidos, azúcares.

- **Carbón activado:** de naturaleza no polar, generalmente se usa mezclado en una relación 1:1 con celita y separa azúcares, polifenoles y poliaromáticos.
- **Poliamida:** usada para compuestos que pueden formar puentes de hidrógeno, tales como aminoácidos y polihidroxilicos.
- **RP-8 y RP-18:** el término RP se refiere a fase reversa (Reversed Phase), el adsorbente es un derivado de la sílica gel donde los enlaces SiOH han sido modificado a SiOR, siendo R una cadena carbonada de 8 ó 18 átomos de carbonos. Es útil para separar compuestos polares de los menos polares, ya que estos últimos quedaran más fácilmente retenidos en el adsorbente.^[2]

1.1.5.-Cromatografía de partición.

Es fundamentalmente una distribución entre dos líquidos: fase móvil y fase estacionaria y esta última puede o no estar anclada sobre un soporte sólido. Dependiendo de la naturaleza apolar o polar de la fase estacionaria, la cromatografía de partición puede ser tratada como fase normal o de fase reversa, respectivamente.^[2]

1.1.6.-Cromatografía en papel.

En esta técnica la muestra a separar es adsorbida sobre el punto de aplicación del soporte: papel, el cual retiene el agua (fase estacionaria), pero se puede saturar con otra fase estacionaria. Y en aquellos casos donde la muestra se disuelve mucho mejor en solventes no polares que polares, el soporte se impregna con la fase orgánica (fase estacionaria) y el cromatograma se desarrolla con la fase acuosa.^[2]

Para la detección de los componentes en el cromatograma, existen muchos reactivos específicos, y aquí solo se indicaran los más generales que son utilizados:^[2]

Ácidos carboxílicos: solución de indicadores, azul de bromofenol, verde de bromocresol.

Fenoles y flavonoides: cloruro férrico 0,1%; ácido pícrico en etanol al 1%, (después de secar se rocía con una solución al 5% de KOH en etanol al 80%) y anisaldehído-ácido sulfúrico

Azúcares: *p*-anisidina en butanol húmedo al 3%, seguido de calentamiento.

Terpenos y esteroides: solución saturada de pentacloruro de antimonio en cloroformo y vainillina-ácido sulfúrico.

Aminoácidos y péptidos: ninhidrina al 0,1%; 8-hidroxiquinolina en acetona.

Alcaloides: reactivo de Dragendorff; ácido yodoplatínico.^[2]

1.1.7.-Cromatografía en capa fina.

Es una variante de la cromatografía en columna o en papel, por lo que se aplican los mismos principios. Tiene como ventaja la rapidez del desarrollo y la versatilidad de las operaciones que sobre el estrato fino puede hacerse. La fase fija se adhiere a una placa rígida, generalmente de vidrio, aluminio o plástico. El espesor normal del estrato de absorbente es de 0,1-0,2mm.^[2]

Básicamente, la cromatografía en capa fina se realiza de la siguiente manera: una pequeña alícuota de la muestra se coloca cerca de un extremo de la placa en fase estacionaria, compuesta por una fina capa de adsorbente, para formar la zona inicial. La muestra se seca. El extremo de la fase estacionaria con la zona inicial se coloca en la fase móvil evitando que ésta toque la muestra, por lo general una mezcla de dos a cuatro disolventes puros, dentro de un recipiente cerrado. Si la fase estacionaria y la fase móvil fueron elegidas correctamente, los componentes de la mezcla van a migrar a diferentes velocidades durante el movimiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria. A través de lo que se llama desarrollo cromatográfico. Cuando la fase móvil se ha desplazado una distancia apropiada, la placa con la fase estacionaria es removida de la fase móvil la cual se seca rápidamente, y las zonas se detectan en luz visible o con luz ultravioleta (UV 254 y 365 nm) con o sin la aplicación de un reactivo de revelado.^[5]

Generalmente, se utilizan placas de CCF que contienen un indicador fluorescente que permiten la detección con luz ultravioleta de longitud de onda de 254nm.^[6] Al incidir la radiación UV en este tipo de placas, se observa una fluorescencia verde, mientras que las zonas que contienen la muestra presentan tonalidades oscuras, debido a que las moléculas de la muestra absorben la luz impidiendo su llegada al indicador. A medida que la concentración de la muestra aumenta, más oscura es la zona en la que se encuentra.^[7]

Este tipo de técnica posee la capacidad de analizar varias muestras en paralelo y permite una mayor flexibilidad y simplicidad en la evaluación de la muestra debido a la posibilidad de detección secuencial mediante técnicas complementarias, derivatización post-cromatográfica para la identificación y cuantificación, archivo de una separación para su evaluación en un momento posterior, y a la accesibilidad de la muestra debido al formato en plano. Además, la CCF es una técnica ampliamente utilizada como un método rentable para el análisis rápido de mezclas simples.^[8]

La CCF (TLC por sus siglas en Inglés) se utiliza a menudo como método cualitativo. Con esta se puede determinar el número de componentes en una mezcla, verificar la identidad de sustancias, monitorear el progreso de una reacción o determinar la eficacia de una purificación. La identificación de compuestos en CCF se basa inicialmente en una comparación con los valores de R_f (factor de retención) de patrones de referencia.^[5] Este factor es el cociente de la distancia de la zona de la muestra (Z_s) entre la distancia recorrida por la fase móvil (Z_f), medidas desde la zona de aplicación y se determina por la ecuación 1.^[6]

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_f} \quad 1.6$$

Los análisis cuantitativos por CCF son típicos de la CCFAE (CCF de alta eficiencia). Las placas de CCFAE poseen partículas más finas que las placas habituales de CCF y, en consecuencia, son más adecuadas para análisis cuantitativos. Sin embargo, son más costosas. Las muestras en CCFAE son sembradas en las placas utilizando aplicadores mecánicos (dosímetros) y analizadas con equipos automáticos, tales como un escáner de CCF.^[7]

Una de las técnicas empleadas para la evaluación cuantitativa por CCF es la densitometría, usualmente realizada con escáneres para CCF. Esta técnica permite medir la cantidad de radiación absorbida (o densidad óptica), ya sea visible, ultravioleta o fluorescente, directamente sobre la placa. La diferencia entre la densidad óptica de las zonas con muestra y de las zonas sin muestra en la placa, se relaciona con la concentración de los estándares por medio de una curva de calibración. Como regla general, la muestra y los estándares deben estar en condiciones similares, es decir, en la misma placa cromatográfica. El método ofrece una alternativa para un análisis más simple y económico que otras

técnicas cromatográficas. Además permite realizar el análisis de los componentes directamente en las placas, sin tener que recurrir a la elución o al raspado.^[8]

Aun así, los equipos para análisis cuantitativos por CCF son costosos. Por ejemplo, un CAMAG's TLC Scanner 3 cuesta alrededor de 30.000 dólares con el software necesario para el trabajo analítico. El sistema de documentación, Digistore 2, de CAMAG cuesta 17.500 dólares pero necesita el software Videoscan (6.300 dólares) para realizar el análisis. Este equipo cubre una necesidad específica en el mercado de los sistemas orientados a la producción (principalmente grandes compañías que necesitan equipos automáticos para procesos tales como análisis de alimentos); sin embargo, no es práctico para pequeñas compañías y laboratorios.^[7]

Algunos de los ámbitos en donde se emplea la CCF se muestran a continuación:

Cosmetología: Análisis de las materias primas para tintes, conservantes, surfactantes, ácidos grasos, y constituyentes de perfumes.^[9]

Análisis de Alimentos Determinación de pesticidas y fungicidas en agua potable, residuos en verduras, ensaladas y carnes, vitaminas en los refrescos y margarina, evaluación del cumplimiento de los valores límite (por ejemplo, compuestos policíclicos en agua potable, aflatoxinas en leche y productos lácteos).^[9]

Análisis Ambiental: Análisis de las aguas subterráneas, determinación de contaminantes en el suelo y aguas superficiales, análisis de los productos de la descomposición de los colorantes azoicos utilizados en la industria textil.^[9]

Análisis de sustancias inorgánicas: Determinación de iones inorgánicos (metales).^[9]

Química clínica, química forense y bioquímica: Determinación de sustancias activas y sus metabolitos en matrices biológicas, diagnóstico de trastornos metabólicos como la fenilcetonuria (PKU), la cistinuria y la enfermedad de jarabe de arce en los bebés.^[9]

Productos farmacéuticos y medicamentos: Identificación, pruebas de pureza y determinación de la concentración de ingredientes activos, sustancias auxiliares, conservantes en medicamentos, preparación de drogas y procesos de control de fabricación sintética.^[9]

Para la cuantificación de los metabolitos secundarios que se extraerán de la especie *Ruellia tuberosa* L. se utilizará un software, el cual permite relacionar la intensidad del color de un determinado

compuesto o grupo de compuestos sobre una placa de cromatografía de capa fina, con la concentración de este en la matriz desarrollada en la placa, por ejemplo, un extracto. Este software se encuentra dentro del programa de MATLAB 7.5.0 y registra la densidad óptica de la imagen en función de la posición de cada señal, obteniendo un densitograma de la placa (figura 6). Con el área de los picos de los patrones se crearon las curvas de calibración que permitieron la cuantificación de los metabolitos secundarios (Véase el modelo de la placa empleada en la figura 1).

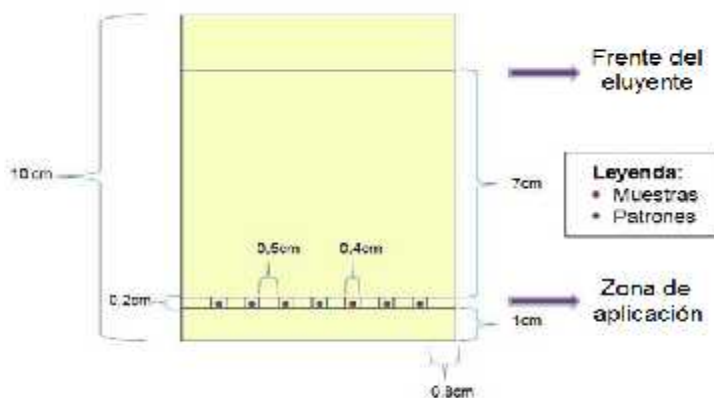


Figura 1. Modelo de las placas empleadas para la cuantificación de los metabolitos estudiados.^[10]

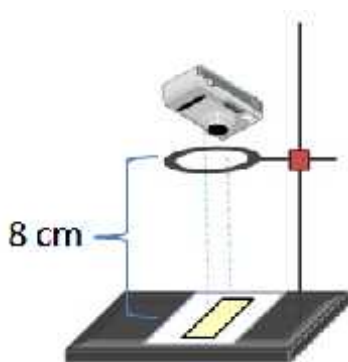


Figura 2. Montaje experimental para la captura de las imágenes con la cámara fotográfica.^[10]

Uso del UCV-Software.

El funcionamiento del software se basa en las características que poseen las imágenes digitales. Cada una de estas imágenes está compuesta de filas y columnas de “puntos” llamados píxeles. Cada píxel almacena información que representan las cantidades de rojo, verde y azul^[7] a través de un modelo conocido como RGB (Red (rojo), Green (Verde) y Blue (azul)). Todos los demás colores se definen como una mezcla de estos tres. Para indicar un color se prescriben tres números entre 0 y 255, cada uno de ellos indicando la intensidad de un color.^[11] Cuando todos los números están en su valor máximo, el píxel es de color blanco. Cuando todos los números están en su valor mínimo, el píxel es negro.^[7] Por ejemplo, blanco=RGB [255,255,255], negro=RGB [0,0,0,], amarillo= RGB [255,255,0], azul=RGB [0,0,255].^[44]

Las imágenes en blanco y negro están hechas de un promedio de los componentes rojos, verde y azul.^[7] Si un píxel en una imagen a color está representado por RGB [20,30,40], al cambiarlo a una imagen en blanco y negro pasaría a tener el siguiente código RGB [30,30,30], es decir, estaría en la escala de grises con una intensidad de color igual a 30.^[11] Dentro de esta escala, la intensidad de cada píxel se le denomina densidad óptica, donde el blanco corresponde con el valor de máxima densidad y el negro con el valor de menor densidad.^[12] El UCV-Software utiliza estas características de las imágenes digitales para crear los densitogramas necesarios para el análisis de las placas de CCF.

Para realizar el análisis de las fotografías, en primer lugar, se carga la imagen de cada placa en el UCV-Software, al realizar esto, el programa detecta los valores RGB de los píxeles de la fotografía y los promedia, transformando la imagen de color a una en blanco y negro (véase figura 3). Luego se invierten los colores de la imagen a una escala de grises, en la opción “Imagen Invertida”.

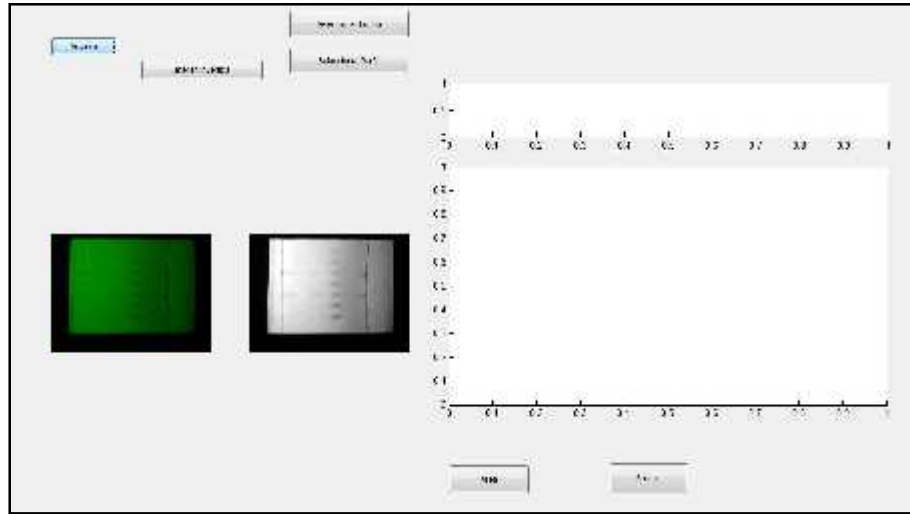


Figura 3. Captura de pantalla del UCV-Software al cargar la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF.^[10]

Posteriormente, con “Seleccionar Fondo” se elegirá una zona de la placa adyacente al lugar en donde se encuentra la muestra y patrones, tal como se muestra en la figura 4. Posteriormente, se escoge la zona en la que se encontraba la muestra y patrones con la opción “Seleccionar perfil”, como se observa en la figura 5. Hecho esto, el programa automáticamente resta los valores de densidad de los pixeles de la sección cercana a la muestra con los valores de densidad óptica de los pixeles del perfil de la muestra y patrones. Esto se hace para eliminar las posibles señales causadas por las zonas sin muestras en la placa.

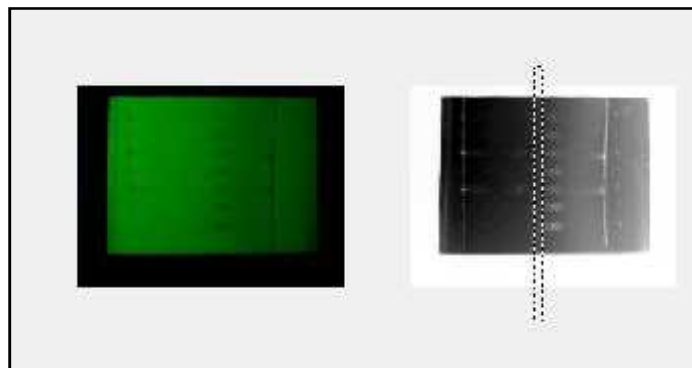


Figura 4. Captura de pantalla de la selección del fondo en la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF.^[10]

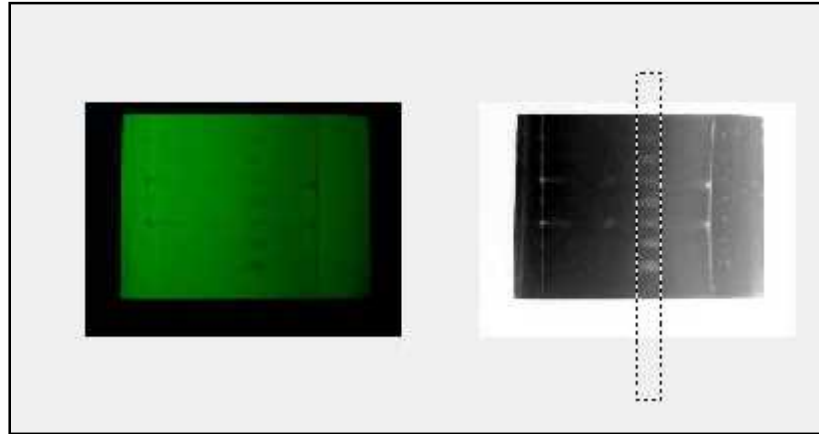


Figura 5. Captura de pantalla de la selección del perfil de la muestra y patrones de la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF.^[10]

El programa grafica el resultado de esta resta en función de la posición de la señal, dando como resultado un densitograma (véase figura 6), semejante a los obtenidos mediante otras técnicas densitométricas, como las mostradas en la figura 7.

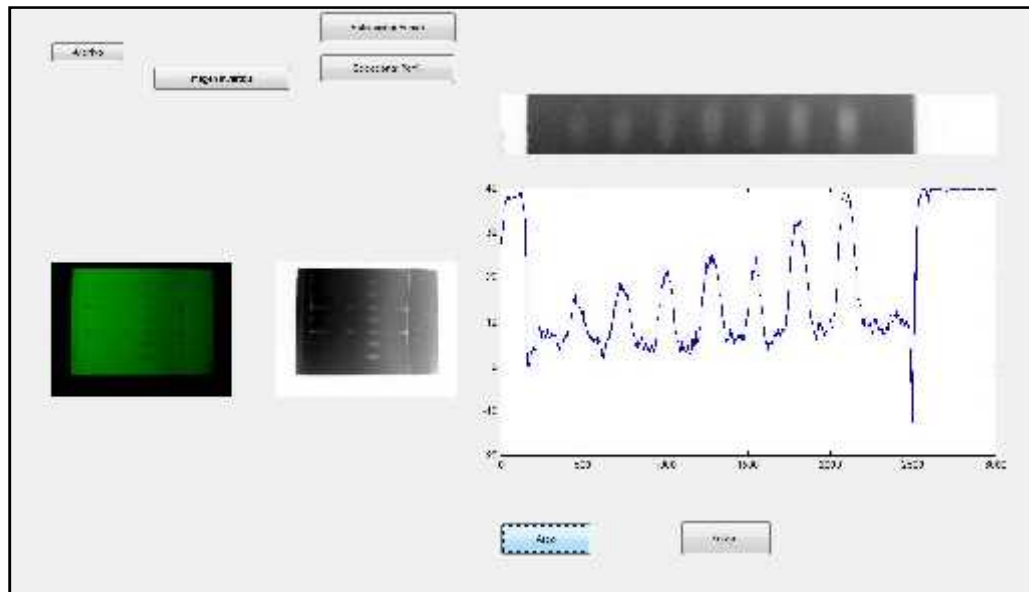


Figura 6. Captura de pantalla del densitograma generado por el UCV-Software de la imagen de la placa 1 correspondiente a un análisis por CCF.^[10]

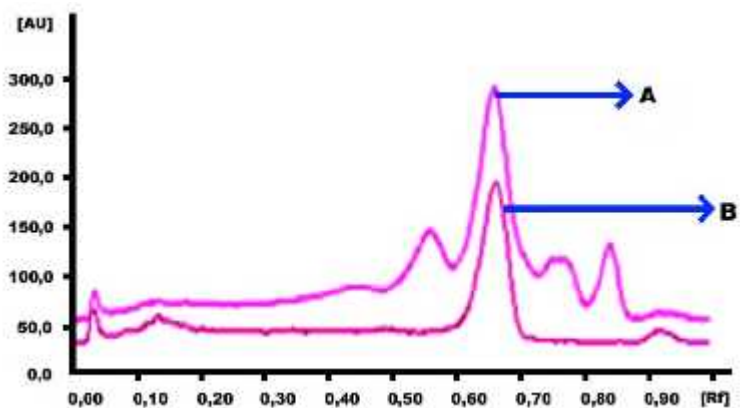


Figura 7. Densitogramas de las soluciones metanólicas de *Saraca asoca* (A) y de (+)-catequina (B) publicado por Rathe y col. 2010.13

En el caso de no invertir los colores de las imágenes blanco y negro de las placas desarrolladas en los experimentos de esta investigación, el programa reporta los resultados de manera tal que los picos obtenidos mostraban valores negativos (véase figura 8). Para obtener una imagen adecuada, se tuvo que invertir dichos valores para obtener, en contraste, picos con pendientes positivas.

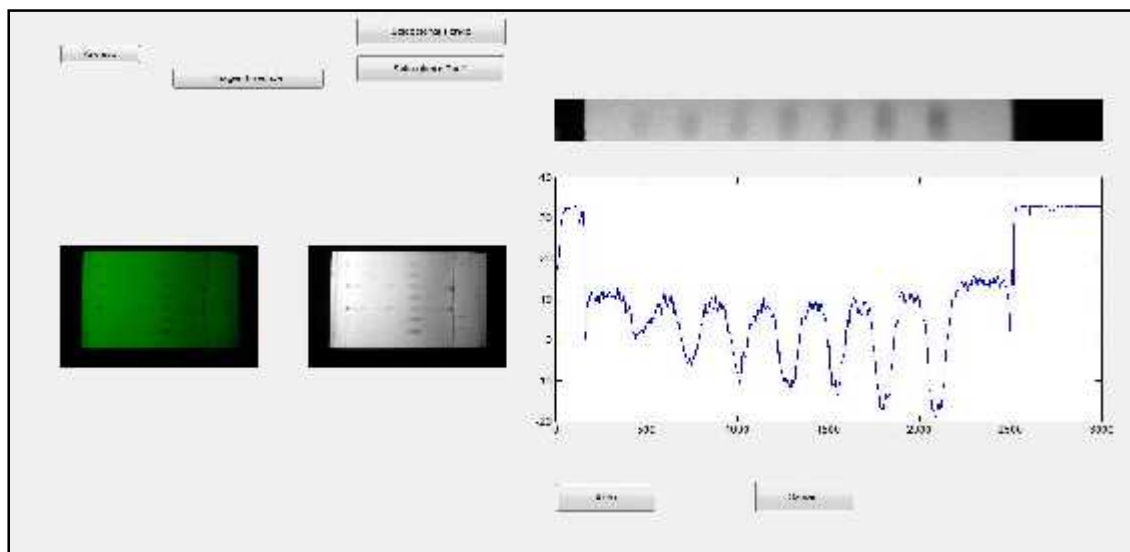


Figura 8. Captura de pantalla de la ventana que muestra el área de los picos del densitograma de la imagen en blanco y negro sin invertir de una placa de cuantificación de un análisis de CCF.^[10]

1.2.-Reproducibilidad.

La reproducibilidad es la expresión de la precisión de una medida, es decir la concordancia entre varias medidas sobre alguna propiedad, hechas a una población o muestra.^[14] La precisión indica la medida del error aleatorio, o indeterminado, de un análisis. Los parámetros de calidad de la precisión son la desviación estándar absoluta, la desviación estándar relativa, el coeficiente de variación (CV) y la varianza.^[15] En esta investigación, se considerará el coeficiente de variación como medida de la reproducibilidad. Este parámetro se calculará por medio de la ecuación 2:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad 2 \quad [12]$$

Donde S es la desviación estándar absoluta y $\bar{X}$ la media de las medidas.^[12]

1.3.-Linealidad del método.

La linealidad de un método analítico es su habilidad para proporcionar resultados que sean proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra, directamente o mediante transformación matemática.^[16]

La linealidad se medirá utilizando el coeficiente de correlación (R^2) de cada curva de calibración trazada, pues este indica el grado en que dos magnitudes están relacionadas linealmente, donde 1 representa una total linealidad.^[17]

1.4.-Límites de detección y cuantificación.

El límite de detección (LOD) se puede definir como la concentración más baja de analito que puede ser detectable en una muestra, no necesariamente cuantificable, en las condiciones experimentales de trabajo.^[13]

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja de analito presente en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable en las condiciones experimentales de trabajo.^[12]

Ambos se expresan normalmente en términos de concentración o masa de analito en la muestra y, en un método instrumental se pueden determinar de varias formas. En este trabajo, para estimar los límites LOD y LOQ se aplicaran las ecuaciones 3 y 4, respectivamente, empleando los datos correspondientes de cada curva de calibración trazada.^{[13],[18],[19]}

$$LOD = 3 \frac{S_b}{m} \quad 3 \quad [13]$$

$$LOQ = 10 \frac{S_b}{m} \quad 4 \quad [13]$$

Donde S_b corresponde a la desviación estándar del intercepto de la curva en la ordenada y m es la pendiente de la recta de calibrado.^[13]

1.5.-Exactitud.

La exactitud es la cercanía de una variable a su valor verdadero. Generalmente, la exactitud de un método se calcula mediante estudios de recuperación, que consisten en aplicar el método a una cantidad conocida del analito y se expresa como el porcentaje de analito recuperado tras el ensayo,^[16] relacionando el valor medido ($\bar{X}$) respecto al valor teórico (X_r) a través de la ecuación 5.^[20]

$$Rec. \% = \frac{\bar{X}}{X_r} * 100 \quad 5 [17]$$

1.6.-Metabolitos aislados de *Ruellia tuberosa* L.

Ruellia tuberosa L. (*Acanthaceae*) es una planta perenne tropical que se encuentra distribuida extensamente en el sureste de Asia incluyendo Tailandia y Laos. En la medicina popular, esta especie ha sido utilizada como diurético, anti-diabético, anti-pirético, analgésico, y anti-hipertensivo. Recientemente ha sido introducido en bebidas a base de hierbas en Taiwán.^[21]

De la especie *R. tuberosa* se han aislado varios tipos de compuestos que son los responsables de las actividades biológicas antes mencionadas:

1.6.1.-Flavonoides.

La estructura general de este tipo de compuestos comprende un anillo A derivado de la cadena policétido (sigue el patrón *metade* oxigenación del floriglucinol o del resorcinol), un anillo B, derivado del ácido shikímico, con sustitución en *orto*, como en los ácidos cumárico, caféico y gálico, y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano. Es por ello que se les conoce como unidades C15, C6-C3-C6 y el esqueleto recibe el nombre de núcleo de flavano.^[2]

1.6.2.-Quinonas.

Este tipo de compuestos son aislados como núcleo principal de una estructura o formando parte de moléculas complejas aromáticas o aromáticas-alifáticas y a veces diméricas. Su origen biogenético está distribuido entre los metabolitos fundamentales principales: ácido acético, shikímico y mevalónico. Como criterio general, se acepta que las quinonas provenientes de vegetales superiores como es este caso, lo hacen del ácido shikímico.^[2]

1.6.3.-Alcaloides.

La variedad estructural de este tipo de compuestos es muy grande, tanto en su esqueleto carbonado como en el tipo y número de sustituyentes. El nitrógeno, que debe estar presente para que una molécula sea catalogada como alcaloide, puede estar como una amina primaria, secundaria, terciaria, o sal cuaternaria de amonio, amida y N-óxidos, o puede haber más de un nitrógeno con diferente funcionalidad en la misma molécula. Los aminoácidos no son alcaloides, pero son sus precursores. Pueden ser anillos simples, derivados de piridina, pirrolidina y piperidina; compuestos bicíclicos derivados de tropano; pirrolizidinas, indolizidinas y quinolizidinas; isoquinolinas, alcaloides bencisoquinolínicos, de eritrina, alcaloides quinolínicos; índoles, incluye betalaínas y alcaloides esteroidales y terpenoidales.^[2]

1.6.4.-Terpenos.

La gran variedad estructural de los terpenos dificulta el resumen de las características comunes de estos compuestos, pues no solamente se trata de la variedad en los grupos funcionales, sino además, del número de átomos de carbono que conforman los esqueletos. Entre los primeros, los oxigenados ocupan un lugar prioritario (alcoholes, ésteres, éteres, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, cetales, etc.) y le siguen funciones con azufre, halógenos (principalmente encontrados en compuestos de origen marino) y nitrógeno, en cuyo caso la molécula se le clasifica como alcaloide. Los terpenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y su frecuencia y abundancia están íntimamente ligados a factores genéticos y climáticos.^[2]

Una de las principales actividades biológicas relacionadas a especies del género *Ruellia*, es sobre la Diabetes Millitus, haciéndola blanco de numerosos estudios para aislar e identificar los metabolitos responsables de esta actividad^[22]

1.7.-Diabetes Mellitus.

Diabetes mellitus (DM) es el mayor desorden endocrino y probablemente la enfermedad metabólica con mayor crecimiento en el mundo. La DM está afectando severamente a aproximadamente el 5% de la población del mundo. Las proyecciones mundiales sugieren que más de 300 millones de

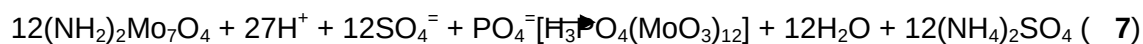
personas tendrán diabetes en el 2025. Según la Información Etnobotánica del Mundo de las plantas medicinales casi 800 plantas fueron usadas para controlar la DM. Sin embargo, solo unas pocas de estas plantas han sido estudiadas. Medicamentos tradicionales de origen vegetal, juegan un papel fundamental en la cura de DM.^[18]

La organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en Inglés) en 1998, recomendó la evaluación de plantas tradicionales en el tratamiento de la diabetes porque son efectivas, no tóxicas, tienen menos o no poseen efectos secundarios y son considerados buenos candidatos para una terapia oral. En esta consideración, varios científicos llevaron a cabo ensayos experimentales y clínicos en plantas medicinales y encontraron actividad anti-diabética significativa. Complicaciones diabéticas han sido controladas mundialmente con el uso de medicamentos a base de plantas tradicionales. Drogas aisladas de fuentes naturales corresponden a 78% de nuevos fármacos aprobados por *Food and Drugs Administration* (FDA) entre 1983 y 1994. Además, las limitaciones de agentes farmacológicos disponibles para el control de la hipoglicemia han estimulado la búsqueda un nuevo agente anti-diabético con diferentes mecanismos de acción. En la literatura los datos indican que algunos flavonoides y triterpenos aislados de plantas medicinales han reducido significativamente el nivel de glucosa en la sangre.^[18]

Uno de los blancos más utilizados para la evaluación de la actividad hipoglicemiante es el sistema glucosa-6-fosfatasa, encargado de clivar la molécula Glucosa-6-fosfato para liberar glucosa en sangre.

1.8.-Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)

La enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa; EC 3.1.3.9, por sus siglas en inglés, Glucose-6-Phosphatase), es un sistema multicomponente constituido por una subunidad catalítica (G6PC, antigua SUC) y tres transportadores: G6PT (antiguo T1) para glucosa-6-fosfato (G6P, por sus siglas en Inglés, glucose-6-phosphate), T2 para fosfato/pirofosfato y GLUT7 (antiguo T3) para glucosa,^[23] de modo que la enzima y sus transportadores son blancos potenciales para terapias antidiabéticas.^[24] Esta enzima, se encuentra localizada en el retículo endoplasmático (RE) y en la envoltura nuclear del hígado, riñón y en los islotes de células pancreáticas. Se ha reportado que fracciones provenientes del extracto metanólico de *R. tuberosa* L. han presentado efectos inhibitorios sobre el sistema enzimático G6Pasa^[25], por lo que



La ventaja del uso de este método es que, además de ser económico y rápido, el reactivo que se usa para formar el complejo coloreado también detiene la reacción.

Para diferenciar si el inhibidor actuó sobre G6PT o directamente sobre G6PC, se utilizaron microsomas intactos (-H) y microsomas rotos (+H); los primeros son vesículas en las cuales la membrana limitante actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, mientras que los segundos carecen de dicha selectividad y el sustrato tiene libre acceso a G6PC. Los microsomas rotos se obtienen mediante la incorporación de histonas durante el ensayo; estas son proteínas básicas que rompen la integridad de las estructuras microsomales.

2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Revisión fitoquímica y farmacológica del género *Ruellia*.

La especie *Ruellia tuberosa* L., la cual debe su nombre en honor a Jean Ruelle, herborista y médico de Francisco I de Francia y traductor de varios trabajos de Dioscorides, presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnolipsida

Orden: Lamiales

Familia: Acanthaceae

Género: *Ruellia*

Especie: *Ruellia tuberosa* L.

El género *Ruellia* es un grupo extenso y diverso con aproximadamente 250 especies de hierbas perennes y arbustos y con una distribución pantropical en trópicos y subtrópicos distribuidas a lo largo de Asia, México, Brasil y Venezuela donde existen alrededor de 30 especies.^[26] Muchas de sus especies han sido ampliamente estudiadas, ya que en algunas culturas son utilizadas como medicinas tradicionales, con una gran variedad de metabolitos secundarios como: azúcares^[1], betaínas, glucósidos cianogénicos, iridoides, alcaloides, flavonoides, lignanos, terpenos, entre otros.

Se han realizado muchos estudios sobre las actividades fitoquímicas y farmacológicas de las especies de *Ruellia* estudiadas, a continuación un breve resumen de las diferentes especies y los tipos de metabolitos aislados y las actividades biológicas que éstos presentan.

2.1.1.-*Ruellia brittoniana*.

Farid (1993) aisló de la fracción *n*-BuOH de la especie *Ruellia brittoniana* el hexaacetato del glicósido 2-O- α -D-galactopiranosilglicerol. Este compuesto fue sometido a un análisis farmacológico y se encontró que poseía un efecto cardiodepresor con una caída máxima del flujo sanguíneo del 50,8% a una dosis máxima de 64 mg/Kg. El ritmo cardíaco disminuyó un 41,62% y la fuerza contráctil disminuyó un 19,45% todos estos efectos se obtuvieron a la misma dosis.

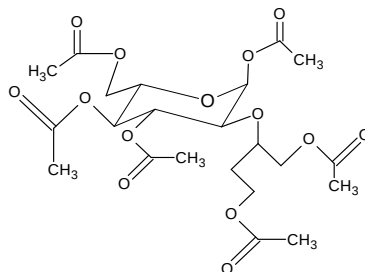


Figura 10. Hexaacetato del glicósido 2-O- α -D-galactopiranosilglicerol^[1]

La α -etilgalactosa también fue aislada de la fracción de *n*-BuOH; en el ensayo farmacológico se observó un incremento en la presión sanguínea en las ratas anestesiadas para tres diferentes dosis: 22,13% para 50 μ g/Kg; 67,7% para 1 mg/Kg; 6,06% para 25 mg/Kg.

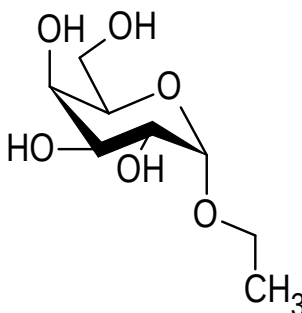


Figura 11. α -etilgalactosa^[1]

En dicho trabajo se reportaron estudios *in vivo* en donde se observó el comportamiento de la presión sanguínea en ratas anestesiadas para el compuesto hexaacetato 2-O- α -galactopiranosilglicerol y se obtuvo que para una dosis de 50 μ g/Kg no hubo un efecto significativo mientras que para una dosis de

100 µg/Kg aumentó la presión a 23,63% y, luego de 5 minutos de administrada la dosis, las ratas murieron.

Adicionalmente, el dímero del ésterel 2,4-hexandiato de metilo y el ácido *p*-metoxibenzoico fueron aislados de la fracción de acetato de etilo, pero no se reportaron estudios farmacológicos para ellos.^[1]

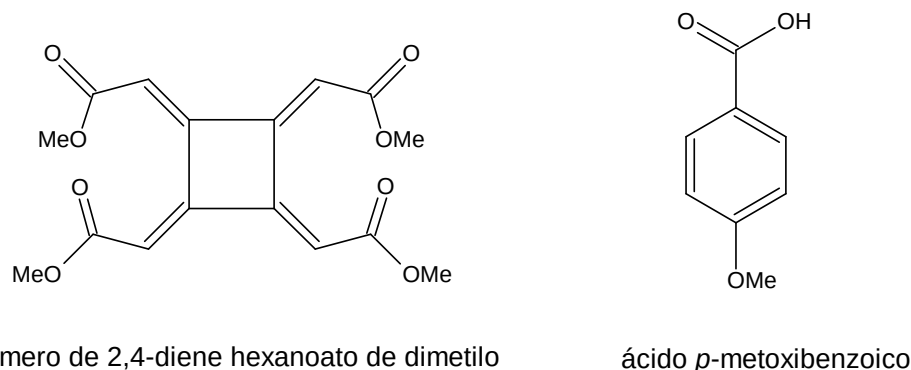


Figura 12. Compuestos aislados de la fracción de acetato de etilo *Ruellia brittoniana*^[1]

2.1.2.- *Ruellia menthoides*.

Esta especie es un arbusto de 3 m de alto con hojas que poseen un aroma alcanforado y picante.^[25]

Facundo y colaboradores (2005), utilizaron la técnica de destilación por arrastre con vapor para extraer una mezcla de aceites esenciales de los cuales, el 1,8-cineol, se encontraba presente en un 42% con respecto a la mezcla total, según el análisis de dilución del extracto de aroma (AEDA). En este análisis se encontró que el factor FD (dilución del sabor, siglas en inglés, este factor hace referencia a la intensidad del olor de los aceites esenciales que componen esta especie y que le otorga su olor característico) para este aceite es de 215, mientras que para el segundo compuesto mayoritario encontrado, el *S*-alcanfor, fue de 28. Se asoció el olor a ese enantiómero porque se comparó por GC con una mezcla racémica y el enantiómero *R*, y se comprobó que el único isómero aislado de la especie era *S*-alcanfor.^[27]

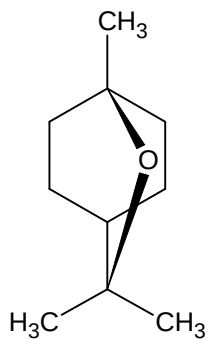


Figura 13. 1,8-Cineol^[22]

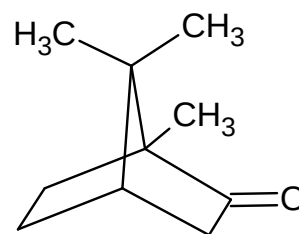


Figura 14. (S)-(-)-Alcanfor^[22]

Los otros compuestos encontrados en la mezcla de aceites esenciales se encuentran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Aceites esenciales encontrados en *Ruellia menthoides*, cromatografía de gases.^[22]

Sustancia	Factor FD 2n	Retención	Área relativa(%)
α-Pineno		940	2,1
Canfeno		955	1,8
Mirceno		990	0,6
Limoneno		1035	0,9
1,8-Cineol	15 (picante)	1037	41,8
2-Nonanona		1094	0,4
2-Nonanol		1100	1,0
S-(-)-Alcanfor	8 (alcanforado)	1146	18,2
Isoborneol		1160	4,0
Borneol		1170	1,4
α-Terpineol		1186	3,9
β-Elemeno		1345	1,4
trans-β-Farneseno		1460	0,9
β-Selineno		1480	0,8
α-Selineno		1500	0,7
cis-Calameneno		1520	0,3
Curzeroneno		1610	12,7
Patchoulanol		1665	0,9

2.1.3.-*Ruellia patula* Jacq.

Farid (1993), luego de tratar toda la planta con metanol y concentrar al vacío, disolvió el residuo en agua y la parte insoluble fue removida por filtración. El filtrado se extrajo con éter de petróleo, el solvente orgánico se descartó, la solución remanente se extrajo con acetato de etilo (Fracción AcOEt) luego con *n*-BuOH (Fracción *n*-BuOH), quedando por última la fracción acuosa. Estas tres fracciones fueron sometidas a técnicas de cromatografía para aislar los componentes presentes en esta especie.

De la fracción AcOEt se aislaron: β -sitosterol, lupeol y apigenina-7-O-rutinósido.

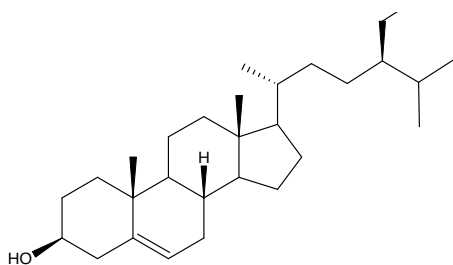


Figura 15. β -sitosterol^[1]

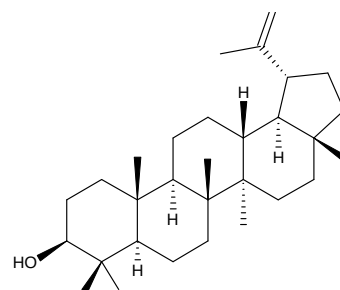


Figura 16. Lupeol^[1]

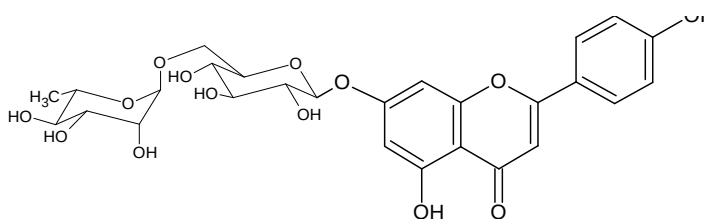


Figura 17. Apigenina-7-O-rutinósido^[1]

Por otro lado, de la fracción *n*-BuOH se aislaron: rupásido, lioniresinol-9-*O*- β -*D*-glucopiranosido y *S*-5,5-dimetoxi-larici-resinol-9-*O*- β -*D*-glucopiranosido.

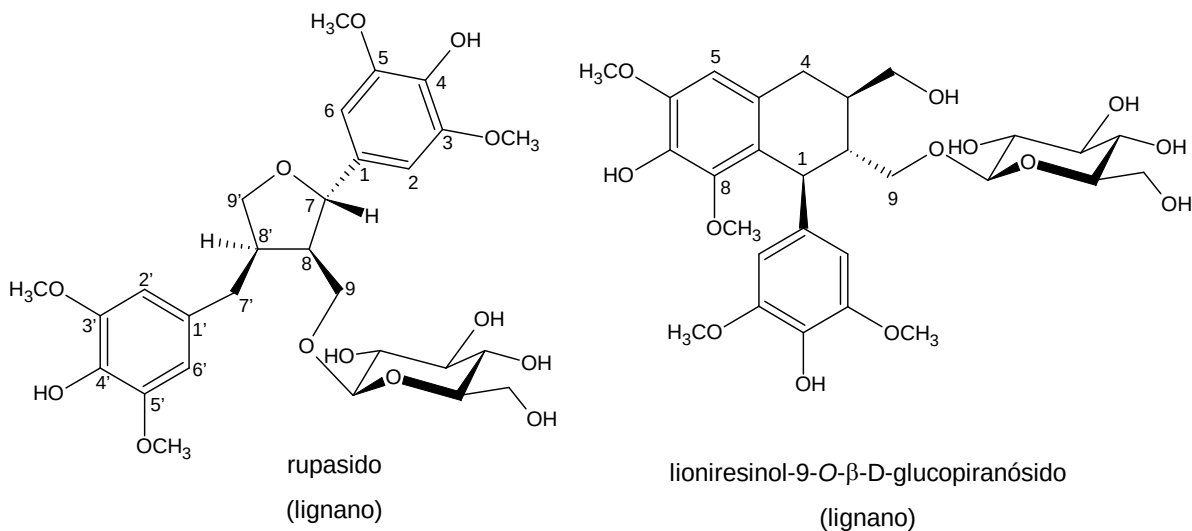


Figura 18. Rupásido y lioniresinol-9-*O*- β -*D*-glucopiranosido

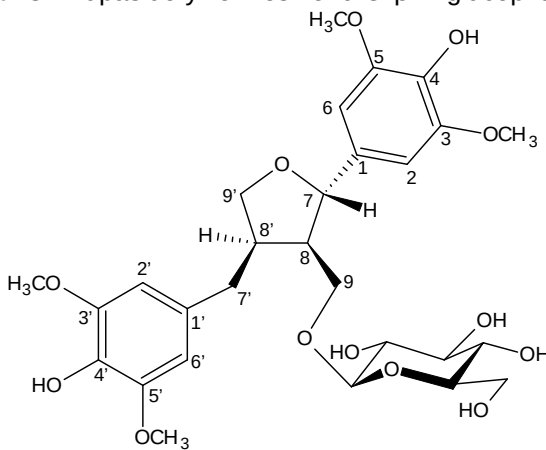


Figura 19. *S*-5,5-dimetoxi-larici-resinol-9-*O*- β -*D*-glucopiranosido^[1]

Por último de la fracción acuosa se aislaron α -etilgalactosa, β -*D*-fructuosa, β -*D*-glucosa y α -*D*-glucosa.

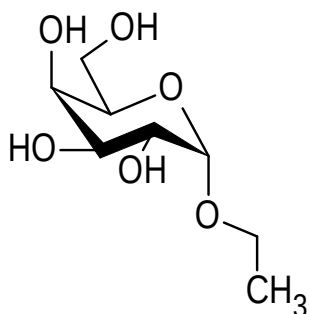


Figura 20. α -etilgalactosa^[1]

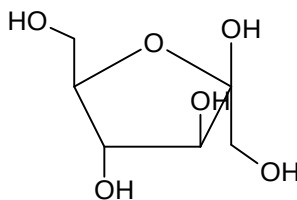


Figura 21. β -D-fructuosa^[1]

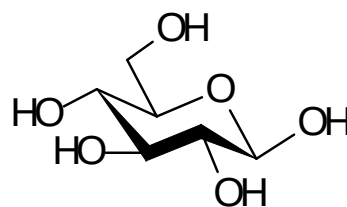


Figura 22. β -D-Glucosa^[1]

Para este estudio se realizaron evaluaciones farmacológicas *in vitro* para el extracto crudo y las fracciones trabajadas de la planta. La investigación mostró que el extracto crudo produjo un incremento gradual de la fuerza contráctil desde 1 mg/Kg a 8 mg/Kg (la dosis media efectiva fue de 8 mg) en el corazón aislado de la rata, con lo cual se experimentó un aumento de $19,16\% \pm 1,85$. La velocidad del corazón reveló un efecto cronotrópico en todas las dosis, y el efecto máximo se observó a 64 mg/Kg con $(-26,81 \pm 7,51)\%$. En el flujo coronario se observó que a 8 mg/Kg se registró un decrecimiento máximo del flujo de $(-10,00 \pm 1,73)\%$, mientras que entre (16 y 64) mg/Kg aumentó el flujo hasta un máximo de $(12,90 \pm 0,46)\%$. Adicionalmente, la fracción acuosa mostró un efecto inotrópico positivo a todas las dosis, siendo máximo a 16 mg con un resultado de $(48,60 \pm 10,63)\%$. Así mismo, se observó una respuesta bifásica en la velocidad del ritmo cardíaco, pues para dosis iniciales la rapidez incrementaba pero a partir de 4 a 64 mg decreció, siendo el máximo de $(-62,65 \pm 4,73)\%$. Se observó un efecto negativo en el flujo sanguíneo, mostrando un decrecimiento constante alcanzando el máximo a 64 mg con $(-67,65 \pm 1,06)\%$. Finalmente, para la fracción *n*-BuOH se observó un efecto inotrópico con un máximo a 64 menos en la última dosis, con un decrecimiento significativo en la velocidad del ritmo cardíaco de $(-48,28 \pm 3,13)\%$. El flujo sanguíneo mostró un efecto negativo, siendo el máximo del decrecimiento a 8 mg con $(-34,93 \pm 5,93)\%$.

Los estudios destacan que la fracción acuosa mostró un efecto más pronunciado que el de *n*-BuOH en todos los parámetros, lo cual se explica porque son los azúcares y otros compuestos presentes en esta fracción, muchos de ellos glicósidos, los responsables de esta respuesta.^[1]

2.1.4.-*Ruellia praetermissa* Sceinf.ex.Lindau.

Es una hierba silvestre que se encuentra en el centro de África y en el sureste de Asia. En Camerún se usa como remedio para dolores de estómago y es efectivo para tratar problemas digestivos.

Salah y colaboradores (2000), realizaron un análisis químico donde se demostró que los extractos de acetato de etilo y metanol contenían flavonoides (luteolina, apigenina y sus respectivos glucósidos), e iridoides glicosidados como el ácido 8-*epi*-desxilogánico y glucósidos cianogénicos como la taxifilina. Así mismo, el extracto acuoso poseía únicamente iridoides glicosidados. Estas sustancias o compuestos químicos son los responsables del efecto purgativo encontrado en esta especie.^[28]

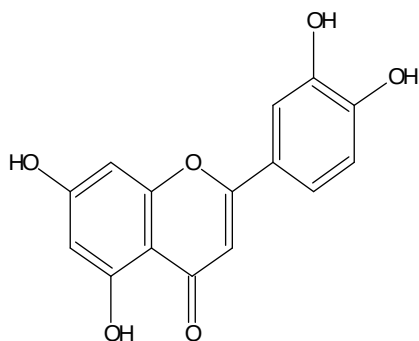


Figura 23. Luteolina^[23]

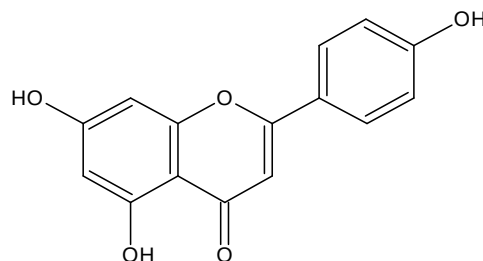
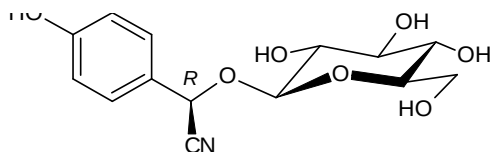


Figura 24. Apigenina^[23]



Taxifilina (configuración R)

Figura 25. Taxifilina^[23]

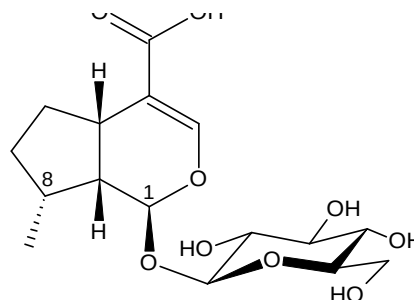


Figura 26. Ácido 8-*epi*-desxilogánico^[23]

Adicionalmente, se evaluó el extracto metanólico de la planta y se observó que posee una influencia directa en la fisiología del útero durante la gestación en ratas. El extracto parece activar las células miométricas de la membrana muscarínica de los receptores, resultando en un efecto uterotópico

producido por una posible acción vía sistema colinérgico. Este efecto es observado *in vivo* e *in vitro*, únicamente cuando es aplicado el extracto en la segunda parte de la gestación.

Los efectos observados pueden deberse, en parte, a la presencia de β -sitosterol y estigmasterol (esteroles naturales conocidos por generar síntesis de hormonas esteroideas *in vivo*) que podrían ser responsable del efecto estrogénico del extracto lo cual facilita la síntesis de estrógeno endógeno. Los flavonoides luteolina y apigenina poseen bajo efecto estrogénico. Por otro lado, los iridoides glicosidados poseen un efecto colinérgico que contribuye a la actividad contráctil del extracto en los úteros aislados de las ratas.

En la medicina tradicional de África se ha usado *Ruellia praetermissa* para regularizar embarazos con amenazas de aborto involuntario durante los primeros meses. Esto es explicado por su habilidad para estimular el crecimiento del endometrio del útero en las primeras etapas de gestación. También explica el uso frecuente de esta planta antes del nacimiento para acelerar el parto y la expulsión de la placenta, por la fuerza contráctil del útero.^[29]

2.1.5.-*Ruellia prostrata* Poir.

Es una planta herbácea silvestre que se encuentra distribuida en la India. Es utilizado como medicamento por los indígenas para tratar estados de ánimo y para el tratamiento de la gonorrea.^[30] Andhiwal y colaboradores (1985) mostraron que los extractos acuoso y alcohólico poseen una actividad antifertilidad de 60 y 40% en ratas femeninas en dosis de 500 mg/Kg y 100 mg/Kg de peso corporal, respectivamente.^[25]

Banerjee (1984), logró separar e identificar una mezcla de esteroles de un extracto de éter de petróleo de la parte aérea de la planta por medio de análisis químico y cromatografía de gases en grado analítico aislando 17,61% de acetato de sitosterol, 75,33% de acetato de estigmasterol, 7,04% de 24-metilcolesterol, y trazas de colesterol y brassicasterol. También, en dicha investigación se hace referencia a que en trabajos anteriores se reporta el aislamiento de las hojas de esta especie de tres flavonoides glicosidados, 7-glucósido luteolina, 7-glucósido apigenina y 7 β -glucurónido apigenina.^[31]

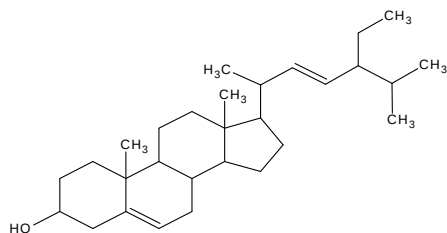


Figura 27.Estigmasterol^[25]

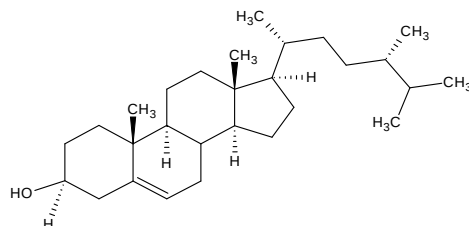


Figura 28.24-metilcolesterol^[26]

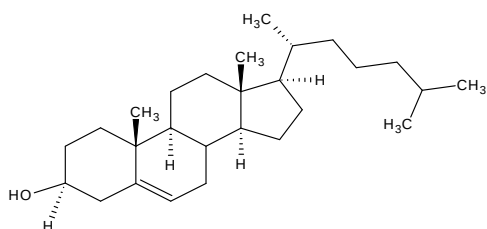


Figura 29.Colesterol^[26]

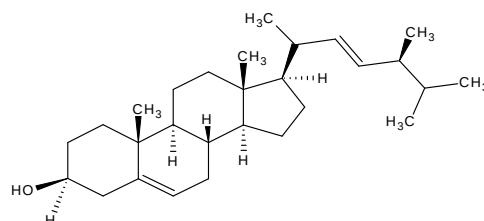


Figura 30.Brassicasterol^[26]

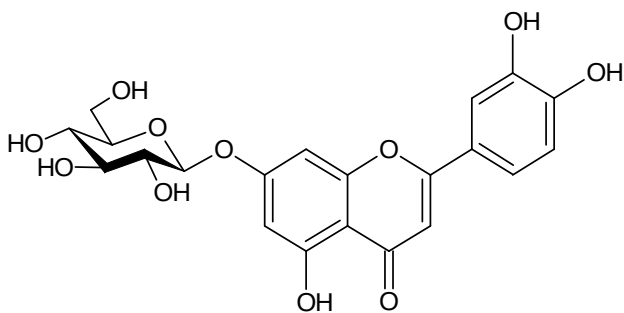


Figura 31. 7-glucósido luteolina^[31]

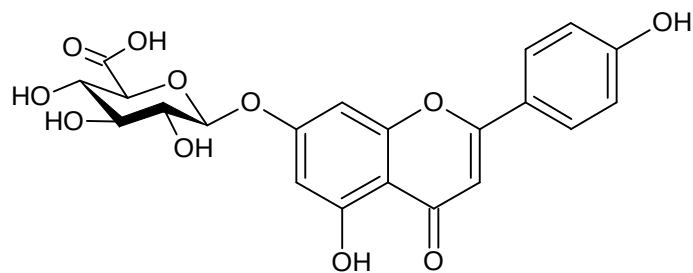


Figura 32. 7-glucorónido apigenina^[31]

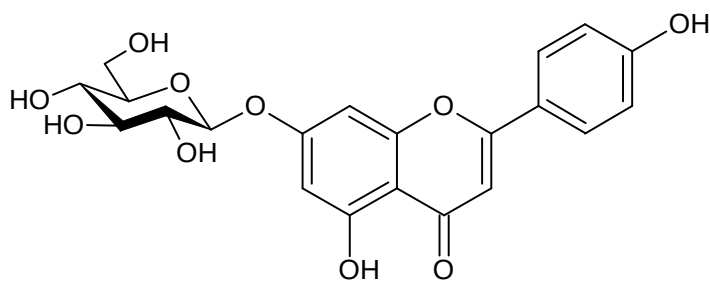


Figura 33. 7-glucósido apigenina^[31]

2.1.6.-*Ruellia rosea*.

Johne y colaboradores (1975), reportaron el aislamiento del alcaloide tetrametilputrescina, con una mezcla cloroformo-metanol de la especie *Ruellia rosea*.^{[32],[33]}

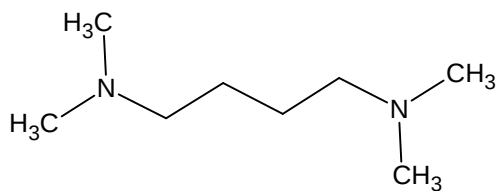


Figura 34. Tetrametilputrescina^[27]

2.1.7.-*Ruellia tuberosa* L.

2.1.7.1.-Descripción Botánica:

Esta planta es una hierba perenne de unos 30-50cm de alto, con raíces parcialmente gruesas y fusiformes, con tallos erguidos, agudamente cuadrangulares y surcados. Sus hojas son obaovadas u oblanceoladas, 6-12cm de largo y de 1 a 5cm de ancho, de ápice agudo o ligeramente acuminado largamente cuneiforme, casi glabras; sus pecíolos tienen un largo de 5 mm. Inflorescencia ramificada a modo de dicasias, brácteas filiformes de 5-8 mm de largo. Cáliz glabro o brevemente pubescente, 5 lobulados profundos, los lóbulos filiformes de 15 a 20 mm de largo. Carola acampanada, de color azul-violáceo o raras veces blanco, en su exterior la pubérula de 3 a 5 cm de largo con 5 lóbulos suborbiculares y con un diámetro de 13 a 15 mm; con 4 estambres didínamos. Ovario bilocular con varios óvulos en cada celda, estigma con 2 lóbulos desiguales. Cápsula cilíndrica, estipitada, glabra. En Venezuela frecuentemente se encuentra en sitios soleados de tierras calientes. Otros nombres que posee esta especie son: Raíz de barreto, Oreja de ratón, Escopetilla y Peonilla^[34] (Figura 35).



Figura. 35.*Ruellia tuberosa* L.^[35]

En el sistema médico más antiguo de la india, el Siddha, las hojas son utilizadas como remedio contra la gonorrea, enfermedades del oído y contra el cáncer de estómago. Las raíces secas y molidas en dosis de 2 onzas provocan el aborto y es usado también contra el dolor de ojos. La decocción de las hojas es usada en el tratamiento de bronquitis. En la medicina tradicional de Surinam se utilizan como vermífugo y también se administra contra el dolor y tensión de músculos. También es usado con enfriamiento en problemas urinarios y fibromas en el útero^[36].

La potencialidad terapéutica de *Ruellia tuberosa* L. ha sido explorada^{[37],[38],[39][40]} y varios grupos de investigación han realizado diversos estudios fitoquímicos de la misma, reportando el aislamiento e identificación de metabolitos del tipo flavonoidal, alcaloidal y terpenoidal. Las actividades biológicas reportadas para esta especie son: antioxidante^[41], antiplasmódica^[42], anticancerígena^{[43],[44],[45]}, analgésica^[34], antiinflamatoria^{[34],[39]}, diurética^[34], antihipertensiva^[34], antidiabética^[21].

En numerosos reportes asociados a *Ruellia tuberosa* L. no se determinó si un metabolito en particular, o un conjunto de ellos, fueron los responsables de las actividades asociadas. Entre los metabolitos reportados se encuentran aminoácidos, azúcares, hidrocarburos lineales, terpenos, alcaloides, flavonoides y quinonas, entre otros y se describen en las siguientes secciones de este trabajo.

2.1.7.2.- Tipos de metabolitos aislados:

2.1.7.2.1.-Flavonoides.

Subramanian y colaboradores (1974) reportaron la presencia de la antocianina malvidin-3,5-diglucósido en las flores (color violeta oscuro) de *R. tuberosa*; de los capullos de las flores se han aislado apigenin-7-O-glucorónido como flavonoide mayoritario (máximo 3%), apigenin-7-O-glucopiranosido, apigenin-7-O-rutinósido y luteolin-7-O-glucopiranosido, mientras que de las hojas se han aislado apigenina, luteolina.^[46], pedalitina, circimaritin, circimarin, circilol-4'-glucosidado, sorbifolin Por otra parte, acacetina fue obtenido a partir de las raíces de *R. tuberosa* L.^[47]

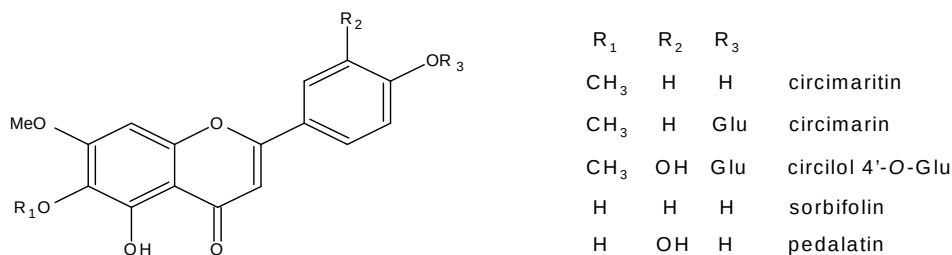


Figura 36. Compuestos de tipo flavonoides reportados para *Ruellia tuberosa* L.^[46]

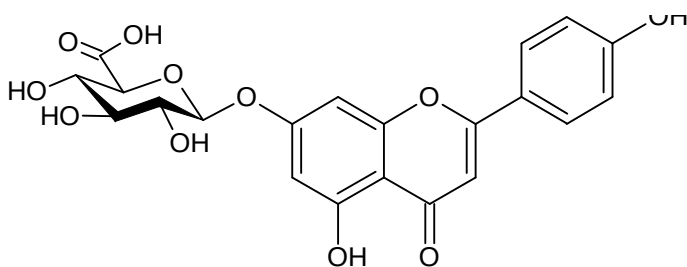


Figura 37. Apigenina-7-O-D-glucuronido^[46]

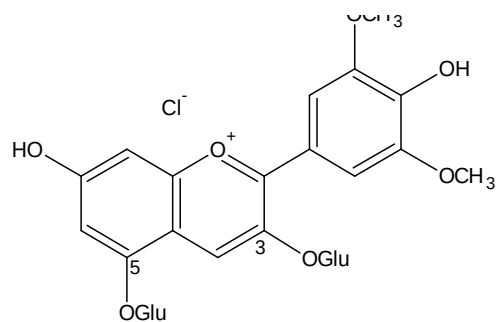


Figura 38. Malvidin-3,5-diglucopiranosido (antocianina)^[46]

Por otra parte, Graham y colaboradores (2000), aislaron del extracto metanólico de la parte aérea seca de *R. tuberosa*, los flavonoides cirsimaritin, cirsimarin, circiliol 4'-O-glucopiranosido, sorbifolin y pedalatin junto con el triterpeno betulina, el alcaloide indol-3-carboxaldehído y el ácido vanílico. Los flavonoides aislados fueron citotóxicos sobre las células cancerosas de KB (cáncer de piel) y HepG2 (cáncer de hígado). En células KB, Cirsimaritin presentó un IC_{50} = 30,05 μ g/mL y circiliol 4'-O-glucopiranosido un IC_{50} = 17,91 μ g/mL. Por otra parte, cirsimarin fue citotóxico contra células HepG2 con un IC_{50} = 38,83 μ g/mL.^[43]

Las cantidades de extracto y fracciones que mostraron un efecto hipoglicemiante significativo fueron: la fracción de acetato de etilo (EF) con 100 mg/Kg peso corporal, y fracción de *n*-hexano (HF) con 150 mg/Kg de peso corporal, donde esta última fracción mostró un efecto moderado. Estas dosis mostraron una reducción en porcentaje de $(7,58 \pm 1,04)\%$ en ratas normales y $(15,17 \pm 0,58)\%$ en ratas diabéticas para HF y $(16,70 \pm 0,73)\%$ y $(28,64 \pm 0,28)\%$ para EF en animales normales y diabéticos, respectivamente.

Los resultados de *Ruellia tuberosa* mostraron una fuerte actividad del extracto de acetato de etilo con un IC_{50} = $(28,6 \pm 0,7)$ μ g/mL lo cual concuerda con la literatura (Wagner y colaboradores en 1971)^[48]. El hecho de que EaF (fracción de acetato de etilo) posea más actividad antioxidante tal vez se deba a que esta fracción tiene la mayor presencia de flavonoides en comparación con el resto de las fracciones de la planta^[43].

2.1.7.2.2.-Quinonas.

Ghosal y colaboradores (1974), reportaron que el extracto de éter de petróleo de las raíces de *R. tuberosa* fue tratado con carbonato de sodio al 1%, luego, fue acidificado y tratado con $CHCl_3$ y de ésta fracción clorofórmica se aisló 2,6-dimetoxiquinona, acacetina (flavonoide), y una quinona-C16 con características muy similares a cartamona, una quinona-C15. El exudado de las raíces, obtenido por maceración de las raíces en agua durante 12 horas, también presentó los mismos componentes que la fracción de $CHCl_3$ antes descrita. Estos tres compuestos mostraron una acción curativa y protectora significativa contra las sustancias tóxicas emitidas por *Fusarium oxysporum* en el crecimiento y desarrollo de las semillas del falso azafrán (safflower, *Carthamus tinctorius* L.). Éstos resultados revelaron las propiedades fungicidas de *R. tuberosa*.^[47]

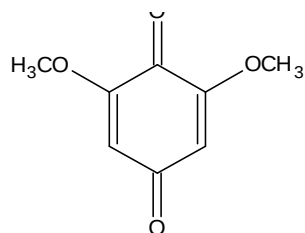


Figura 39. 2,6-dimetoxiquinona^[47]

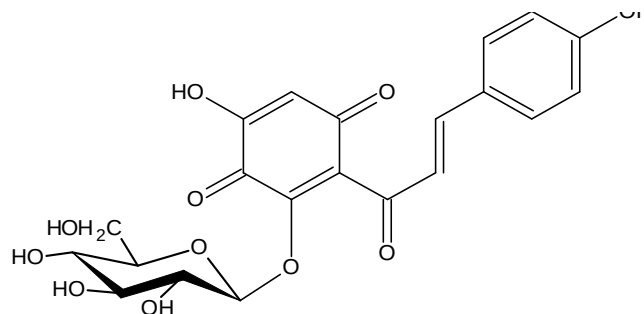


Figura 40. Cartamona (quinona-C15)^[47]

2.1.7.2.3.-Alcaloides.

Arun y colaboradores (2008), aislaron de las partes aéreas frescas de la especie el alcaloide tylocrebrina. Este compuesto mostró un IC_{50} que varió entre 0,35-1 μ M para diferentes células cancerosas, resultando ser menos tóxica para las células normales de pulmón WI-38. Además, resultó ser un potente agente antiinflamatorio en células monocíticas THP-1 (células humanas de pacientes con leucemia monocítica aguda).^[45]

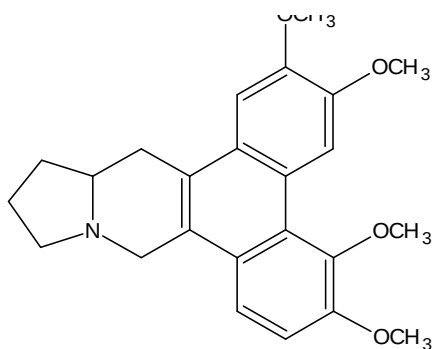


Figura 41. Tylocrebrina^[45]

Graham y colaboradores (2000), aislaron de la fracción AcOEt proveniente del extracto metanólico de las partes aéreas secas, el alcaloide Indol-3-carboxaldehído. Este compuesto fue evaluado como agente anticancerígeno, con un IC_{50} = (3,5-1,9) μ g/mL en las células cancerosas H460 (cáncer de pulmón) y MDA-MB231 (cáncer de mama), respectivamente.^[43]

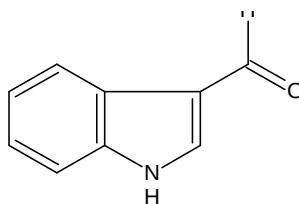


Figura 42.Indol-3-carboxaldehido^[43]

2.1.7.2.4.-Terpenos e hidrocarburos lineales.

Singh y colaboradores (2002), obtuvieron de la parte aérea de *R. tuberosa* el compuesto 21-metildammaran-22-en-3 β ,18,27-triol,^[49] mientras que Chwan-Fwuy y colaboradores (2006), aislaron betulina^[41] de la fracción de AcOEt proveniente del extracto metanólico de la parte aérea seca. Por otro lado, estigmasterol, β -sitosterol, lupeol y campesterol han sido obtenidos de diferentes partes de la planta. Misra y colaboradores (1997), aislaron los hidrocarburos lineales *n*-triacontano, *n*-triacontan-6-ona y 5-hidroxitetratriacontan-9-ona de esta especie.^[50]

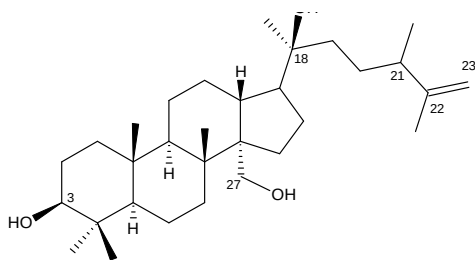


Figura 43.21-metildammaran-22-en-3 β ,18,27-triol^[49]

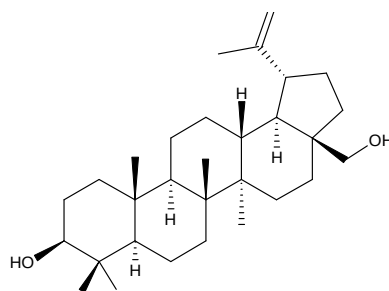


Figura 44.Betulina^[41]

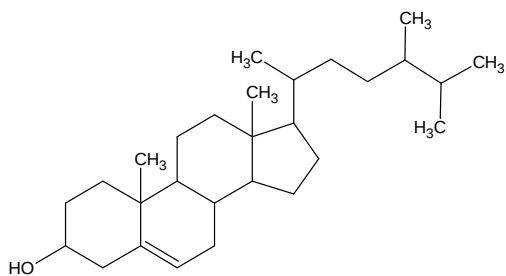


Figura 45. Campesterol^[50]

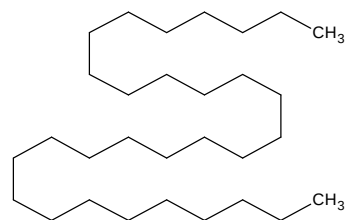


Figura 46. *n*-triacontano^[50]

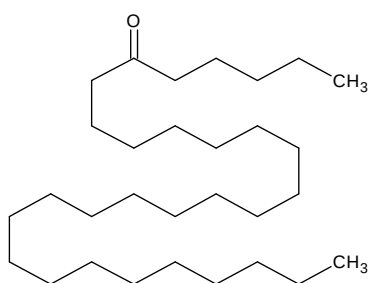


Figura 47. Triacontan-6-ona^[50]

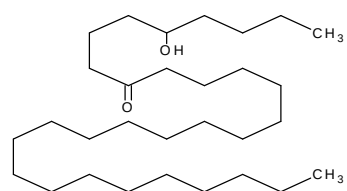
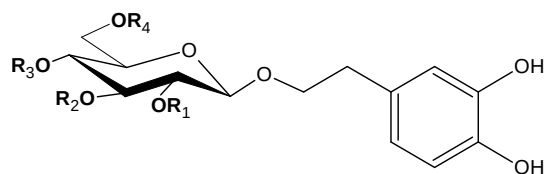


Figura 48. 5-hidroxitetraatriacontan-9-ona^[50]

2.1.7.2.5. Feniletanoides

Chiobouaphong y colaboradores (2012), trataron el extracto metanólico de las partes aéreas de *R. tuberosa* con agua seguido de dietiléter y purificación en una columna empacada con Danion HP-20 empleando los eluentes H₂O, MeOH y acetona, sucesivamente. De la fracción metanólica se aisló e identificó la siguiente serie de feniletanóides.^[51]



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
H	Rha	Caff	H	Verbascósido
H	Rha	H	Caff	Isovervascósido
H	Api	Caff	H	Nuomibiósido
H	Api	H	Caff	Isonumobiósido
H	Rha	Caff	Api	Forsitósido B
H	Api	Caff	Api	Pauciflósido
Rha	Rha	Caff	H	Cassifoliósido
Rha	Rha	H	Caff	Isocassifoliósido

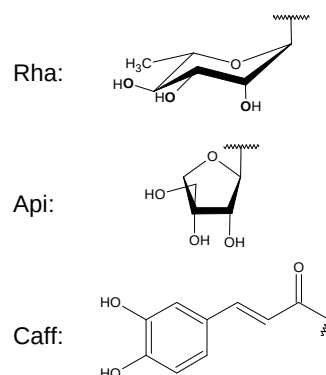


Figura 49. Compuestos feniletanóides encontrados en *R. tuberosa*^[51]

2.2.- Cuantificación de metabolitos secundarios por densitometría óptica sobre placas de Cromatografía de Capa Fina de Alta Eficiencia (HPTLC, siglas en inglés).

Chothani y colaboradores (2011), cuantificaron un compuesto terpenico que se identificó como un marcador del perfil fitoquímico de *Ruellia tuberosa*, denominado RT-F2. Este metabolito se cuantificó utilizando el método de HPTLC y para ello, se preparó una solución madre de 500 µg/mL de un estándar de β-sitosterol en cloroformo. Se analizaron los extractos de acetato de etilo y éter de petróleo (que resultaron ser los extractos de la planta en donde se observó por TLC que contenían el compuesto de interés en mayor concentración, se puede observar en la figura 1) de concentración de 2 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente^[36].

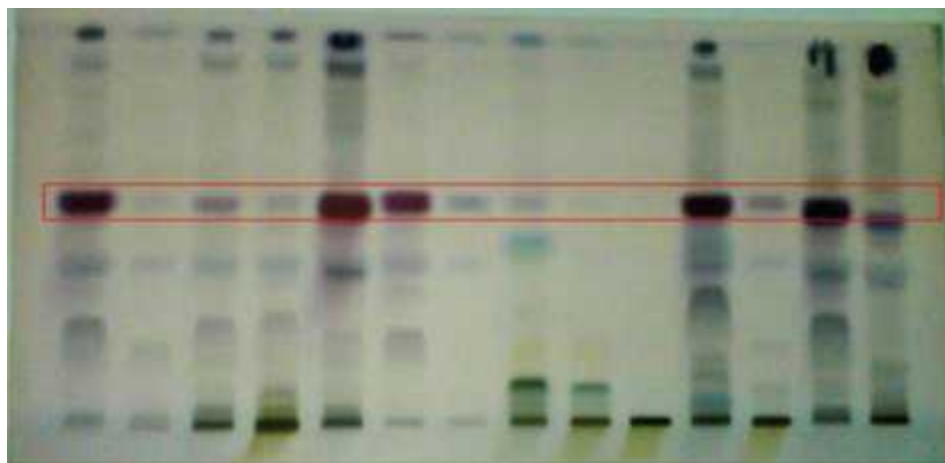


Figura50. Primera huella de izquierda a derecha pertenece al extracto de éter de petróleo.^[36]

Se realizó una curva de calibración utilizando unas soluciones del estándar donde se aplicaron entre 2,5-12,5µL sobre la placa de sílica gel G. para producir un rango de 1,25-6,25µg de β -sitosterol por punto de aplicación.

Se aplicó 10 µL de cada extracto, la fase móvil utilizada fue cloroformo-tolueno-acetato de etilo (6:3:1; v/v/v), la fase estacionaria fue una placa cubierta de sílica gel G 60 F254. Se utilizó un aplicador de marca CAMAG LINOMAT5. La placa fue desarrollada en un recipiente de doble cámara. La detección se realizó con anisaldehído- ácido sulfúrico y se calentó la placa por 5 minutos a 110°C. La misma fue escaneada antes de rociar con el agente de detección a 366nm y luego de rociada a 600nm. La coloración que se observó con el agente de tinción fue un púrpura-violeta con un valor de Rf de 0,56 y se determinó que pertenecía al grupo de los terpenos.

En la cuantificación, se encontró que el compuesto β -sitosterol está en un rango de porcentaje de 40,0% a 44,6% en los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo respectivamente, como se puede observar en la Tabla 2.2^[36].

Tabla 2.2. Resultados del análisis estadístico del método HPTLC.^[36]

Huella	R _f	Concentración de β-sitosterol	Altura del pico	Calculado de β- sitosterol	Área del pico	Calculado de β- sitosterol
1	0,57	1,250μg	51,72		641,96	
2	0,56	2,500 μg	48,37		1005,73	
3	0,56	3,750 μg	71,26		1446,38	
4	0,56	Desconocido*	73,75	3,758 μg	1558,45	4,006 μg
5	0,57	Desconocido**	158,38	>6,875 μg	3246,91	>6,875 μg
6	0,57	5,000 μg	86,79		1945,75	
7	0,58	6,250 μg	110,10		2313,74	

*Extracto de éter de petróleo; ** Extracto de acetato de etilo

De Freitas (2012), logró cuantificar en las raíces de la especie *Hydrastis canadensis*, el alcaloide berberina; de los frutos de *Crataegus oxycantha*, el flavonoide rutina, y de las raíces de *Echinacea purpurea*, rutina. Para ello, se prepararon soluciones madres de las plantas en metanol con las siguientes concentraciones: 5833,3ppm para *Hydrastis canadensis*; 59800,0ppm *Crataegus oxycantha* y 19800,0ppm *Echinacea purpurea*. La concentración de las soluciones madres de los estándares utilizados fue 2000 ppm para ambos estándares.

Se realizaron las curvas de calibración con las soluciones estándar aplicando 1μL de solución sobre la sílica Gel para cualquiera de los estándares para obtener entre 0,1-0,6μg de berberina en el análisis en *Hydrastis canadensis*; 0,3-0,7μg de rutina para el análisis en *Crataegus oxycantha* y por último, 0,2-0,6μg del flavonoide en *Echinacea purpurea*.

Posteriormente, se aplicó 1μL de solución de los extractos de las plantas sobre la placa de sílica gel, y se utilizó como fase móvil, isopropanol- ácido acético- agua, 90:1:9(v/v/v) para la determinación de berberina y para la determinación de rutina, acetato de etilo-ácido acético- ácido fórmico-agua, 100:10:10:10 (v/v/v); se dejó secar al aire y su detección se realizó utilizando una lámpara UV a la longitud de 254nm, obteniéndose manchas a R_f= 0,14 para berberina en *Hydrastis canadensis*; R_f= 0,53 para rutina en *Crataegus oxycantha* y R_f= 0,63 para rutina en *Echinacea purpurea*.

Los resultados de la cuantificación mostraron un (4,23±0,09 - 4,98±0,20)% de berberina en *Hydrastis canadensis*. Así mismo, *Crataegus oxycantha* mostró un (0,75±0,02 - 0,79±0,03)% de rutina y *Echinacea*

purpurea un(0,44±0,03 - 0,52±0,02)% de rutina. Además, el método mostró ser preciso (CV<5%), exacto (%Recuperación=96,63-105,58%) y lineal ($R^2>0,99$).^[10]

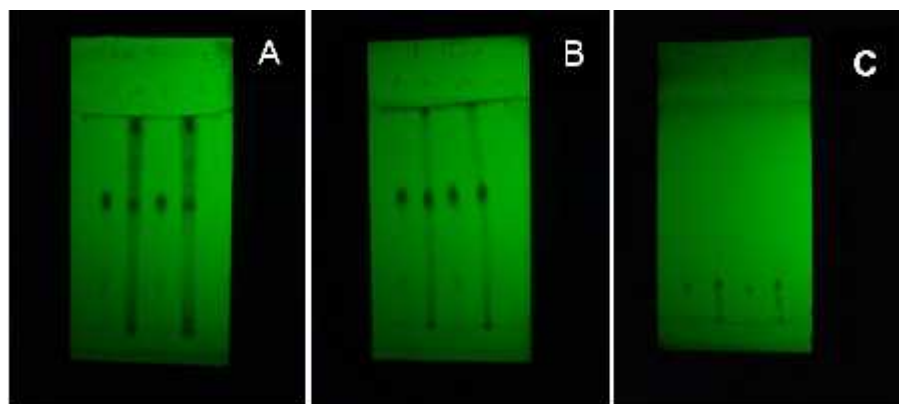


Figura 51. Fotografía de las placas **a)** *Crataegus oxycantha*, **b)** *Echinacea purpurea*, **c)** *Hydrastis canadensis*^[10]

Kamboj y colaboradores (2013), desarrollaron y validaron un método para cuantificar estigmasterol en las hojas y tallos de la especie *Bryophyllum pinnatum* utilizando HPTLC^[52].

Para esta cuantificación se realizó una solución madre de estigmasterol de concentración 1mg/100mL en cloroformo, mientras que, para las muestras de la planta, se utilizó 1g de las hojas y tallos secos y pulverizados en reflujo en un baño de agua con éter de petróleo a (60-80)°C por 5 o 6 horas. El extracto final fue concentrado bajo presión reducida a (50-60)°C y por último disuelto en 10mL de cloroformo. Se asignaron los nombres de B6 para el extracto de las hojas de la especie en éter de petróleo y B7 para el extracto de los tallos en éter de petróleo^[52].

La curva de calibración utilizada para la cuantificación se realizó preparando disoluciones de la solución madre del estándar de estigmasterol con concentraciones dentro de un rango entre 50 a 300 ng por punto de aplicación. La regresión lineal obtenida fue de $0,990 \pm 5,05\%$. Por otro lado, 1g de polvo de las hojas y el tallo de la especie *Bryophyllum pinnatum*, fue tratado con 50 mL de éter de petróleo que se concentró y trató con cloroformo, la solución resultante se centrifugó a 3000rpm por 15min y el sobrenadante se utilizó para el análisis). La fase móvil utilizada fue la mezcla de cloroformo-etanol (9,8:0,2 v/v) y el agente revelador para la placa fue una solución de ácido sulfúrico al 5% en metanol y fue escaneada a una longitud de onda 490nm. El porcentaje de estigmasterol encontrado en la especie *B.*

pinnatum fue de $0,1545 \pm 0,005$ mg/100mg para las hojas y $0,1383 \pm 0,002$ mg/100mg para los tallos con un CV del 2% para ambos casos. ^[52]

2.3.- Justificación.

Ruellia tuberosa es una especie ampliamente estudiada de la cual se han aislado e identificado metabolitos secundarios conocidos por sus propiedades medicinales, es por esto que el presente trabajo se enfocó en cuantificar los metabolitos mayoritarios presente en las fracciones solubles en metanol-agua, insolubles en acetona, por la técnica de densitometría óptica utilizando placas de HPTLC. Adicionalmente, se realizó la evaluación de la actividad sobre glucosa-6-fosfatasa de las fracciones en las cuales se determinó la presencia de estos metabolitos con el fin de determinar si existe una relación entre la presencia de estos y una posible actividad hipoglicemiante.

3.-OBJETIVOS

3.1.-Objetivo general

Cuantificar β -sitosterol, lupeol y rutina por densitometría óptica mediante HPTLC en las fracciones C (solubles en metanol-agua, insolubles en acetona) de *Ruellia tuberosa* L. y evaluar la inhibición de la actividad enzimática de G6Pasa.

3.2.-Objetivos específicos

- Separar la fracción flavonoidal y terpenoidal de las raíces y parte aérea de *Ruellia tuberosa*.
- Cuantificar los marcadores flavonoidales y terpenoidales presentes en las fracciones por HPTLC.
- Cuantificar los terpenos totales como miliequivalentes de β -sitosterol y lupeol, presentes en la fracción terpenoidal de *Ruellia tuberosa* L. por HPTLC.
- Evaluar la actividad sobre glucosa-6-fosfatasa de las fracciones y sub-fracciones de *Ruellia tuberosa* de raíces y parte aérea.

4.-MÉTODO EXPERIMENTAL

4.1.- Materiales

4.1.1.- Material Vegetal:

Para éste trabajo se seleccionó la parte aérea y raíces de *Ruellia tuberosa* L. Los ejemplares a trabajar de esta planta se recolectaron en junio de 2008, en la Ciudad Universitaria, al lado de la biblioteca de Ingeniería Ambiental de la Universidad Central de Venezuela, en la ciudad de Caracas, Distrito Capital. Un espécimen de la planta fue depositado en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. La identificación y almacenamiento, de una muestra testigo (MYF 26390), fue realizada por el Dr. Stephen Tillett del Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

4.1.2.- Solventes y reactivos utilizados en la realización de esta investigación:

Solventes

- Acetona P.A
- *n*-Butanol P.A.
- *t*-Butilmetiléter P.A.
- Tetrahidrofurano P.A.
- Acetato de etilo P.A.
- Cloroformo P.A.
- Etanol P.A.
- Fórmico
- Ácido trifluoroacético
- Metanol (P.A y grado técnico)
- Agua destilada
- Hexano
- Acetato de etilo
- Ácido

Reactivos

- Yodo
- Sílica gel
- Vainillina
- Anisaldehído
- Sulfatocérico
- Ác.sulfúrico

4.1.3.-Reactivos para bioensayos:

- Ácido ascórbico.
- Ácido sulfúrico.
- Albúmina bovina.
- Carbonato de sodio.
- Cloruro de sodio.
- Cloruro de magnesio.
- Dimetilsulfóxido.
- Dodecilsulfato de sodio.
- EDTA.
- Floricina.
- Folin Ciocalteus.
- Tartrato de sodio y potasio.
- Sulfato cúprico
- Fosfato diácido de potasio.
- Glucosa-6-fosfato.
- HEPES.
- Heptamolibdato de amonio.
- Hidróxido de sodio.
- Histona II-A
- Kit para la determinación enzimática de glucosa (Glucosa oxidasa, Peroxidasa, Antipirina y Fenol)
- Sacarosa.

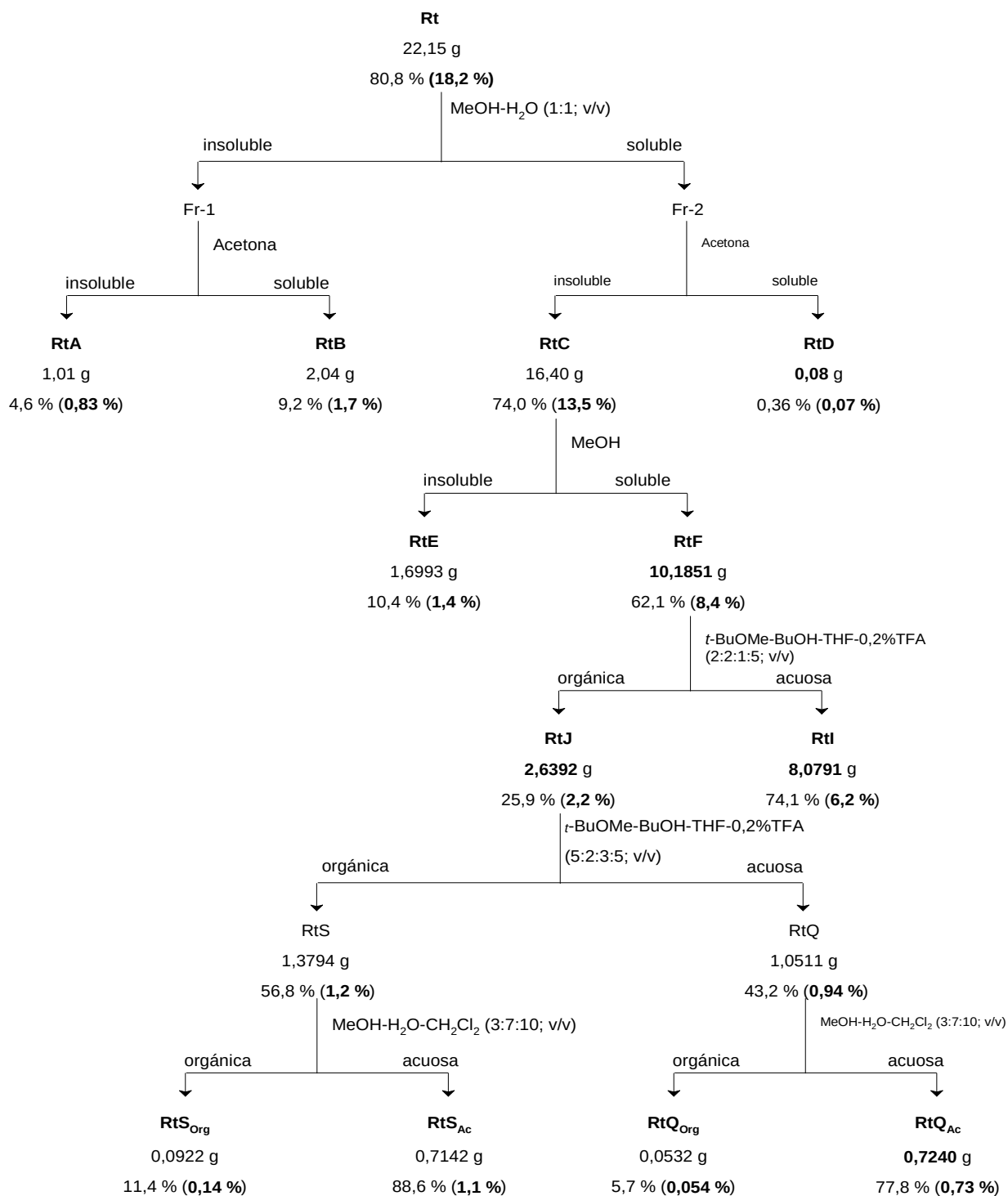
4.2.- Preparación del extracto metanólico:

Las partes aéreas y raíces de la especie *Ruellia tuberosa*, se secaron al aire por varios días, luego se molieron para obtener, por separado, la parte aérea y las raíces del material vegetal a trabajar. Después que el material vegetal fue secado y molido se sometió a una percolación, con metanol por una semana, este proceso se repitió por triplicado. Se concentró al vacío, para obtener el extracto metanólico de las raíces y las partes aéreas.

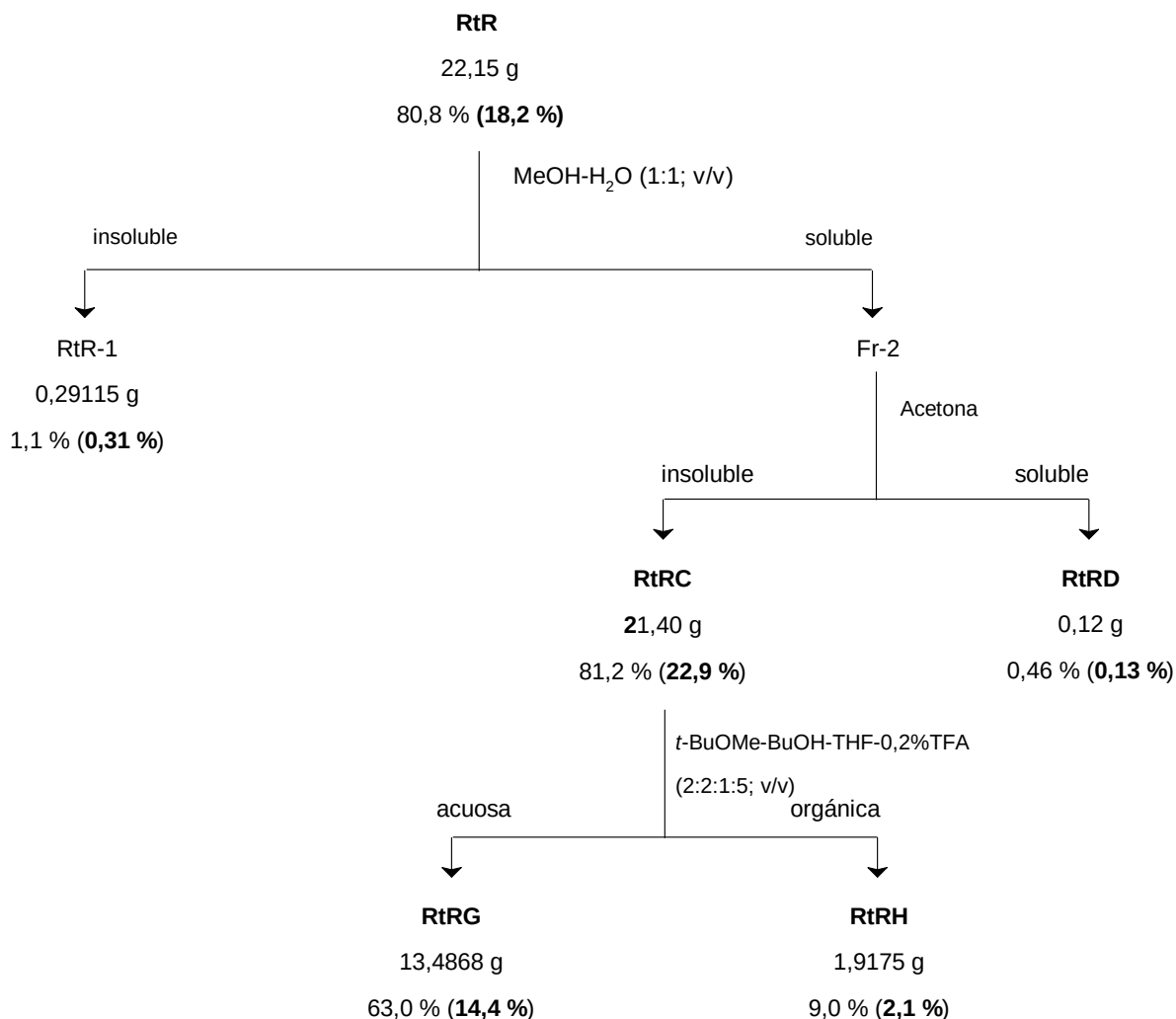
4.3.- Fraccionamiento propuesto del material vegetal:

El fraccionamiento inicial que se realizó en esta investigación ha sido empleado exitosamente en nuestro laboratorio para la obtención de metabolitos secundarios de diferentes polaridades que se sospecha inhiben el sistema enzimático G6Pasa.

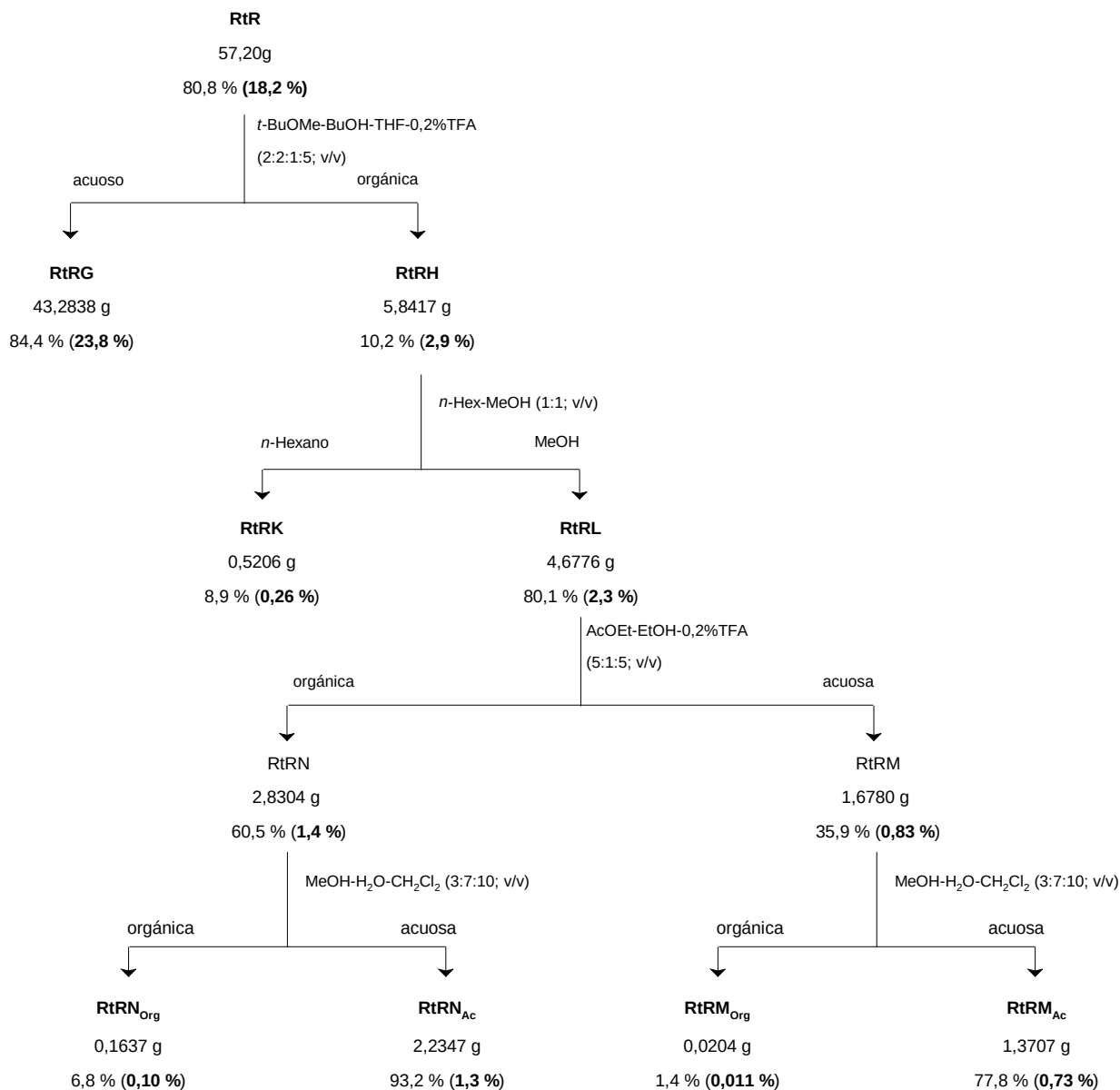
Este fraccionamiento fue el que dio origen a las fracciones C tanto de las partes aéreas (Esquema 4.1) como para las raíces (Esquema 4.2 y Esquema 4.4) de *Ruellia tuberosa* L. Luego, se realizó la purificación de estas fracciones para obtener las sub-fracciones enriquecidas de los metabolitos de interés que permitieron su cuantificación.



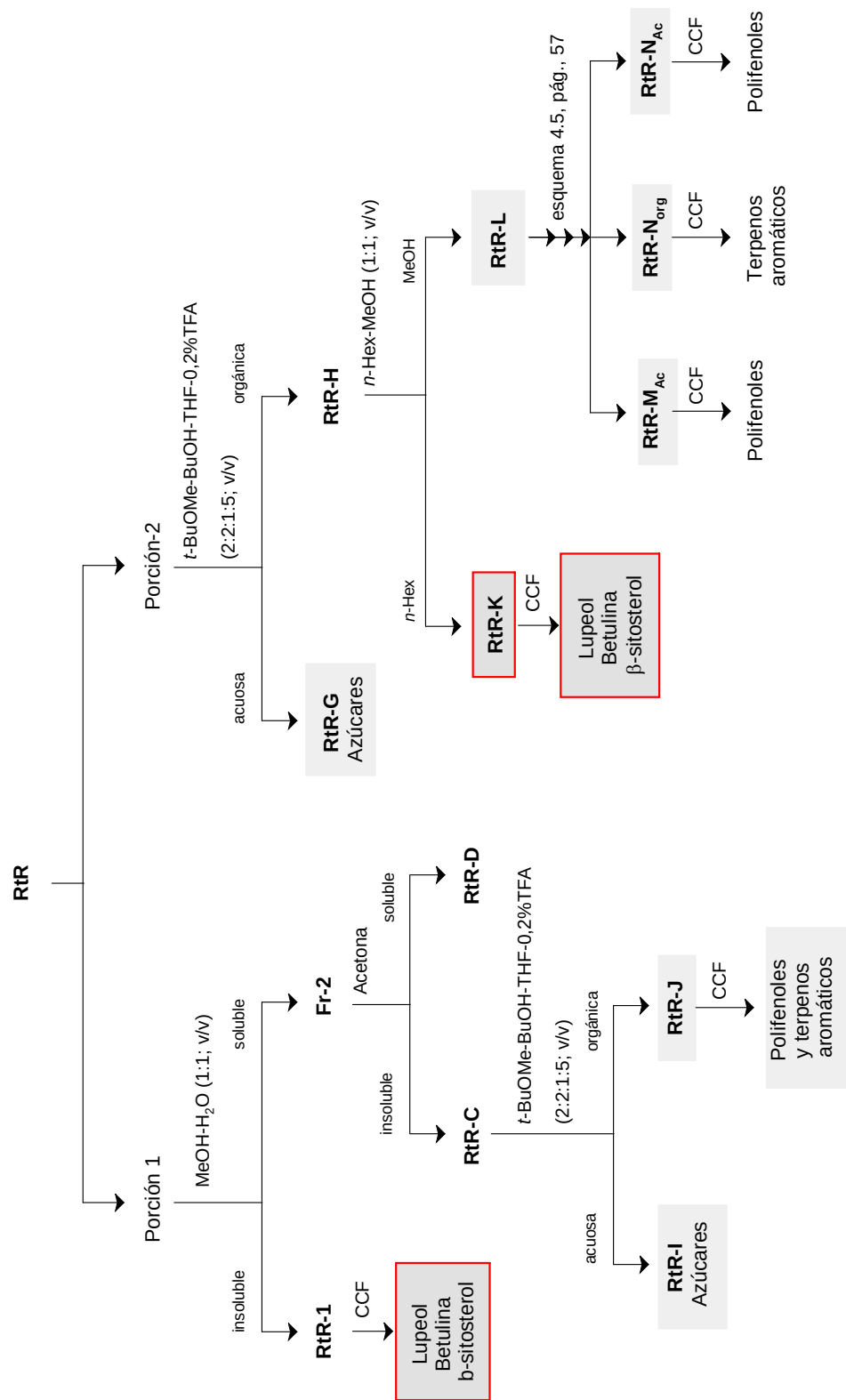
Esquema 4.1. Fraccionamiento del extracto metanólico de las partes aéreas de *Ruellia tuberosa* L. (Los valores de porcentajes representan el fraccionamiento con respecto al extracto metanólico y los valores porcentaje dentro de () se refieren al material vegetal inicial.)



Esquema 4.2. Fraccionamiento del extracto metanólico de las raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Los valores de porcentajes representan el fraccionamiento con respecto al extracto metanólico y los valores porcentaje dentro de () se refieren al material vegetal inicial.)



Esquema 4.3. Fraccionamiento mejorado del extracto metanólico de las raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Los valores de porcentajes representan el fraccionamiento con respecto al extracto metanólico y los valores porcentaje dentro de () se refieren al material vegetal inicial.)



Esquema 4.4 Fraccionamiento del extracto de metanólico de las raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Los valores de porcentajes representan el fraccionamiento con respecto al extracto metanólico y los valores porcentaje dentro de () se refieren

4.4.-Análisis cualitativo del fraccionamiento de las partes aéreas y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Fracciones RtR-C y RtC (insolubles en MeOH-H₂O, insolubles en acetona)

Conociendo que las fracciones RtR-C y RtC están conformadas básicamente por azúcares, terpenos aromáticos y polifenoles en diferentes proporciones, se desarrolló un esquema de separación para cada una de ellas (Esquemas 4.1 y 4.2).

Inicialmente, el contenido glicosídico fue eliminado por partición en el sistema de solventes *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA (2:2:1:5; v/v/v/v) favoreciendo la distribución en la fase orgánica de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico y en las fracciones C de las diferentes partes de la planta, mientras que el contenido glicosídico permanece en la fase acuosa. Otra forma en que se eliminó el contenido glicosídico fue por el tratamiento con MeOH de la fracción RtC, obteniéndose un sólido y una pasta higroscópica denominados RtE y RtF, respectivamente (Esquema 4.1).

La fracción RtF fue particionada con el sistema de solventes *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA (2:2:1:5; v/v/v/v) donde la fase orgánica denominada RtJ presentó el mismo patrón cromatográfico por HPLC que el extracto metanólico Rt (Figura 52); es decir, el fraccionamiento de Rt para la obtención de RtJ fue eficiente para obtener una fracción enriquecida en los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico Rt. Además, se eliminó el contenido glicosídico presente en Rt.

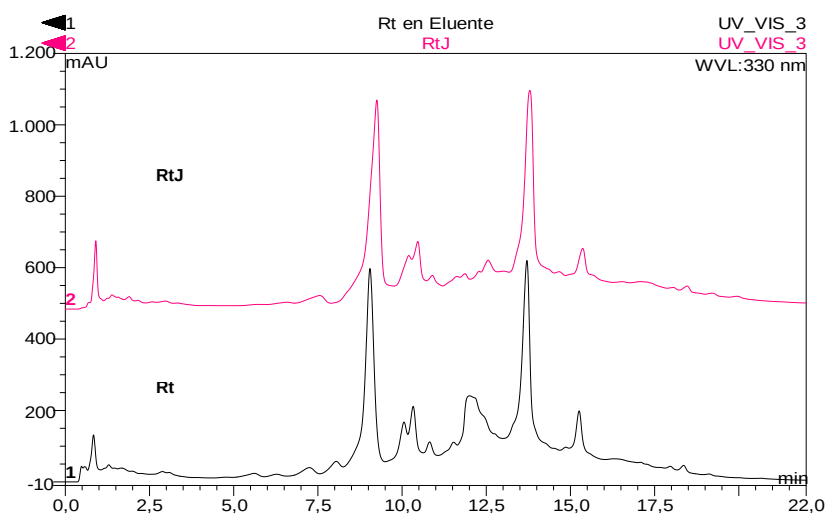


Figura 52. Cromatogramas de HPLC del extracto metanólico Rt y la fracción RtJ, detección: 330 nm.

La fracción RtJ fue rica en metabolitos secundarios polares cuyo comportamiento por CCF fue comparable al obtenido con RtD (Esquema 4.1).

El fraccionamiento de RtJ fue seguido por CCF y HPLC. Inicialmente, las fracciones RtS y RtQ presentan ligeras diferencias en cuanto al número de picos obtenidos por HPLC (Figura 54), mientras que por CCF se observó que la fracción RtS (carril 6), presentó mayor número de manchas terpenoidales (placas reveladas con anisaldehído-ácido sulfúrico con coloración moradas) que RtQ (carril 5), (Figura 53). El tratamiento de partición para ambas fracciones en el sistema MeOH-H₂O-CH₂Cl₂ (3:7:10; v/v/v), fue útil para obtener fracciones enriquecidas en terpenos aromáticos (RtS_{org}, RtQ_{org}), y polifenoles (RtS_{ac}, RtQ_{ac}). Las características terpenoidales y polifenólicas fueron determinadas por CCF usando el reactivo de anisaldehído-ácido sulfúrico, mientras que las características aromáticas a través de los espectros de UV-Vis obtenidos por HPLC para cada pico cromatográfico (Figura 55).



Figura 53. Placa de CCF en donde se evidencia la separación de las fracciones RtQ y RtS. Donde 1: RtR-N (fracción de la fase orgánica proveniente de RtR-L luego de separarla con el sistema de solvente (AcOEt-EtOH-0,2xTFA (5:1:5 v/v)); 2: RtR-N_{ac} (fracción acuosa de la separación de RtR-N con la mezcla MeOH-Hex (1:1 v/v)); 3: RtR-N_{or} (fracción orgánica de la separación de RtR-N con la mezcla MeOH-Hex (1:1 v/v)); 4: RtJ (fracción proveniente del fraccionamiento de RtC la parte soluble y luego fraccionar la misma con el sistema t-BuOMe-n-BuOH-THF-0,2xTFA (2:2:1:5 v/v) la fase orgánica); 5: RtQ (fraccionamiento de la parte aérea proveniente de la separación RtJ en la fase acuosa); 6: RtS (fraccionamiento de la parte aérea proveniente de la separación RtJ en la fase orgánica). Sistema de solvente empleado para CCF: AcOEt-HCOOH-MeOH-H₂O (100:10:10:10 v/v). Agente revelador: Ácido sulfúrico-Anisaldehído.

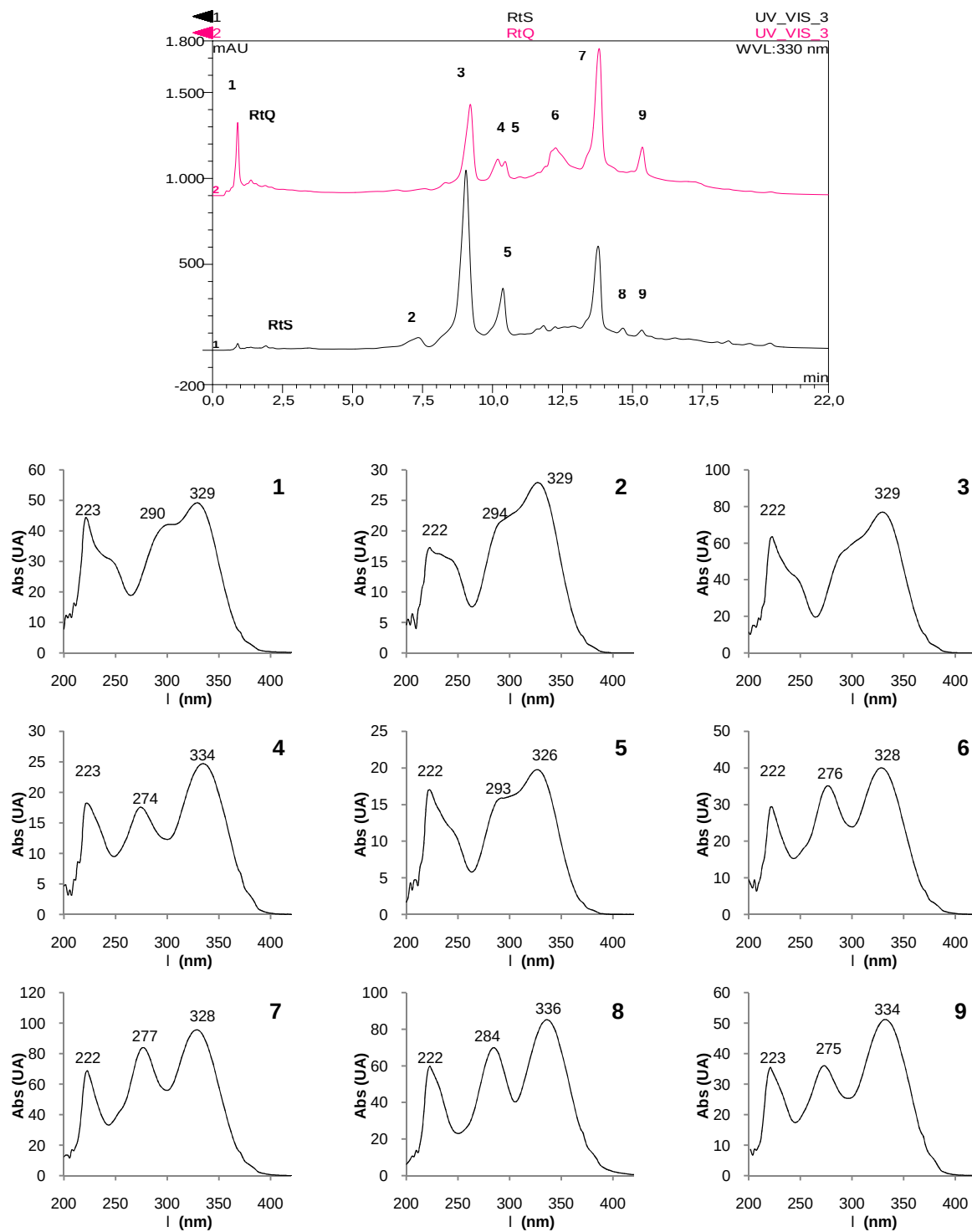


Figura 54. Cromatograma HPLC comparativo de RtS y RtQ y espectros de UV de los compuestos en las fracciones.

Las fracciones RtS y RtQ fueron tratadas con un sistema de solventes MeOH-H₂O (3:7; v/v) de manera de separar en dos subfracciones los dos tipos de metabolitos encontrados en cada una de ellas y así obtener fracciones enriquecidas en un solo tipo de metabolito. Las subfracciones pertenecientes a la capa orgánica se denominaron RtS_{org} y RtQ_{org}, mientras que, las subfracciones que pertenecen a la capa acuosa se denotaron RtS_{ac} y RtQ_{ac}. Las Figuras 55 y 56 muestran los cromatogramas comparativos por HPLC de las fracciones orgánicas y acuosas provenientes de RtS y RtQ, así como sus espectros UV mostrando el perfil de las composiciones de las fracciones y el enriquecimiento de estas en los componentes durante su separación evidenciando la efectividad de la separación.

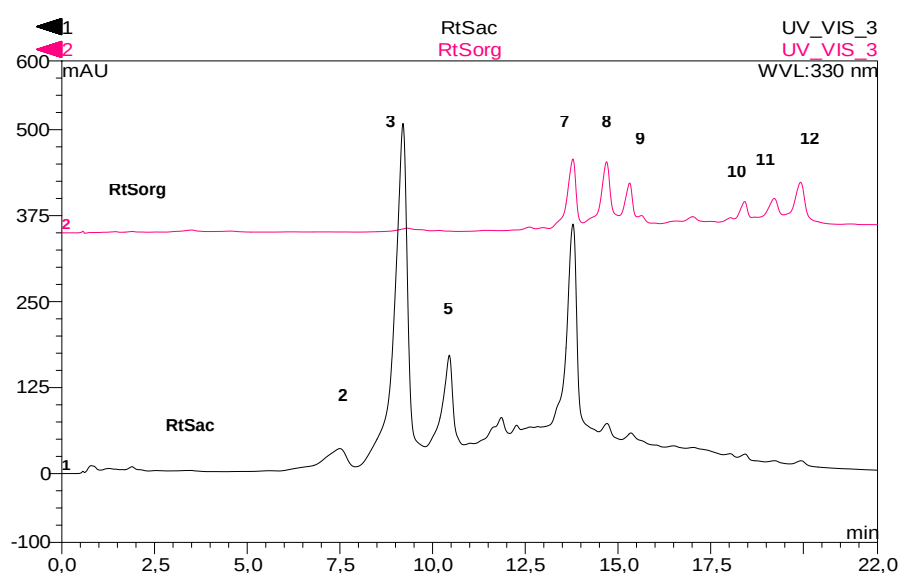


Figura 55. Cromatograma HPLC de las fracciones polifenólica (RtS_{ac}) y terpenoidal (RtS_{org}) provenientes de RtS. Así como los espectros UV-Vis de los distintos picos cromatográficos

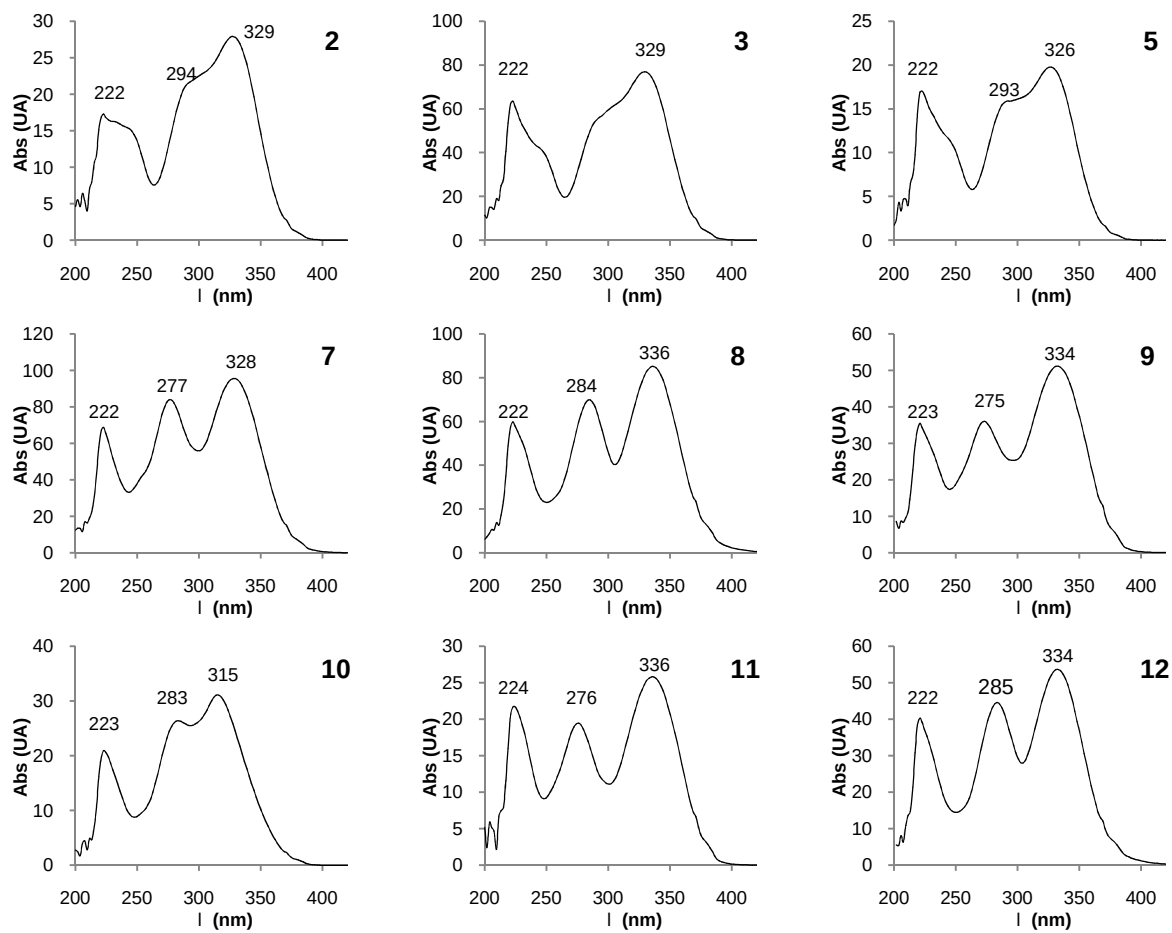


Figura 55. (Continuación)

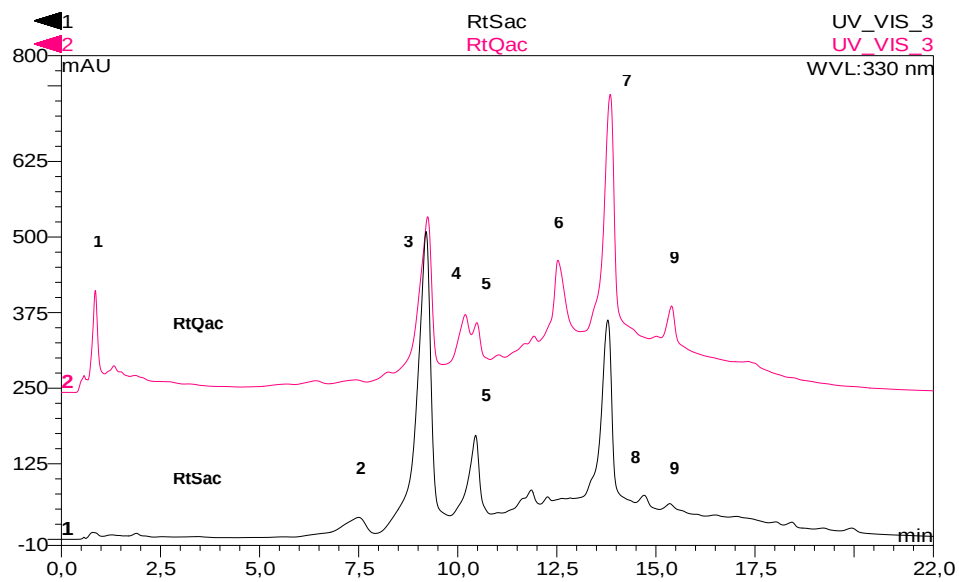


Figura 56. Cromatogramas HPLC comparativo para las fracciones RtS_{ac} y RtQ_{ac} , enriquecidas en polifenoles.

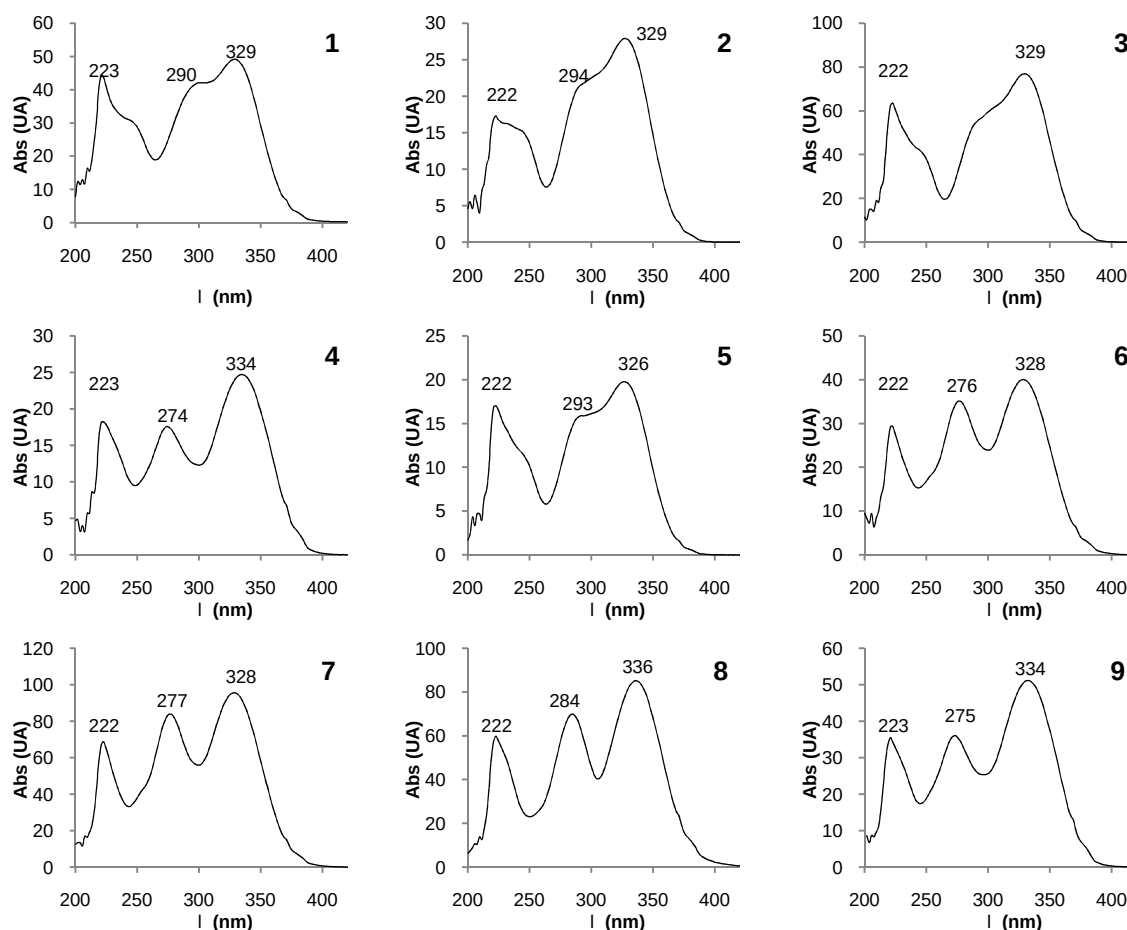


Figura 56.Continuación...

Utilizando el mismo protocolo de fraccionamiento de RtJ a partir de RtF, se realizó la partición de la fracción RtR-C (raíces) con el sistema de solventes *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA (2:2:1:5; v/v/v/v), para obtener una fase acuosa como una pasta higroscópica rica en azúcares denominada RtR-I, mientras que la fase orgánica se denominó RtR-J (Esquema 4.2). La fracción RtR-J fue rica en metabolitos secundarios polares cuyo comportamiento por CCF fue comparable al obtenido en la fracción RtR-D.

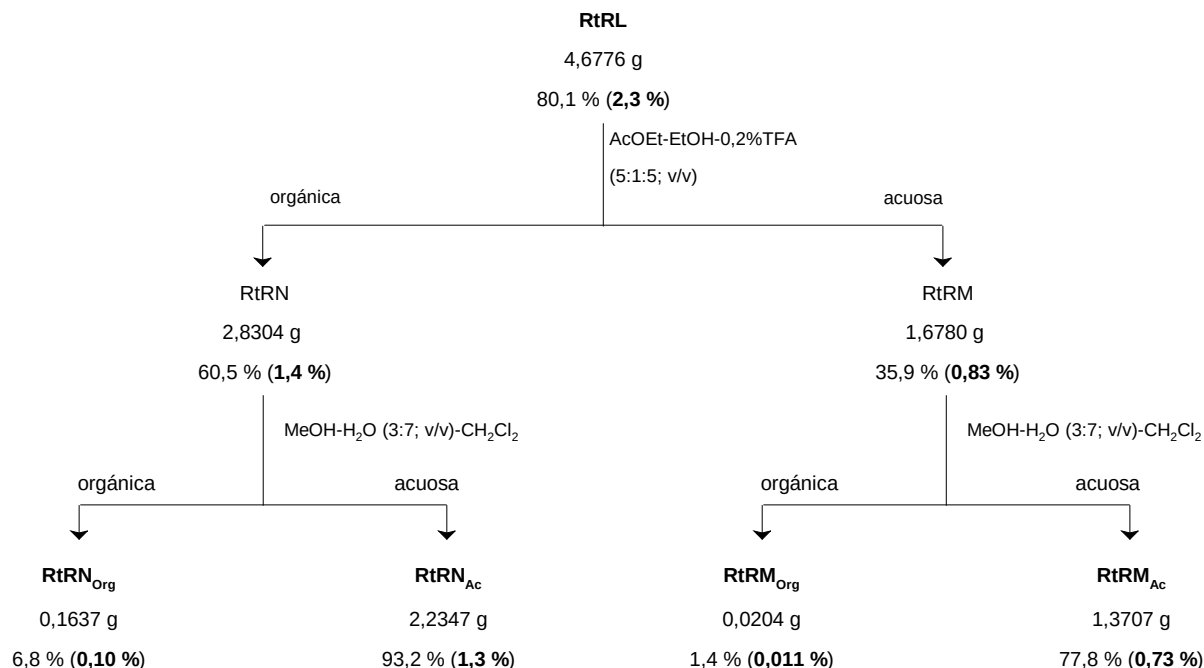
La obtención de la fracción RtR-J (Esquema 4.2), condujo al fraccionamiento directo del extracto metanólico de las raíces (RtR) permitiendo la eliminación del contenido glicosídico en un sólo paso a través de la partición con el sistema de solventes conformado por (*t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-0,2%TFA: 2:2:1:5; v/v/v/v), obteniendo la fase acuosa como una pasta higroscópica rica en azúcares la cual fue

rotulada como RtR-G, mientras que la fase orgánica, enriquecida en metabolitos secundarios polares y no polares, fue rotulada como RtR-H (Esquema 4.2).

El fraccionamiento de RtR-H en metabolitos polares y no polares se sometió a una partición en la mezcla *n*-Hex-MeOH (1:1; v/v). Así, la fase de *n*-hexano produjo una fracción rica en metabolitos no polares, nombrada como RtR-K, resultando una pasta higroscópica de color rojiza constituida principalmente por lupeol y β -sitosterol, y en menor proporción, betulina (Figura 57), (ver resultados de cuantificación en la sección 4.4.2). Los compuestos fueron identificados por CCF comparativo con muestras auténticas con valores de R_f de 0,55, 0,42 y 0,37, respectivamente. Por otra parte, la fase metanólica fue denominada como RtR-L y resultó ser rica en metabolitos polares (mayormente terpenos aromáticos y polifenoles).



Figura 57. Placa de CCF en donde se identificaron los compuestos existentes en mayor proporción en la fracción RtR-K. Donde, 1: RtR-K; 2: β -sitosterol; 3: betulina; 4: lupeol. Sistema de solvente: Hex-AcOEt-HCOOH (75:25:1 v/v). Agente revelador: Anisaldehído- Ácido sulfúrico



Esquema 4.5. Fraccionamiento de RtR-L de las raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Los valores de porcentajes representan el fraccionamiento con respecto al extracto metanólico y los valores porcentaje dentro de () se refieren al material vegetal inicial.)

La fracción RtR-L (Esquemas 4.2 y 4.3), presentó básicamente la misma composición que la fracción RtR-J (Esquema 4.2), por lo que su separación preliminar entre los metabolitos terpenoidales aromáticos y los polifenoles (Esquema 4.3), se realizó de forma análoga al fraccionamiento de RtJ anteriormente descrito. Este fraccionamiento produjo fracciones enriquecidas en: terpenos aromáticos (RtR-Morg, RtR-Norg) que mostró, al desarrollar la CCF con AN-6 y revelada con anisaldehído-ácido sulfúrico, la coloración morada, característica de terpenos, mientras que, en los espectros de UV correspondientes a los picos cromatográficos obtenidos por HPLC, se observan señales características de anillos en señales de 330 nm aproximadamente que corresponden a las bandas I de anillos aromáticos conjugados, y polifenoles (RtR-Mac, RtR-Nac). Las fracciones terpenoidales aromáticas representaron el 1,4 y 6,8 % respecto de las fracciones RtR-M y RtR-N, respectivamente (Esquema 4.5). Mientras que, las fracciones polifenólicas (RtR-Mac, RtR-Nac) representaron el 91,3 y 93,2 % respecto de sus fracciones de origen. Adicionalmente, presentaron ligeras diferencias por HPLC (Figura 52b.).

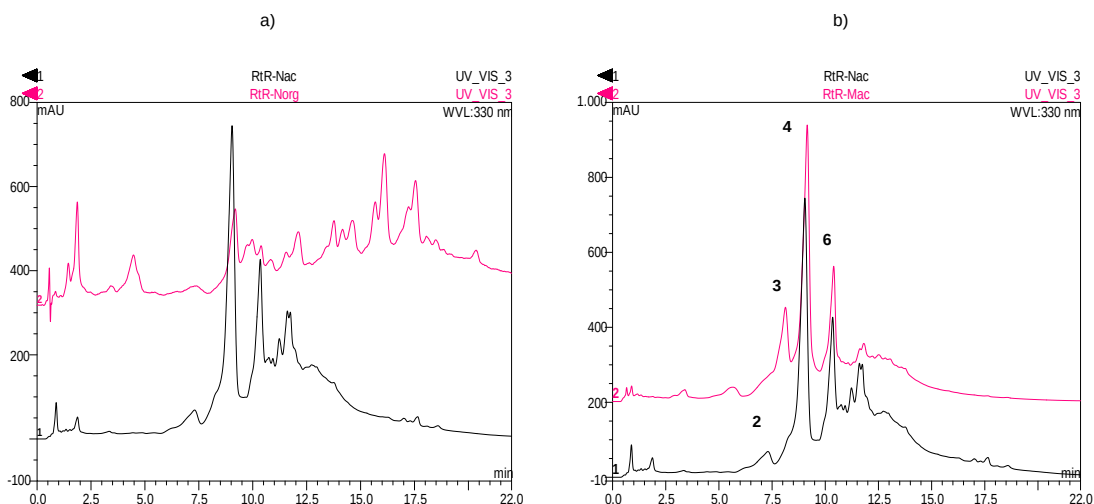


Figura 58. Cromatograma por HPLC-sistema-1 de fracciones provenientes de las raíces de *R. tuberosa* L. (Esquema 4.5, pág., 81), $\lambda = 330$ nm: a) RtR-Nac, RtR-Norg; b) RtR-Mac, RtR-Nac.

Durante el fraccionamiento de las partes aéreas de *Ruellia tuberosa* L., se obtuvieron fracciones conformadas por: clorofila y terpenoides alifáticos (RtB); terpenoides aromáticos (RtQ_{org}, RtS_{org}), polifenoles (RtQ_{ac}, RtS_{ac}) y glicosidos (RtE y RtI). Mientras que, en el fraccionamiento de las raíces de *R. tuberosa* L., se obtuvieron fracciones conformadas por terpenoides alifáticos (RtR-1 y RtR-K); terpenoides aromáticos y polifenoles (RtR-J); terpenoides aromáticos (RtR-M_{org}, RtR-N_{org}) y polifenoles (RtR-M_{ac}, RtR-N_{ac}) y glicosidos (RtR-I y RtR-G).

4.5.-Análisis cuantitativo de los metabolitos existentes en las raíces de *Ruellia tuberosa* L.

4.5.1.- Preparación de la solución madre de β -sitosterol y lupeol.

Se prepararon soluciones madres de los estándares para la cuantificación, utilizando muestras comerciales purificadas en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela. La Tabla 4.1 muestra las concentraciones utilizadas para la cuantificación.

Tabla 4.1.- Disoluciones madres utilizadas en la cuantificación de lupeol y β -sitosterol por densitometría óptica en la fracción RtR-K.

Muestra	Masa ($\pm 0,01^a$ mg)	Vfinal (μ L)	[M] _c (mgL ⁻¹) ^b	CV (%) ^c
Lupeol	2,11	5000 $\pm$ 25	422 $\pm$ 4	0,84
β -sitosterol	3,50	4000,0 $\pm$ 0,4	875 $\pm$ 4	0,40
RtR-K	1,89	5000 $\pm$ 25	378 $\pm$ 4	0,96
RtR-K	2,00	2000,0 $\pm$ 0,3	1000 $\pm$ 7	0,71

a) Error real $\sqrt{0,002}$ mg (5); b) Los cálculos para las concentraciones y su error se realizaron empleando las ecuaciones (8) y (9), respectivamente, pág. 1, anexos; c) Se calculó a través de la ecuación (2) pág., 30.

Se prepararon dos soluciones de la fracción RtR-K ya que para ambos metabolitos a cuantificar no se pudo encontrar una sola concentración de trabajo que permitiera la cuantificación de buenos resultados.

4.5.2.- Metodología para el desarrollo cromatográfico.

Las soluciones de la muestra y patrones se aplicaron en la parte inferior de la placa en forma de puntos, manteniendo una distancia aproximada de 5 mm entre ellos. La siembra se realizó mediante una microjeringa de 10 μ L. La placa se introdujo verticalmente en una cámara de CCF saturada previamente con los vapores de la fase móvil seleccionada. Cuando el frente del eluyente recorrió una distancia de aproximadamente 5cm desde el punto de aplicación, se retiró la placa y se dejó secar al aire libre, se aplicó un agente revelador (anisaldehído-ácido sulfúrico) con ayuda de un rociador y luego se calentó en una estufa a una temperatura controlada de 110 °C, durante 2 minutos. Posteriormente, se digitalizó la imagen de la placa utilizando un escáner marca EPSON.

4.5.3.- Metodología para la cuantificación de los metabolitos.

Se aplicó 3 y 5 μ L de muestra y patrones en la placa de CCF, respectivamente. Posteriormente, se efectuó el desarrollo cromatográfico correspondiente. Hecho esto, se procedió a digitalizar la imagen de la placa para los diferentes metabolitos y réplicas de cada análisis, la cuales se almacenaron en un ordenador y se realizó el análisis a través de un software desarrollado por el Laboratorio de

Espectroscopia Laser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela a través del programa MATLAB 7.5.0 (en este trabajo se denominará UCV-Software, por razones de simplicidad).

4.5.4.- Metodología para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación de desarrollado.

La metodología para la determinación de la reproducibilidad fue semejante a la empleada para la cuantificación de los metabolitos, con algunas modificaciones. Para el estudio de *Ruellia tuberosa* L., se aplicó en la placa 3 y 5 μL de la solución de la muestra y patrones, respectivamente. Se desarrolló la placa utilizando la fase móvil denominada AN-6 (*n*-Hex-AcOEt-HCOOH; 75:25:1; v/v/v), se dejó secar al aire libre y se reveló utilizando como agente de coloración una solución de anisaldehído en ácido sulfúrico. Se digitalizó la imagen y se analizó con el UCV-software. Una vez que se obtuvo el área de los picos de los metabolitos de interés en cada placa cromatográfica, se procedió a determinar el coeficiente de variación. La reproducibilidad fue medida empleando 4 y 3 placas para β -sitosterol y lupeol, respectivamente. Las tablas 4.3 y 4.7, muestran los resultados de reproducibilidad para la cuantificación de lupeol y β -sitosterol, respectivamente. El modelo de la placa que se utilizó se muestra en la Figura 59.

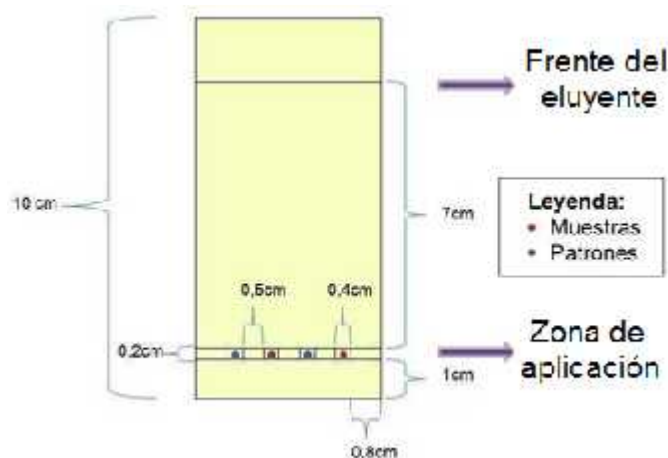


Figura 59. Modelo de placa a emplear para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación desarrollado.^[10]

4.5.5.- Determinación de la exactitud del método.

En este trabajo, se determinó la recuperación midiendo la concentración del patrón 3 de las curvas de calibración utilizadas para la cuantificación del metabolito (patrón de 62,6 ppm del análisis de β -sitosterol en *Ruellia tuberosa* L.). Este patrón fue seleccionado ya que corresponde a uno de puntos intermedios de la curva de calibración. Con los datos de los otros patrones de cuantificación, se realizaron nuevas curvas de calibración (4 réplicas por placa y 4 placas de CCF por metabolito), excluyendo el patrón 2 (las curvas de calibración se muestran en el anexo). Con estas curvas, se interpoló el valor del área del pico del patrón seleccionado para obtener la concentración que indica el método, la cual se relacionó con la concentración real del patrón mediante la ecuación 5, dando como resultado el porcentaje de recuperación.

El rango de porcentaje de recuperación obtenido por este método para β -sitosterol en *Ruellia tuberosa* L., fue (98,3-102)% (véase Tabla 4.2). Estos valores son comparables a los reportados en otras investigaciones con CCFAE (Tabla 4.3), demostrando que el método permite la cuantificación de estos metabolitos con una buena exactitud. Vale la pena acotar que, porcentajes de recuperación mayores a 100% indican interferencias debido a la matriz o errores determinados; recuperaciones menores indican pérdidas de analito durante las fases de preparación y análisis de la muestra ^[53].

Tabla 4.2. Exactitud del método de cuantificación desarrollado.

Placa	Concentración real (ppm)	Concentración Método (ppm)	Error relativo (%)	Recuperación ^a (%)
A	62,6 $\pm$ 0,5	64,3 $\pm$ 0,9	-2,72	102
B		61,9 $\pm$ 0,3	1,12	98,3
C		63,4 $\pm$ 0,6	-1,28	100,7
D		62,2 $\pm$ 0,4	0,64	98,6

a) n= 4

Tabla 4.3: Exactitud reportada por otros autores en sus investigaciones sobre CCFAE.

Autor	Recuperación (%)	Metabolito cuantificado
De Freitas y colaboradores (2010) ^[10]	98,06 - 101,94	Berberina
	98,18-105,58	Rutina
	97,80 - 102,43	Rutina
Kamboj y colaboradores (2013) ^[52]	96,77 - 99,74	Estigmasterol
Kamal y colaboradores (2013) ^[54]	98,84 – 102,59	Podofilotoxina
	97,66 – 102,51	Etopósido
Rathee y colaboradores (2011) ^[55]	99,22 - 100,81	Estimasterol
	99,42 – 100,11	Lupeol
Al-Massarani y colaboradores (2016) ⁵⁶	98,57 – 99,64	B-sitosterol glicosidado

4.5.6.-Cuantificación de lupeol en la fracción RtR-K proveniente del extracto metanólico de las raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Las soluciones madre de lupeol y RtR-K fueron preparadas por disolución en THF (Tabla 4.1, pág. 79). A partir de la solución madre de lupeol se prepararon los patrones para realizar la curva de calibración (Tabla 4.2), la concentración y su error fueron determinados a través de las ecuaciones (13) y (14), página 2 del anexo de este trabajo. Para realizar la curva de calibración directa, se determinó el área por cuadruplicado (Tabla 4.3), de tres placas cromatográficas desarrolladas con AN-6 y reveladas con AS (Figura 60). Cada placa contiene 3 μL de la muestra RtR-K de (378 ± 4) ppm y 5 μL de los patrones de lupeol indicados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4.- Concentración de los patrones empleados en la curva de calibración para la determinación de lupeol y β -sitosterol, usando alícuotas de sus respectivas soluciones madres reportadas en la Tabla 4.1.

Patrones	Alícuota tomada (μL)	Volumen de dilución (μL)	Concentración del patrón (ppm) ^a	Error propagado ($\pm\text{ppm}$) ^a	CV (%) ^b
Lupeol					
	$246,0 \pm 0,2$	$1754 \pm 0,2^c$	51,9	0,5	0,903
	$498,0 \pm 0,2$	$1502,0 \pm 0,2^c$	105	1	0,902
	$1000,0 \pm 0,2$	$1000,0 \pm 0,2$	211	2	0,900
β-sitosterol					
	$72,0 \pm 0,2$	$1928,0 \pm 0,2^c$	31,5	0,3	0,896
	$143,0 \pm 0,2$	$1857,0 \pm 0,2^c$	62,6	0,5	0,863
	$286,0 \pm 0,2$	$1714,0 \pm 0,2^c$	125	1	0,855
	$572,0 \pm 0,2^d$	$1428,0 \pm 0,2^c$	250	2	0,853

a) El volumen final fue de $(2000,00 \pm 0,2)$ μL , los cálculos para las concentraciones y su error se realizaron empleando las ecuaciones (13) y (14), respectivamente. b) CV se calculó a través de la ecuación (5). c) Alícuota obtenida en dos porciones con una micropipeta volumétrica de $(1000,0 \pm 0,2)$ μL . d) error real $\sqrt{0,08}$ mg (11)

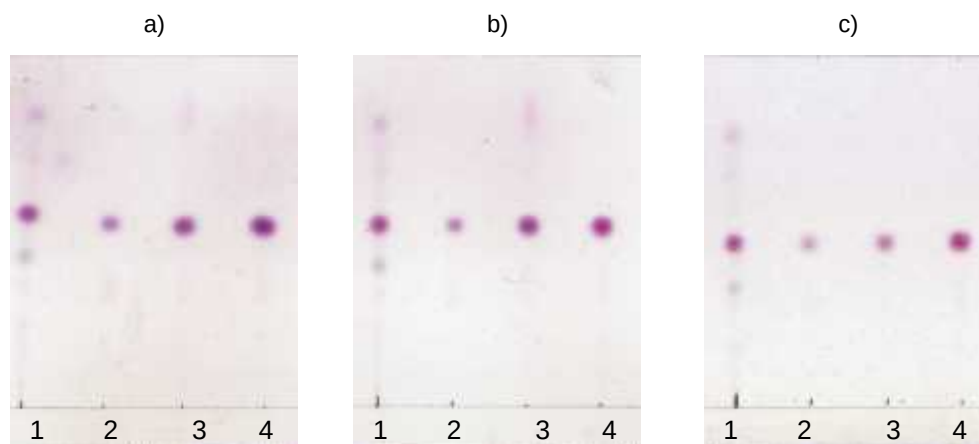


Figura 60. Placas cromatográficas utilizadas en la cuantificación de lupeol en la fracción RtR-K de (378 ± 4) ppm. 1) RtR-K; 2), 3) y 4) [Lupeol] de 51,9; 105 y 211 ppm, respectivamente.

Tabla 4.5. Áreas de los patrones de lupeol y la solución de RtR-K de (378 ± 4) ppm para la cuantificación de lupeol por densitometría óptica.

[Lupeol] (mg/L)	Áreas (u.a) ^a				A (u.a)	CV (%)
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄		
Figura 60a						
51,9 ± 0,5	4632 ± 1	4983 ± 5	4637 ± 4	4589 ± 3	4710 ± 183	4
105 ± 1	5603 ± 1	5627 ± 2	5697 ± 3	5616 ± 4	5636 ± 42	1
211 ± 2	7161 ± 4	7286 ± 16	7359 ± 1	7114 ± 3	7230 ± 113	2
RtR-K	5904 ± 1	6084 ± 17	6010 ± 1	5901 ± 0	5975 ± 89	1
Figura 60b						
51,9 ± 0,5	5263 ± 20	5543 ± 44	5751 ± 42	5515 ± 19	5518 ± 200	4
105 ± 1	6906 ± 4	7210 ± 11	7148 ± 12	7206 ± 4	7117 ± 144	2
211 ± 2	9291 ± 1	9737 ± 3	9400 ± 1	9645 ± 2	9518 ± 208	2
RtR-K	7351 ± 10	7626 ± 10	7566 ± 42	7621 ± 1	7541 ± 130	2
Figura 60c						
51,9 ± 0,5	5596 ± 4	5682 ± 7	5985 ± 2	5863 ± 5	5781 ± 175	3
105 ± 1	7245 ± 2	7277 ± 2	7362 ± 23	7207 ± 3	7273 ± 66	1
211 ± 2	9606 ± 0	9892 ± 5	9806 ± 4	9462 ± 3	9692 ± 194	2
RtR-K	7651 ± 31	7786 ± 2	7875 ± 8	7661 ± 2	7743 ± 107	1

a) n=4

Cada una de las réplicas de las áreas tomadas para cada una de las placas fue realizada utilizando un fondo diferente, siguiendo lo descrito en el punto de “Uso de UCV-Software” que se encuentra en la página 9 de este trabajo. Los densitogramas obtenidos para la CCF de la Figura 60, pueden ser consultados en la sección B de los anexos. La curva de calibración fue construida utilizando la metodología de mínimos cuadrados, se graficó el área de los picos en función de la concentración de los patrones de lupeol para obtener la ecuación de la recta para cada placa, como se muestra en lastablas de B-1 a B-4.

La determinación del contenido de lupeol en la fracción RtR-K se realizó a través de las ecuaciones (17) y (18) en mg/L, y (19) y (20) para el porcentaje de lupeol en la fracción; los resultados pueden observarse en las Tablas 4.6 y 4.7; las ecuaciones se encuentran en el anexo B, página 16.

Tabla 4.6.- Determinación de la concentración de lupeol (mgL⁻¹) en una solución de RtR-K de (378 ± 4) ppm.

CCF en Figura	Lupeol RtR-K (mgL ⁻¹) ^a				Lupeol mgL ⁻¹ ^b	CV (%) ^c
	X1	X2	X3	X4		
60a	125,52 ± 0,09	137,02 ± 1,1	132,26 ± 0,08	125,38 ± 0,03	130,0 ± 5,7	4,30
60b	121,32 ± 0,39	132,41 ± 0,4	130 ± 1,7	132,21 ± 0,03	129,0 ± 5,2	4,10
60c	125,5 ± 1,3	131,06 ± 0,06	134,72 ± 0,34	125,89 ± 0,07	129,3 ± 4,4	3,40
					129,44 ± 0,55	0,42

a) Valores determinados a través de las ecuaciones (17) y (18), empleando los datos de áreas mostrados en la tabla 4.5; b) Se utilizó el promedio de las medidas y la desviación estándar; c) CV se calculó a través de la ecuación (5).

Tabla 4.7.- Determinación del contenido porcentual de lupeol (%) en una solución de RtR-K de (378 ± 4) ppm.

CCF en Figura	%Lupeol RtR-K (%) ^a				%Lupeol % ^b	CV (%) ^c
	X1	X2	X3	X4		
60a	33,21 ± 0,03	36,25 ± 0,29	34,99 ± 0,02	33,17 ± 0,01	34,40 ± 1,50	4,30
60b	32,1 ± 0,1	35,03 ± 0,11	34,39 ± 0,45	34,98 ± 0,01	34,12 ± 1,38	4,10
60c	33,2 ± 0,34	34,67 ± 0,02	35,64 ± 0,09	33,31 ± 0,02	34,20 ± 1,17	3,40
					34,24 ± 0,14	0,42

a) Valores determinados a través de las ecuaciones (19) y (20), empleando los valores reportados en la tabla 4.6; b) Se utilizó el promedio de las medidas y la desviación estándar; c) Se calculó a través de la ecuación (5).

Posteriormente, se calcularon los límites de detección y cuantificación (Tabla 4.8), empleando las ecuaciones (3) y (4) de la página 18, usando las ecuaciones de recta obtenidas con todas las medidas de áreas.

Tabla 4.8. Límites de detección y cuantificación de lupeol en RtR-K.

CCF en figura	Parámetros de la recta			LODppm ^a	LOQppm ^a
	Pendiente	Punto de corte	R ²		
59a	15,73 ± 0,55	3930 ± 77	0,988	14,7	49,0
59b	24,79 ± 0,97	4343 ± 135	0,985	16,3	54,3
59c	24,33 ± 0,76	4597 ± 106	0,990	13,1	43,7
				13,1 - 16,3	43,7 - 54,3

a) Valores determinados a través de las ecuaciones (3) y (4).

El metabolito lupeol se encuentra en la fracción RtR-K proveniente del extracto metanólico de las raíces de *Ruellia tuberosa* L. en (34,12 ± 1,38)–(34,40 ± 1,50)%, con un coeficiente de varianza entre (3,40 – 4,30)%. Estos resultados indican que el método desarrollado para la cuantificación de este principio activo es útil para aplicarlo en otras plantas con características similares.

4.5.7.- Cuantificación de β sitosterol en la fracción RtR-K proveniente del extracto metanólico de las raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Análogamente a la cuantificación de lupeol, se realizó la cuantificación de β -sitosterol en las raíces de *Ruellia tuberosa*. Las soluciones madre de β -sitosterol y RtR-K fueron preparadas por disolución en THF (Tabla 4.1). A partir de la solución madre de β -sitosterol se prepararon los patrones para realizar la curva de calibración por dilución de la solución madre en THF (Tabla 4.2), utilizando las ecuaciones (21) y (22) que se encuentran en la sección C de los anexos de esta investigación. Cada placa cromatográfica contiene 3 μ L de la muestra RtR-K de (1000 ± 7) ppm y 5 μ L de los patrones de β -sitosterol (Tabla 4.2). Al igual que en la cuantificación de lupeol, las placas fueron desarrolladas utilizando el sistema AN-6, secadas al aire libre y reveladas con anisaldehído-ácido sulfúrico y posterior calentamiento a 110°C por 2 min. Las imágenes fueron digitalizadas utilizando un escáner y las mismas se muestran a continuación:

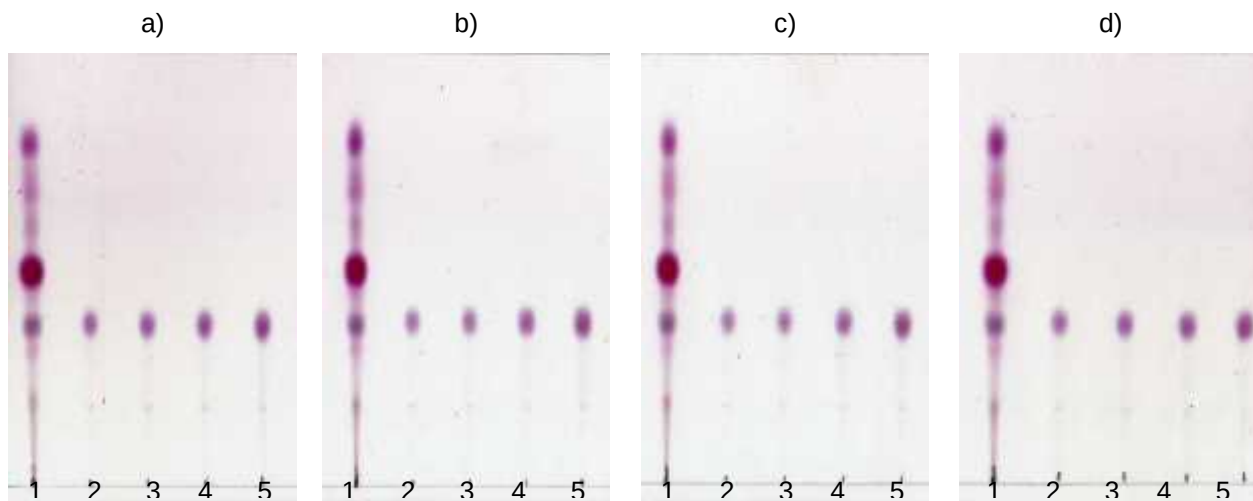


Figura 61. Placas cromatográficas utilizadas en la cuantificación de β -sitosterol en la fracción RtR-K de (1000 ± 7) ppm. 1) RtR-K; 2), 3), 4) y 5) [β -sitosterol] de 31,5; 62,6; 125 y 250 ppm, respectivamente.

La Tabla 4.9 muestra las áreas obtenidas en los densitogramas de las placas que se muestran en la Figura 61, estas áreas fueron utilizadas para realizar la curva de calibración directa. Los densitogramas obtenidos para la CCF de la Figura 61, pueden ser revisados en la sección C, en anexos. Se determinó el área por cuadruplicado; la curva, al igual que la cuantificación de lupeol, se determinó para cada placa por el método de mínimos cuadrados utilizando la ecuación (23) que se encuentra en la página 20 de los anexos. Se graficó las áreas en función de la concentración de los patrones y se obtuvo la curva de calibración para cada una de las placas que se muestran en la figura 61. Los datos de las curvas de calibración así como los gráficos se encuentran en la sección C de los anexos.

Tabla 4.9. Áreas de los patrones de β -sitosterol y la solución de RtR-K de (1000 ± 7) ppm para la cuantificación de β -sitosterol por densitometría óptica.

[β-sitosterol] (mg/L)	Áreas en cada réplica (u.a) ^a				A (u.a)	CV (%)
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄		
Figura 61a						
31,5 ± 0,3 ^b	4503 ± 10	5079 ± 52	5152 ± 6	5638 ± 22	5093 ± 465	6,3
62,6 ± 0,5	5244 ± 11	5079 ± 7	5152 ± 9	5638 ± 15	5278 ± 249	7,9
125 ± 1	5655 ± 7	6132 ± 6	6324 ± 8	6842 ± 5	6238 ± 491	4,7
250 ± 2	6200 ± 3	6472 ± 14	6738 ± 6	7187 ± 13	6649 ± 421	9,1
RtR-K	5868 ± 8	6244 ± 29	6368 ± 20	6879 ± 20	6340 ± 418	6,6
Figura 61b						
31,5 ± 0,3	4128 ± 5	4311 ± 5	4605 ± 5	4911 ± 4	4489 ± 343	5,0
62,6 ± 0,5	4329 ± 2	4311 ± 13	4605 ± 6	4911 ± 4	4539 ± 282	6,9
125 ± 1 ^b	5841 ± 5	6083 ± 10	6446 ± 9	6837 ± 13	6302 ± 435	6,2
250 ± 2	7027 ± 12	7248 ± 6	7566 ± 7	7880 ± 9	7430 ± 372	7,6
RtR-K	5839 ± 5	6018 ± 2	6223 ± 0	6489 ± 4	6142 ± 280	4,6
Figura 61c						
31,5 ± 0,3	5406 ± 15	5393 ± 9	4626 ± 4	5131 ± 13	5139 ± 365	3,1
62,6 ± 0,5	5888 ± 21	5393 ± 35	4626 ± 4	5131 ± 16	5259 ± 527	5,1
125 ± 1 ^b	7193 ± 9	7276 ± 6	6497 ± 4	7121 ± 5	7022 ± 355	10
250 ± 2	7786 ± 21	8001 ± 13	7514 ± 7	8059 ± 14	7840 ± 247	7,1
RtR-K	6997 ± 11	7061 ± 17	6349 ± 11	6907 ± 9	6828 ± 326	4,8
Figura 61d						
31,5 ± 0,3	5411 ± 10	4494 ± 10	5670 ± 18	5071 ± 5	5161 ± 508	5,3
62,6 ± 0,5	6045 ± 6	4494 ± 8	5670 ± 9	5071 ± 6	5320 ± 682	6,7
125 ± 1 ^b	6767 ± 5	5913 ± 6	6900 ± 10	6551 ± 6	6533 ± 437	13
250 ± 2	7378 ± 12	6616 ± 8	7452 ± 14	7214 ± 18	7165 ± 379	9,8
RtR-K	6776 ± 6	5901 ± 5	6993 ± 15	6497 ± 8	6542 ± 473	7,2

a) n=4; b) Datos anómalos en el comportamiento de r^2 .

La concentración del metabolito en la fracción RtR-K fue determinada a partir de los valores de las curvas de calibración de para cada placa de CCF, tablas C-1 a C-4 en los anexos y los valores de las áreas de la fracción que se encuentran en la tabla 4.9(tabla 4.10). El porcentaje del metabolito β -sitosterol en la fracción se muestra en la tabla 4.11. Estos resultados fueron obtenidos utilizando las ecuaciones (24), (25), (26) y (27) en anexos de esta investigación.

Tabla 4.10.- Determinación de la concentración de β -sitosterol (mgL^{-1}) en una solución de RtR-K de (1000 ± 7) ppm.

CCF en Figura	Sitosterol _{RtR-K} (mgL^{-1}) ^a				Sitosterol ^b mgL^{-1}	CV (%) ^c
	X1	X2	X3	X4		
61a	169,40	168,91	172,86	169,67	170,21 $\pm$ 1,79	1,05
61b	158,33	158,40	158,10	158,20	158,25 $\pm$ 0,13	0,08
61c	166,36	166,21	165,39	165,68	165,91 $\pm$ 0,46	0,27
61d	173,50	173,50	173,76	174,20	173,74 $\pm$ 0,33	0,19
					167,0 $\pm$ 6,7	3,99

a) Valores determinados a través de las ecuaciones (23) y (24), empleando los datos de áreas mostrados en la tabla (4.7). b) Se utilizó el promedio de las medidas y la desviación estándar; c) Se calculó a través de la ecuación (5).

Tabla 4.11.- Determinación del contenido porcentual de β -sitosterol (%) en una solución de RtR-K de (1000 ± 7) ppm.

CCF en Figura	% β -Sitosterol _{RtR-K} (%) ^a				% β -Sitosterol % ^b	CV (%) ^c
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		
61a	16,94	16,89	17,29	16,97	17,02 $\pm$ 0,18	1,05
61b	15,83	15,84	15,81	15,82	15,83 $\pm$ 0,01	0,08
61c	16,64	16,62	16,54	16,57	16,59 $\pm$ 0,05	0,27
61d	17,35	17,35	17,38	17,42	17,37 $\pm$ 0,03	0,19
					16,70 $\pm$ 0,67	3,99

a) Determinados a través de las ecuaciones (25) y (26) empleando los valores reportados en la Tabla 4.8; b) Se utilizó el promedio de las medidas y la desviación estándar; c) Se calculó a través de la ecuación (5)

También se determinaron los límites de cuantificación (LOD) y de detección (LOQ) del método utilizado para la cuantificación del principio activo (Tabla 4.12). La variación que se observan de los

valores de LOD y LOQ entre placas se debe a que, si bien las placas fueron tratadas con las mismas condiciones, al realizar cada una por separado existe un rango de error por la manipulación durante la ejecución del método en cada una de placas, como lo es, el tiempo exacto de saturación de la cámara de elución, la cantidad de agente revelador utilizado y el tiempo de exposición al calentamiento la placa para revelar las manchas, esto puede ser corregido realizando las réplicas para la cuantificación dentro de una misma placa cromatográfica.

Tabla 4.12. Límites de detección y cuantificación de β -sitosterol en RtR-K.

CCF en figura	Parámetros de la recta			LOD (ppm) ^a	LOQ (ppm) ^a
	Pendiente	Punto de corte	r^2		
61a	4,26 $\pm$ 0,27	5615 $\pm$ 44	0,962	31,1	103,5
61b	13,85 $\pm$ 0,30	3950 $\pm$ 45	0,995	9,7	32,4
61c	12,14 $\pm$ 0,17	4814 $\pm$ 26	0,998	6,3	21,1
61d	8,53 $\pm$ 0,49	5059 $\pm$ 73	0,968	25,7	85,6
				6,3 - 31,1	21,1 - 103,5

a) n=4 Valores determinados a través de las ecuaciones (3) y (4).

Así, el metabolito β -sitosterol se encuentra en el extracto metanólico de las raíces de la especie *Ruellia tuberosa* L. entre un (15,83 $\pm$ 0,01)–(17,37 $\pm$ 0,03) %, el coeficiente de varianza obtenido para este ensayo estuvo entre (0,08 - 1,05) %, en concordancia con valores reportados para este método^[10], esto significa que el método es útil para la determinación del contenido de este principio activo y puede ser utilizado en su cuantificación para otras plantas de características similares.

4.5.8.-Estimación de betulina en la fracción RtR-K proveniente del extracto metanólico de las raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Se realizó la estimación de betulina en la fracción RtR-K de (1000 $\pm$ 7) ppm; para ello se determinó el área por triplicado en cuatro placas de CCF desarrolladas con AN-6 (Figura, 62, Tabla 4.13). Los densitogramas obtenidos para la CCF de la Figura 62, pueden ser consultados en los anexos de esta investigación, en la sección D.

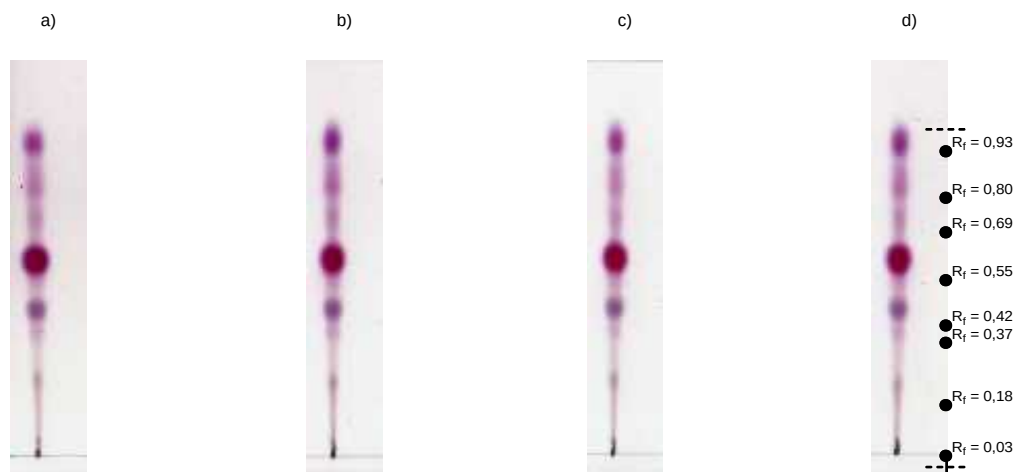


Figura 62. Placas cromatográficas utilizadas en la cuantificación de lupeol, β -sitosterol y betulina en la fracción RtR-K de (1000 ± 7) ppm. Sistema de solvente: Hex-AcOEt-HCOOH (75:25:1 v/v). Agente revelador: Anisaldehído- Ácido sulfúrico.

Tabla 4.13. Áreas obtenidas por densitometría óptica en la muestra RtR-K de (1000 ± 7) ppm para la cuantificación porcentual de cada valor de R_f mostrado en la Figura 62

CCF en Figura	Área por triplicado para cada valor de R_f (u.a)								Área total (u.a)
	0,93	0,80	0,69	0,55 (lupeol)	0,42 (β - sitosterol)	0,37 (betulina)	0,18	0,03	
62a	5872 $\pm$ 32	4078 $\pm$ 64	2943 $\pm$ 63	11512 $\pm$ 75	4707 $\pm$ 27	1230 $\pm$ 90	1547 $\pm$ 127	1322 $\pm$ 16	33210 $\pm$ 104
	6251 $\pm$ 4	4732 $\pm$ 35	2683 $\pm$ 154	11801 $\pm$ 31	4494 $\pm$ 31	1391 $\pm$ 64	1631 $\pm$ 10	1215 $\pm$ 1	34199 $\pm$ 58
62b	7127 $\pm$ 45	5122 $\pm$ 160	3570 $\pm$ 73	13432 $\pm$ 1	6023 $\pm$ 113	1678 $\pm$ 86	2319 $\pm$ 1	2111 $\pm$ 29	41382 $\pm$ 363
	7505 $\pm$ 63	5965 $\pm$ 96	3278 $\pm$ 43	12679 $\pm$ 252	5655 $\pm$ 45	2334 $\pm$ 115	3190 $\pm$ 27	2273 $\pm$ 68	42878 $\pm$ 302

Tabla 4.14. Composición porcentual calculada en la muestra RtR-K de (1000 ± 7) ppm para cada valor de Rf mostrado en la Figura 65.

CCF en figura	Composición porcentual por triplicado para cada valor de Rf (%)							
	0,93	0,80	0,69	0,55 (lupeol)	0,42 (β -sitosterol)	0,37 (betulina)	0,18	0,03
62a	17,68 $\pm$	12,28 $\pm$	8,86 $\pm$	34,66 $\pm$	14,17 $\pm$	3,70 $\pm$	4,66 $\pm$	3,98 $\pm$
	0,08	0,21	0,17	0,28	0,12	0,27	0,37	0,04
62b	18,28 $\pm$	13,84 $\pm$	7,85 $\pm$	34,51 $\pm$	13,14 $\pm$	4,07 $\pm$	4,77 $\pm$	3,55 $\pm$
	0,02	0,13	0,44	0,07	0,11	0,19	0,04	0,01
62c	17,22 $\pm$	12,38 $\pm$	8,63 $\pm$	32,46 $\pm$	14,55 $\pm$	4,05 $\pm$	5,6 $\pm$	5,10 $\pm$
	0,2	0,28	0,10	0,28	0,24	0,18	0,05	0,07
62d	17,5 $\pm$	13,91 $\pm$	7,65 $\pm$	29,57 $\pm$	13,19 $\pm$	5,44 $\pm$	7,44 $\pm$	5,3 0 $\pm$
	0,17	0,16	0,14	0,38	0,16	0,28	0,09	0,15

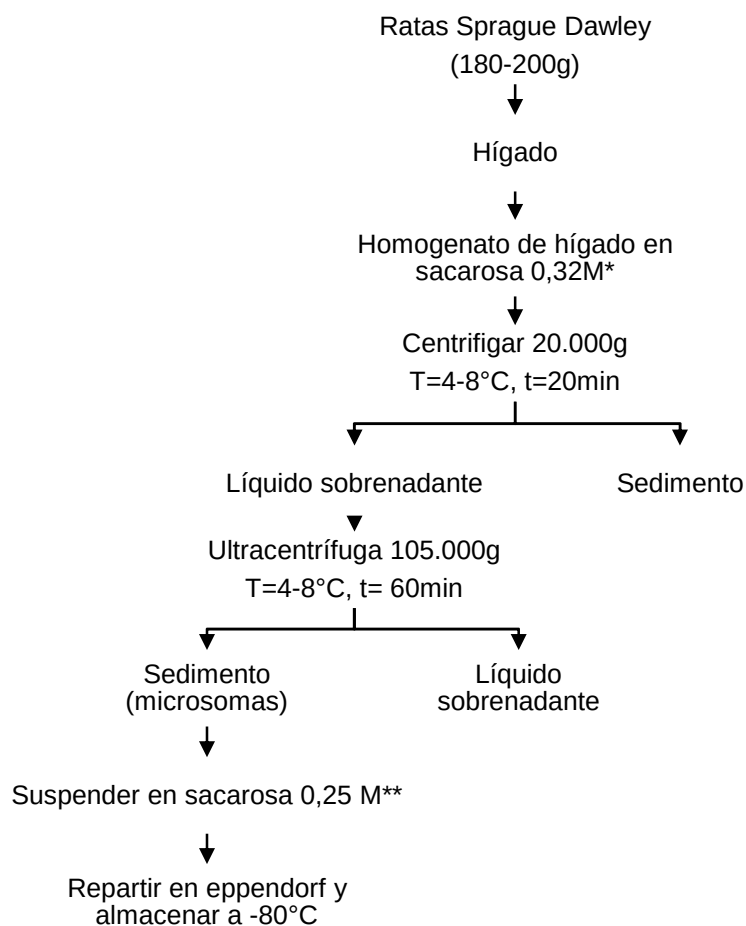
La composición porcentual mostrada en la Tabla 4.14 fue calculada a través de la ecuación (28, anexo c), utilizando el área obtenida por cada valor de Rf y el área total en cada réplica.

La cuantificación del metabolismo Betulina no pudo realizarse de la misma forma que en el caso de lupeol y β -sitosterol, ya que el mismo se encuentra en muy poca concentración dentro de la fracción de la planta estudiada, por lo que se calculó el contenido porcentual de betulina utilizando el valor del área obtenido de las áreas bajo la curva de Rf perteneciente a betulina y a los otros metabolitos contenidos en la fracción RtR-K, conociendo que los metabolitos cuantificados tienen Rf determinados bajo condiciones conocidas. El resultado obtenido es similar al reportado en la literatura, por lo que es posible reportar un estimado del contenido de betulina entre $(3,70 \pm 0,27)$ – $(5,44 \pm 0,28)$ % en el extracto metanólico de la planta.

4.6.-Metodología para la determinación de inhibición sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) de las fracciones y subfracciones del extracto metanólico de las partes aéreas y raíces de la especie *Ruellia tuberosa* L .

4.6.1.- Preparación de los microsomas.

Para la preparación de los microsomas, fuente de la enzima, se utilizó el procedimiento descrito por Marcucci y colaboradores (1983), Esquema 4.6.^[57]



*Sacarosa 0,32 M; MgCl₂ 3 Mm.

**Sacarosa 0,25 M; HEPES 5 Mm; MgCl₂ 1 Mm pH 6,5

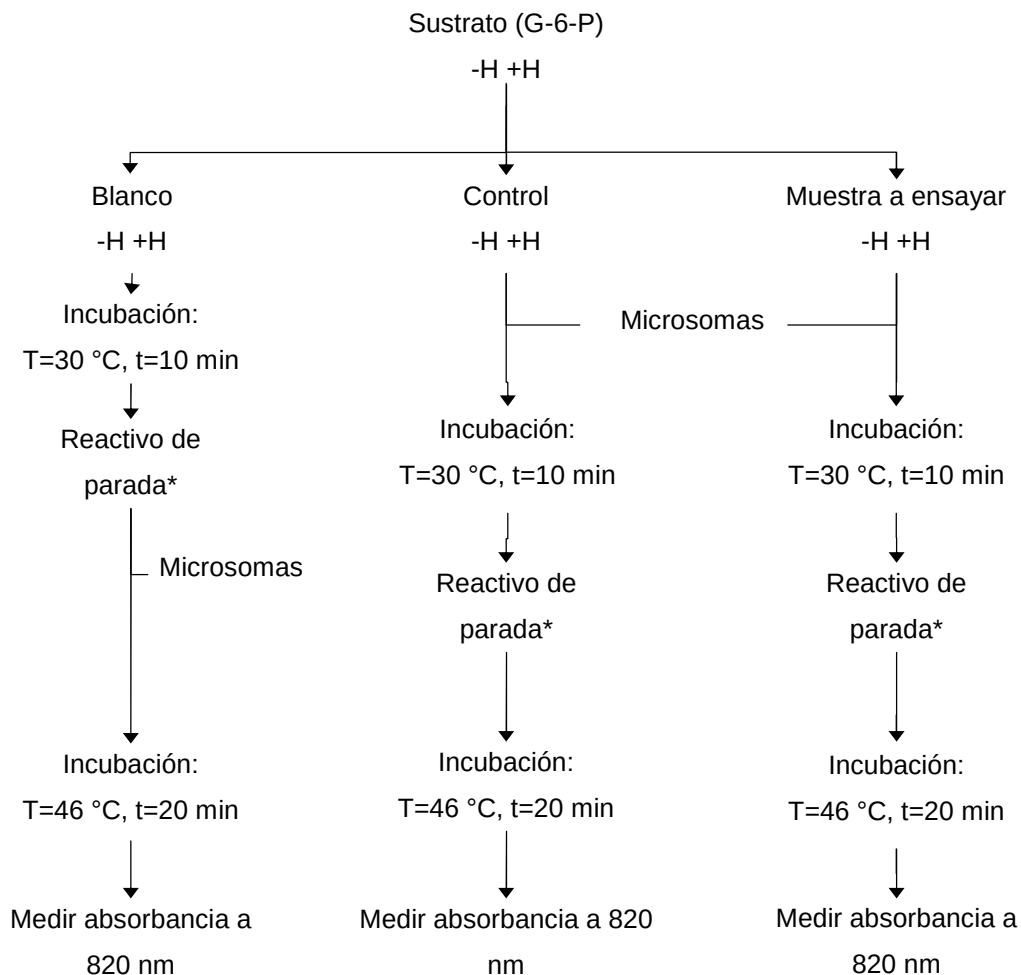
Esquema 4.6. Procedimiento para el aislamiento de los Microsomas.^[57]

4.6.2.- Ensayo general sobre la G6Pasa.

Para determinar la actividad de las fracciones estudiadas sobre la enzima G6Pasa se utilizó la metodología descrita por Burchell y colaboradores (1991).^[58] A continuación se describe brevemente la metodología seguida durante el ensayo sobre G6Pasa.

- Se utilizaron cuatro tubos de ensayo por cada fracción que se probó (blanco, y triplicados), tanto con histonas (+H) como sin ellas (–H).
- Para los ensayos *Control* se colocaron en cada tubo 40 µL del sustrato (G6P) más 40 µL de agua (o del solvente en que fue disuelto la fracción a ensayar). Para los ensayos con la fracción analizada, se añadió 40 µL de la solución problema a la concentración deseada en lugar de agua.
- Los microsomas se diluyeron hasta una concentración final de 1 mg de proteína/mL, en sacarosa 0,25 M; 5 mM HEPES y 1mM de $MgCl_2$ (pH= 6,5).
- Los tubos de ensayo se colocaron en un baño de temperatura controlada a 30°C.
- Posteriormente, se adicionaron 20 µL de los microsomas a los triplicados y se incubó por 10 min.
- La reacción se detuvo tubo por tubo, en el orden e intervalo de tiempo en que se colocaron los microsomas, agregando 0,9 mL del reactivo de parada (heptamolibdato de amonio al 0,42% en H_2SO_4 0,5M: SDS 5%: Ácido ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1), incluyendo a los blancos. Luego se añadió 20 µL de los microsomas a los blancos.
- Se incubaron por unos 20 min, en un baño de temperatura controlada a 46°C.
- Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 820 nm.
- La actividad enzimática se expresó en µmoles de P_i /min/mg de proteína.

Para determinar la cantidad de fosfato liberado en la reacción, se realizó una curva de calibración con un rango de concentración de 0 a 75 nmol de P_i tomando alícuotas correspondientes de una solución madre de KH_2PO_4 1 mM, en un volumen final de 100 µL.



-H: sin histonas

+H: con histonas

*Reactivo de parada: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,42% en H_2SO_4 0,5 M: SDS 5%: Ácido Ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1.

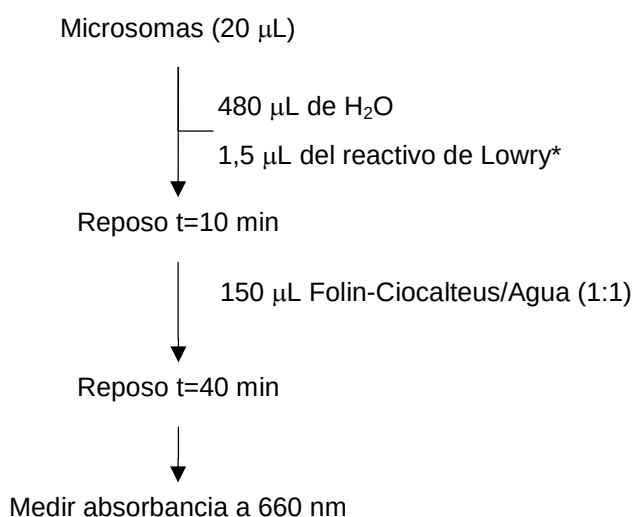
Esquema 4.7. Ensayo general de inhibición sobre la enzima G6Pasa.^[58]

4.6.3.- Determinación de proteínas.

La cantidad de proteínas se determinó siguiendo el procedimiento de Lowry y colaboradores (1951),^[59] modificado por Markwell y colaboradores (1978),^[60] que combina la reacción de Biuret basada en la unión de los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones de cobre en medio alcalino y la

reducción del reactivo de Folin-Ciocalteus por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, ésta reacción intensifica el color del complejo cobre-proteína.^[61]

En la determinación de la concentración de proteínas presentes en cada ensayo se elaboró una curva de calibración con un rango de concentración entre 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen final de 500 μL . La cantidad de proteínas se estimó en base a una curva de calibración usando albúmina como proteína patrón de acuerdo al siguiente esquema:



*Reactivo de Lowry: A+B (100:1)

A = Na_2CO_3 2%, NaOH 0,4%, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0,16%, SDS 1%.

B = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%.

Esquema 4.8. Procedimiento para la cuantificación de proteínas.^[60]

4.6.4. Resultados de los ensayos de inhibición de las fracciones y subfracciones del extracto metanólico de las partes aéreas y raíces de la especie *Ruellia tuberosa* L.

Tabla 4.15.-Inhibición de G6Pasa de las fracciones de *Ruellia tuberosa* L a 400 ppm.

Fracción	Tipo de compuesto	Microsomas intactos (-H)			Microsomas rotos (+H)		
		Act ^a	p ^b	% Inh	Act ^a	p ^b	% Inh
Control		4,36 ± 0,79			8,48 ± 0,98		
Rt	Extracto metanólico	1,53		65	6,28		26
RtA	Terpenos alifáticos	4,01 ± 0		8	3,05 ± 0		64
RtB	Clorofilas/Terpenos	3,88 ± 0		11	7,8 ± 0		8
RtC	Flavonoides	1,48 ± 0		66	4,92 ± 0		42
RtD	Flavonoides	1,26 ± 0		71	3,99 ± 0		53
RtS	Polifenoles/terpenos	2,18 ± 0,48	0,038	50	4,83 ± 0,03	0,002	43
RtSac	Terpenos aromáticos	1,83 ± 0,03	0,012	58	5,09 ± 0,66	0,021	40
RtR	Extracto metanólico	1,40		68	4,49		47
RtR-C	Flavonoides/terpenos	1,66 ± 0		62	6,02 ± 0		29
RtR-D	Flavonoides/terpenos	1,57 ± 0		68	6,44 ± 0		24
RtR-K	Terpenos/esteroles	2,40 ± 0,22	0,026	45	6,44 ± 0,02	0,008	24
RtR-N	Flavonoides/terpenos	3,40 ± 0,30	0,111	22	5,85 ± 0,82	0,049	31
RtR-Nac	Polifenoles	2,09 ± 0,48	0,037	52	4,92 ± 0,11	0,003	42
RtR-Norg	Terpenos aromáticos	1,87 ± 0,01	0,013	57	4,92 ± 1,02	0,042	42

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. a) Actividad expresada en $\mu\text{molesPO}_4^{3-}/\text{h}/\text{mg}$ proteínas, b) p es la significancia estadística de los resultados y se interpreta entre más pequeño el valor, más diferente son los resultados de las muestras con respecto a los resultados obtenidos por el control.

El extracto metanólico de las partes aéreas(Rt)presento una inhibición de 65 y 26% de la actividad de la enzima G6Pasa en microsomas intactos y rotos, respectivamente (Tabla 4.15), es decir, Rt es 2,5 veces más selectivo a inhibir a G6PT (conocido como el transportador T1 de G6Pasa), que a G6PC (subunidad catalítica de G6Pasa), dicha selectividad en la inhibición de G6PT disminuye a 1,45 al utilizar el extracto metanólico de las raíces (RtR).

G6PT es un polipéptido hidrofílico no glicosilado de 429 aminoácidos que forma parte del sistema de la G6Pasa^[62].La inhibición de G6PTpor parte de Rt y RtR es equivalente, con 65 y

68%, respectivamente, lo cual puede significar que el contenido hidrofílico polar en Rt y RtR, es porcentualmente similar. Adicionalmente, Rt y RtR difieren en la afinidad para la inhibición de G6PC, siendo RtR 1,8 veces más selectiva a inhibir G6PC que Rt. Sabiendo que G6PC es una glicoproteína hidrofóbica^[63], se puede inferir que el contenido alifático de RtR es más afín a la inhibición de G6PC que el de Rt.

Por otro lado, a excepción de RtA y RtR-N, los extractos metanólicos de *Ruellia tuberosa* y sus subfracciones tienen mayor selectividad ($\geq 1,24$) a la inhibición de G6PT que G6PC.

Se puede observar que las fracciones de *Ruellia tuberosa* L., provenientes de las partes aéreas (RtC, RtD, RtS y RtSac), presentan un porcentaje de inhibición ligeramente mayor sin histonas que con histonas, a excepción de las fracciones RtC y RtD, en las cuales la diferencia es notable. Lo anterior parece indicar que los compuestos que se encuentran en estas fracciones (flavonoides), son más efectivos para inhibir G6PT que G6PC.

Las fracciones provenientes de las raíces (RtR-C, RtR-D, RtR-K, RtR-N, RtR-Norg y RtR-Nac), se encuentran divididas en cuanto a su porcentaje de inhibición para G6PT y G6PC. Observándose así que, para las fracciones RtR-C, RtR-D y RtR-K, la inhibición es selectiva hacia G6PT ya que los porcentajes de inhibición para la G6PC son porcentajes bajos (<24%).

Por otro lado, las fracciones RtD y RtR-D mostraron mayor porcentaje inhibición de G6PT, mientras que para la G6PC solo la fracción proveniente de las partes aéreas posee una actividad importante; ambas fracciones se obtuvieron de la porción soluble en metanol-agua del extracto metanólico, el cual fue posteriormente tratado con acetona, siendo la parte soluble de este fraccionamiento la que dio lugar a RtD y RtR-D; esta separación permitió obtener en fracción enriquecida en flavonoides posibles responsables de esta importante inhibición de la actividad del sistema enzimático G6Pasa.

Adicionalmente, a 400 ppm, la fracción RtR-K, conformada mayoritariamente por triterpenos (lupeol, betulina) y esteroides (β -sitosterol), presentó una inhibición moderada sobre los transportadores del sistema enzimático G6Pasa (-H: 45%). Por otra parte, la fracción RtB también contiene la misma composición triterpénica y esteroidea que RtR-K, además de clorofila, sin embargo, la inhibición observada para RtB de -H: 11% puede sugerir que las clorofilas que son la composición mayoritaria, es inactiva sobre la G6Pasa. Por otra parte, la actividad biológica de cada compuesto puro (muestras

comerciales de lupeol, betulina y β -sitosterol) no se logró determinar, básicamente porque éstos no son solubles en el medio de reacción enzimático, el cual consiste en soluciones acuosas de pH ácido.

La fracción RtR-C presentó una inhibición importante del sistema enzimático G6Pasa (-H: 62%), los metabolitos secundarios en dicha fracción fueron concentrados en la fracción RtR-J (Esquema 4.4pág., 68) la cual presentó el mismo comportamiento por HPLC que la fracción RtR-L, ésta a su vez fue fraccionada hasta obtener las fracciones RtR-Nac (-H: 52 %; +H: 42 %) y RtR-Norg (-H: 57 %; +H: 42 %) Esquema 4.5, las cuales presentaron una inhibición similar entre sí y ligeramente menor que RtR-C. La actividad asociada a las fracciones RtR-Nac y RtR-Norg está ligada a la composición en común entre ambas las cuales son compuestos del tipo terpenos aromáticos.

Mediante análisis por HPLC, se observó que la fracción RtSac (Figura 54), contiene básicamente la misma composición polifenólica que RtS (Figura 53). Sin embargo, difieren en el contenido terpenos aromáticos, lo cual se ve reflejado en el porcentaje de inhibición determinado para cada una. Siendo 1,2 veces más selectivo RtSac (-H: 58 %) para la inhibición de G6PT que RtS (-H: 50%).

Las fracciones acuosas y orgánicas de las partes aéreas (RtSac) y de las raíces (RtR-Nac y RtR-Norg) (Tabla 4.15), poseen porcentajes de inhibición muy similares, tanto con histonas como sin histonas. Las fracciones RtSac y RtR-Nac, obtenidas por una separación proveniente de la capa acuosa de los sistemas de mezclas utilizados para el fraccionamiento, muestran porcentajes de inhibición similares (RtR-Nac -H: 52 %; +H: 42 % y RtSac -H: 58%; +H: 40%), lo que se puede indicar que ambas fracciones se muestran 1,2 veces más selectivas para la inhibición de G6PT que para la inhibición de G6PC. Por HPLC, las fracciones RtR-Norg y RtR-Nac muestran composiciones distintas (Figura 52a), es decir, se detectan terpenos aromáticos al igual que RtSac, por lo que no es extraño encontrar que sus porcentajes de inhibición sean similares, mostrando mayor selectividad a la actividad sobre el transportador T1 que sobre la subunidad catalítica.

Los extractos y fracciones de *Ruellia tuberosa* L. que fueron analizadas en este trabajo muestran inhibición de la G6Pasa, siendo más selectiva hacia G6PT que G6PC, con lo cual se puede confirmar el uso tradicional de esta planta para el tratamiento de la Diabetes Mellitus^[21].

5.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y de la discusión de los mismos se plantean las siguientes conclusiones:

1. El fraccionamiento realizado en las raíces de *Ruellia tuberosa* L. para obtener una fracción enriquecida en compuestosterpenoidales fue efectivo, pues se encontraron en la fracción RtR-K los compuestos β -sitosterol y lupeol como compuestos mayoritarios.
2. El fraccionamiento realizado en las partes aéreas de *Ruellia tuberosa* L. demostró que existen compuestos de tipo polifenoles y específicamente, flavonoidales.
3. Los resultados del análisis de reproducibilidad indican que el método es preciso (%CV<5%). Los coeficientes de variación de las medidas realizadas son semejantes a los reportados en otros métodos de cuantificación por HPTLC.
4. El porcentaje de recuperación del método para β -sitosterol en las raíces de *Ruellia tuberosa* L. se encuentra entre (98,3-102)% y es comparable a los reportados en otras investigacionessobre CCFAE e indican que el método permite cuantificar estos metabolitos con una exactitud relativamente alta.
5. La linealidad del método es alta (R^2 aproximadamente a 0,99), comparable a otros métodos de CCFAE.
6. El método permitió determinar el porcentaje de β -sitosterol en (15,83 $\pm$ 0,01–17,37 $\pm$ 0,03)%, lupeol en (34,12 $\pm$ 1,38 – 34,40 $\pm$ 1,50)% y betulina en

($3,70 \pm 0,27$ – $5,44 \pm 0,28$) % en raíces de *Ruellia tuberosa* L. de forma rápida, económica y sencilla, en comparación a otras técnicas cromatográficas como HPLC.

7. Se encontró que la fracción RtR-K a 400ppm, presentó una inhibición moderada de: -H: 45%; +H: 24%. La fracción RtR-C, a 400ppm presentó una inhibición importante de G6PT en el sistema G6Pasa (-H: 62%), indicando que los metabolitos secundarios presentes en esta inhiben el paso de glucosa-6-fosfato hacia el lumen del retículo endoplasmático.
8. Las sub-fracciones de RtS se diferencian en que RtS_{ac} se encuentra enriquecida de compuestos de tipo polifenoles mientras que RtS_{org}, posee compuestos de tipo terpenos aromáticos, esta diferencia se evidencia aún más porque RtS_{ac} es 1,2 veces más efectiva para inhibir G6PT que RtS.

6.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1Farid, M. (1993).“CHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF MEDICINAL HERBS, PHYLA NODIFLORA, RUELLIA PATULA AND RUELLIA BRITTONIANA”.Facultad de Farmacia. Departamento de Farmacología. Universidad de Karachi. Karachi- Pakistán.
 - 2 Marcano, D., Hasegawa, M. (2002). “FITOQUÍMICA ORGÁNICA”. 2da edición. Editorial Torino. Caracas-Venezuela.
 - 3Bailey L. (2003). “REMINGTON: FARMACIA, TOMO 1”. 20ª Edición, Argentina, Editorial Médica Panamericana: 686
 - 4 Durst H. y Gokel G. (2007). “QUÍMICA ORGÁNICA EXPERIMENTAL”. Primera edición, España, Editorial Reverté, S.A.: 79
 - 5Sherma J. and Fried B. (2003).“HANDBOOK OF THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY”. Third Edition, Revised and Expanded, New York, Marcel Dekker, INC. : 1-2.
 - 6Spangenberg B., Poole C. and Weins C. (2011). “QUANTITATIVE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY”, A practical Survey, Berlin, Springer: 22, 23, 232, 285, 286.
 - 7Irish A. (2007). “DIGITALLY ENHANCED THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY: AN INEXPENSIVE, NEW TECHNIQUE FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS”. *Journal of Chemical Education*, vol. 84 (5): 842-847.
 - 8 Srivastava M. (2011). “HIGH-PERFORMANCE THIN- LAYER CHROMATOGRAPHY (HPTLC)”.New York, Springer: 4, 5, 8, 205, 206, 207, 263 y 267.
 - 9 Hahn-Deinstrop E. (2007). “APPLIED THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY, BEST PRACTICE AND AVOIDANCE OF MISTAKES”.Second Edition, Weinheim, Wiley-VCH: 3.
 - 10 De Freitas L., (2012). “DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF) QUE PERMITA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EXTRACTOS DE PLANTAS”. Universidad Central De Venezuela-Caracas, Venezuela. Páginas 35-46.
 - 11 Aguirre J. (2008). “DIBUJO TÉCNICO Y MATEMÁTICAS: UNA CONSIDERACIÓN INTERDISCIPLINARIA”. Primera Edición, España, TARAVILLA S.L.
 - 12 Ochoa O. (2006). “TÉCNICO ESPECIALISTA EN RADIODIAGNÓSTICO DE ATENCIÓN PRIMARIA DEL INSTITUTO DE CATALUÑA”. Primera edición, España, Editorial Mad, S.L.
 - 13Rathee P., Rathee S., Rathee D. and Rathee D. (2010).“QUANTITATIVE ESTIMATION OF (+)-CATECHIN IN STEM BARK OF SARACA ASOKA LINN USING HPTLC”.*Der Pharma Chemica*, vol. 2(1): 306-314.

-
- 14 Riaño N. (2007). "FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA BÁSICA, ANÁLISIS CUANTITATIVO". Segunda edición, Colombia, Editorial Universidad de Caldas: 101.
 - 15 Skoog D., Holler F. y Nieman T. (2001). "PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL". Quinta edición, España, McGraw-Hill: 12.
 - 16 Morante S., Sierra I. y Del Hierro I. (2007). "DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA SEPARACIÓN QUIRAL Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE PROCESOS DE SÍNTESIS ASIMÉTRICA". Primera edición, España, Universidad Rey Juan Carlos, Servicio de Publicaciones: 24, 26, 27.
 - 17 Costa J. (2005). "DICCIONARIO DE QUÍMICA FÍSICA". Primera edición, España, Díaz de Santos: 75.
 - 18 Meyyanathan S., Ramasarma G. y Suresh B. (2004). "ANÁLISIS DE LA SIMVASTATINA EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA DE ALTO RENDIMIENTO". *Ars Pharmaceutica*, vol. 45 (2): 121-129.
 - 19 Gómez S., Martínez J. y Martínez F. (2010). "VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO EMPLEANDO CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE IBUPROFENO EN MEDIOS BIORRELEVANTES". *Química Nova*, vol. 33 (8): 1794-1799.
 - 20 Sierra I, Pérez D., Gómez S. y Morante S. (2010). "ANÁLISIS INSTRUMENTAL". Primera edición, España, Netbiblio, S. L.: 9.
 - 21 Shahwar, D., Ullaha S., Ahmad M., Ahmad N., Khan M. (2011). "HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) IN NORMAL AND ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RABBITS". *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **7(2)**, 107-115.
 - 22 Ullah S., Shahwar D., Ullah S., Ahmad M. y Ahmad N. (2012). "HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) IN NORMAL AND ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RABBITS". *J. Chem. Soc. Pak.*, Vol 34, N° 2, 436-441
 - 23 Burchell A. and Waddell I.D. (1991). "THE MOLECULAR BASIS OF THE HEPATIC MICROSOMAL GLUCOSE-6-PHOSPHATASE". *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research*, **1092(2)**, 129-137.
 - 24 McCormack J. G., Westergaard N., Kristiansen M., Brand C. L., and Lau J. (2001). "PHARMACOLOGICAL APPROACHES TO INHIBIT ENDOGENOUS GLUCOSE PRODUCTION AS A MEAN OF ANTI-DIABETIC THERAPY". *Curr. Pharm. Design*, **7(14)**, 1451-1474.
 - 25 Bermúdez J. (2016). "ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PLANTAS UTILIZADAS EN EL CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE GLUCOSA-6-FOSFATASA DE LOS METABOLITOS AISLADOS Y LOS PRODUCTOS SINTETIZADOS". Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela. 81-90
 - 26 Llamozas S. (2000). "TRES NUEVAS ESPECIES DE *Ruellia* L. (Acanthaceae) DE VENEZUELA". *Acta Bot. Venez.*, **24(2)**, 75-83.

-
- 27Facundo V. A., Pinto A. C., and Rezende C. M. (2005). "AROMA COMPOUNDS AND VOLATILE CHEMICAL COMPOSITION OF *Ruellia menthoides* (Nees) HIERN". *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 93-95.
- 28Salah A. M., Dongmo A.B., Kamanyi A., Bopelet M., Vierling W., and Wagner H. (2000). "IN VITRO PURGATIVE EFFECT OF *Ruellia praetermissa*. Sceinf.ex.Lindau (Acanthaceae)". *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 269-272.
- 29Salah A. M., Gathumbi J., Vierling W., and Wagner H. (2002). "ESTROGENIC AND CHOLINERGIC PROPERTIES OF THE METHANOL EXTRACT OF *Ruellia praetermissa*. Sceinf.ex.Lindau (Acanthaceae) IN FEMALE RATS". *Phytomedicine*, **9**, 52-55.
- 30 Andhiwal C. K., Has C., and Varshney R.P. (1985). "ANTIFERTILITY SCREENING OF *Ruellia prostrata* Poir AND AN AYURVEDIC PREPARATION. *Current Science*, **54**, 995-997.
- 31 Banerjee A.K. (1984). "STEROLS FROM *Ruellia prostrata* Poir". *Current Science*. Vol.53. No. 3.
- 32 John S., Gröger D., and Radeaglia R. (1975). "TETRAMETHYLPUTRESCINE FROM YOUNG PLANTS OF *Ruellia rosea*". *Phytochemistry*, **14**, 2635-2636.
- 33 Fischer H., Rosendal S. y Nielsen B. (1988). "CHEMOTAXONOMY OF THE ACANTHACEAE.IRIDOIDS AND QUATERNARY AMINES". *Phytochemistry*. Vol. 27, No. 8, pp. 2581-258.
- 34 Schnee L. (1984). "PLANTAS COMUNES DE VENEZUELA. COLECCIONES CIENCIAS BIOLÓGICAS VIII". 1era edición. Ediciones de la Biblioteca. Caracas-Ciudad Universitaria- Venezuela.
- 35http://en.wikipedia.org/wiki/Ruellia_tuberosa
- 36Chothani D. L., Patel M. B. y Mishra S. H. (2011). "HPTLC FINGERPRINT PROFILE AND ISOLATION OF MARKER COMPOUND OF *Ruellia tuberosa*". *Chromatography Research International*. **Vol. 2012**. 3-5.
- 35.Gil R. y Carmona J. (2001), "23 ESPECIES BOTÁNICAS CON POTENCIALIDAD TERAPÉUTICA". *Revista de la Facultad de Farmacia*, **42(2)**, 37-39.
- 38 Lans C. (2006). "Etnomedicines used in Trinidad and Tobago form Urinary Problems and Diabetes Mellitus". *J. Etnomedicine***2(1)**, 45-55.
- 39 Cianguerotti C., Pastorello M., Valera M., López-Gramcko J., Orsini G., Salazar-Bookman M. e Israel A. (2007). "PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA RAÍZ DE *Ruellia tuberosa* L". LVII Convención Anual de la AsoVAC.
- 40 Ciangherotti C., Cegarra J., Usubillaga A., Rodríguez M., Bermúdez J., Mata R. y Israel A. (2016). "EVALUACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR Y ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE AGUDA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA RAÍZ DE *Ruellia tuberosa* L. EN RATAS CON DIABETES

EXPERIMENTAL". Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, **Diciembre 2016**, 36-44

41Chen F-A., Wu A-B., Shieh P., Kuo D-H.y Hsieh C-Y. (2006). "EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Ruellia tuberosa*".*Food Chem*,**94(1)**, 14-18.

42Hout S., Chea A., Bun S-S., Elias R., Gasquet M., Timon-David P., Balansard G. y Azas N. (2006). "SCREENING OF SELECTED INDIGENOUS PLANT OF Cambodia FOR ANTIPLASMODIAL ACTIVITY".*J. Etnopharm.*,**107(1)**, 12-18.

43Graham J. G., Quinn M. L., Fabricant D. S. y Farnsworth N. R. (2000). " PLANT USED AGAINST CANCER-AN EXTENSION OF THE WORK OF JONATHAN HARTWELL". *J. Etnopharm.*, **73(3)**, 347-377.

44Chwan-Fwu L., Yu-Ling H., Lee-Ying C., Shuenn-Jyi S. y Chien-Chih C. (2006). "BIOACTIVE FLAVONOIDS FROM *Ruellia tuberosa*". *J. Chin. Med.*,**17(3)**, 103-109.

45 Arun S., Giridharan P., Suthar A., Kulkarni-Almeida A., Naik V., Velmurugan R., Ram V., Arun B., Vijay C., y Somesh S. (2008). "ISOLATION OF TYLOCREBINE FROM *Ruellia tuberosa* THROUGH BIOASSAY DIRECTED COLUMN CHROMATOGRAPHY AND ELUCIDATING ITS ANTI-CANCER AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL". 7mo Encuentro de AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Atenas-Grecia.

46Subramanian S. y Nair A. G. R. (1974). "APIGENIN GLUCOSIDES FROM *Thunbergia fragrans* AND *Ruellia tuberosa*".*Curr.Sc.*,**43(15)**, 480.

47 Ghosal S., Banerjee S., Chattopadhyay B. K., Srivastava R. S. y Chakrabarti D. K. (1974). "TOXIC SUBSTANCES PRODUCED BY *Fusarium*. VII. CONTROL OF FUSATIAL WITH OF SAFFLOWER BY ROOT EXUDATES AND EXTRACTIVES OF *Ruellia tuberosa*". *Cellular and Molecular Life Sciences*, **34(8)**, 1057-1058.

48 Wagner H., Danninger H., Iyengar M.A., Farkas L., Subramanian S.S. y Nair A.G. (1971). "Synthesis of glucuronides in the flavonoid-series 3.Isolation of apigenin-7-D-glucuronides from *Ruellia tuberosa* L. and its synthesis".*Chemische Berchte*. 104(9), 2681-2687

49Singh R., Pandey H. y Singh B. (2002). "A NEW TRITERPENOID FROM *Ruellia tuberosa* Linn". Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medical Chemistry, **41B(8)**, 1754-1756.

50Misra T., Singh R., Pandey H., Pandey R. y Singh B. (1997). " TWO NEW ALIPHATIC COMPOUNDS FROM *Ruellia tuberosa* Linn". *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medical Chemistry*,**36B(12)**, 1194-1197.

51Chiobouaphong Phakeovilay, Wannaporn Disadee, Poolsak Sahakitpichan, Somkit Sitthimonchai, Prasat Kittakoop, Somsak Ruchirawat y Tripetch Kanchanapoom. "Phenylethanoid and flavone glycosides from *Ruellia tuberosa* L.The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2012.March 2012. Pag. 1-6.

-
- 52Kamboj A. y Kamur Sauja A. (2013).“ Development of validated HPTLC method for quantification of stigmasterol from leaf and stem of *Bryophyllum pinnatum*”. *Arabian Journal of Chemistry* (**2017**), S2644-S2650.
- 53Pérez J. y Pujol M. (2001).Validación de métodos analíticos. Primera edición, España, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria: 15.
- 54Kamal A., Singh M., Ahmad F.J., Saleem K. y Ahmad S. (2013).“ A validated HPTLC method for the quantification of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum* and etoposide in marketed formulation”. *Arabian Journal of Chemistry*, (2017)10, S2539-S2546,
- 55 Rathee D., Rathee S., Rathee P., Deep A., Anandjiwala S. y Rathee D. (2011). “ HPTLC densitometric quantification of stigmasterol and lupeol from *Ficus religiosa*”. *Arabian Journal of Chemistry*, (2015)8, 366-371.
- 56 Al-Massarani S., El Gamal A., Alam P., Al-Sheddi E., Al-Oqail M. y Farshori N. (2016).” Isolation, biological evaluation and validated HPTLC-quantification of the marker constituent of the edible Saudi plant *Sisymbrium irio* L”. *Saudi Pharmaceutical Journal*, (2017)25, 750-759
- 57Marcucci O., González-Mujica F. y Pérez-Ayuso E. (1983). “ALTERATIONS OF LIVER NUCLEAR ENVELOPES ACCOMPANYING THIOACETAMIDE ADMINISTRATION IN RATS”.*Acta Cient. Venezolana*, **34(2)**, 109-117.
- 58Burchell A. and Waddell I. D. (1991). “THE MOLECULAR BASIS OF THE HEPATIC MICROSOMAL GLUCOSE-6-PHOSPHATASE”.*Biochim.Biophys. Acta-Molecular Cell Research*,**1092(2)**, 129-137.
- 59Lowry O., Rosebrough H., Farr A. y Randall R. (1951). “PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT”.*J. Biol. Chem.*, **193(1)**, 209-220.
- 60Markwell M., Hass S., Bieber L. y Tolbert N. (1978). “A MODIFICATION OF THE LOWRY PROCEDURE TO SIMPLIFY PROTEIN DETERMINATION IN MEMBRANE AND LIPOPROTEIN SAMPLE”.*Analytical Biochemistry*, **87(1)**, 206-210.
- 61William B. y Wilson K. (1981). “PRINCIPIOS Y TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA”. Editorial Omega. Barcelona-España.
- 62 González-Mujica F., Bermúdez J. (2017). “EL SISTEMA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA. ALGUNOS DE SUS INHIBIDORES”. Editorial Académica Española. Deutschland-Alemania. Página 23.
- 63 González-Mujica F., Bermúdez J. (2017). “EL SISTEMA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA. ALGUNOS DE SUS INHIBIDORES”. Editorial Académica Española. Deutschland-Alemania. Página 9.

6. ANEXOS

A. Determinación de exactitud del método

La exactitud del método fue comprobado utilizando las placas de CCF realizadas para la cuantificación de β -sitosterol. Para esta determinación, se utilizaron las concentraciones de los patrones que se encuentran en la Tabla 4.4 de la página 89.

La concentración experimental del patrón $[\beta\text{-sitosterol}]_{\text{patrón}}$ fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\beta\text{-sitosterol}_{\text{patrón}} = \frac{A - b}{m} \quad (8)$$

Siendo A , el área cada del patrón a determinar su concentración experimental, obtenida en los densitogramas de la Figura; b , el punto de corte de la ecuación de la recta obtenido en la curva de calibración para cada placa y; m la pendiente de la curva.

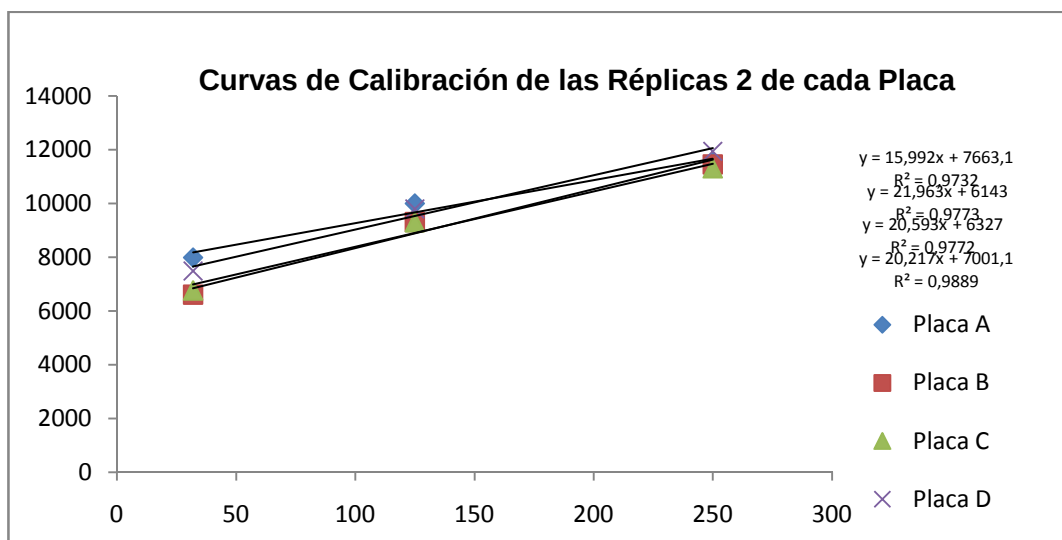
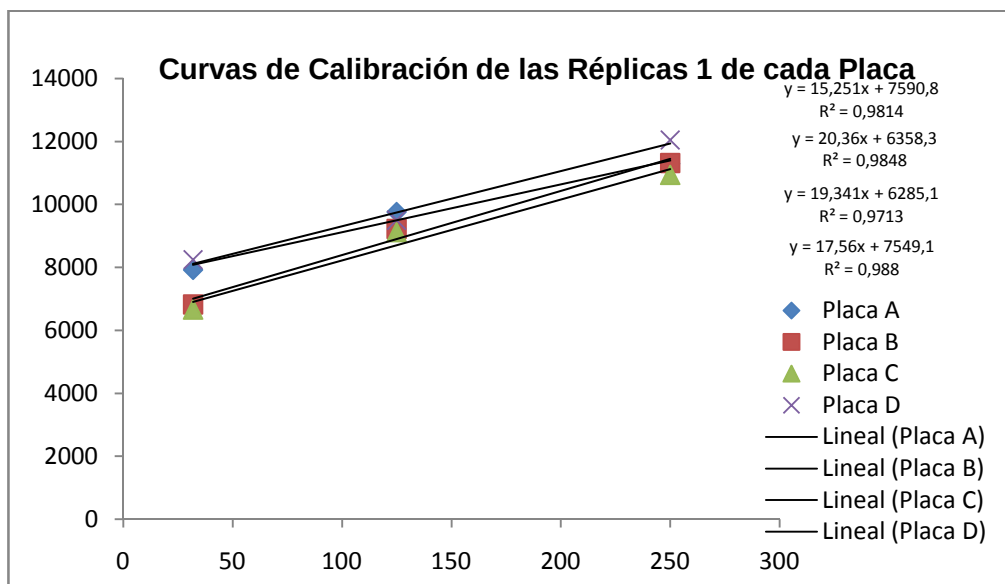
Luego de obtenida la concentración experimental para cada placa de CCF que se utilizó en la cuantificación del metabolito se comparó con la concentración real del mismo mediante la ecuación (5) de la página 31 de esta trabajo de investigación.

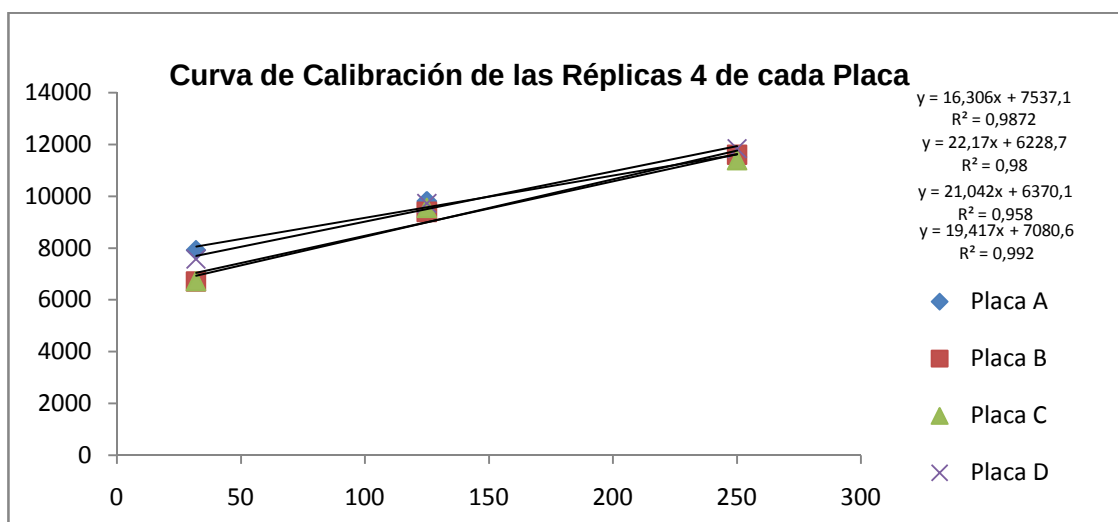
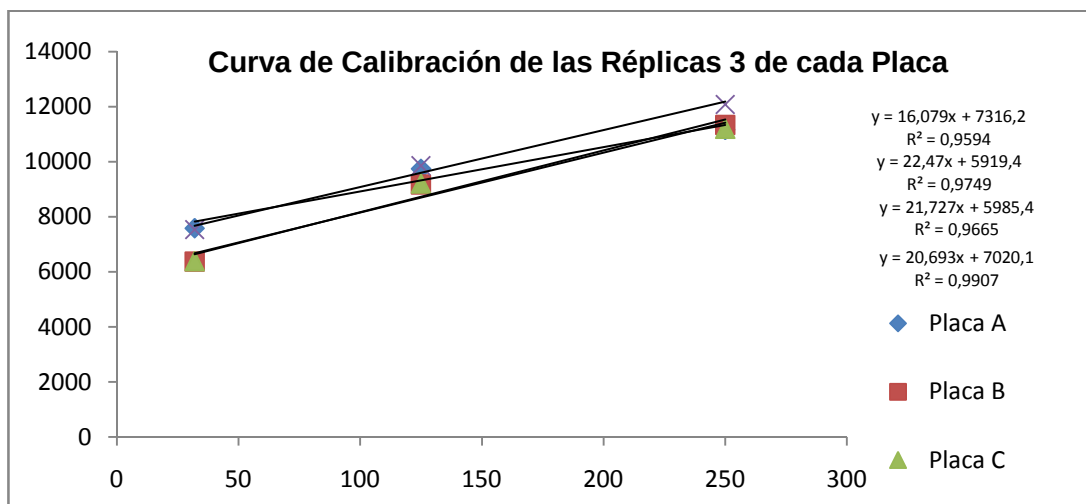
Los valores de las áreas obtenidos en los densitogramas se observan en la siguiente tabla A-1, así como los valores de las curvas de calibración obtenidas.

Tabla A-1. Réplicas de las áreas obtenidas en los densitogramas para la determinación de la exactitud.

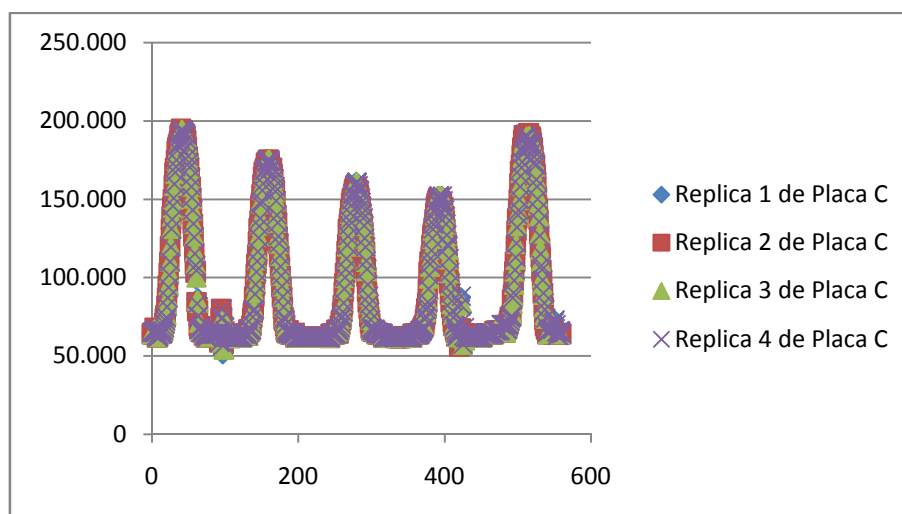
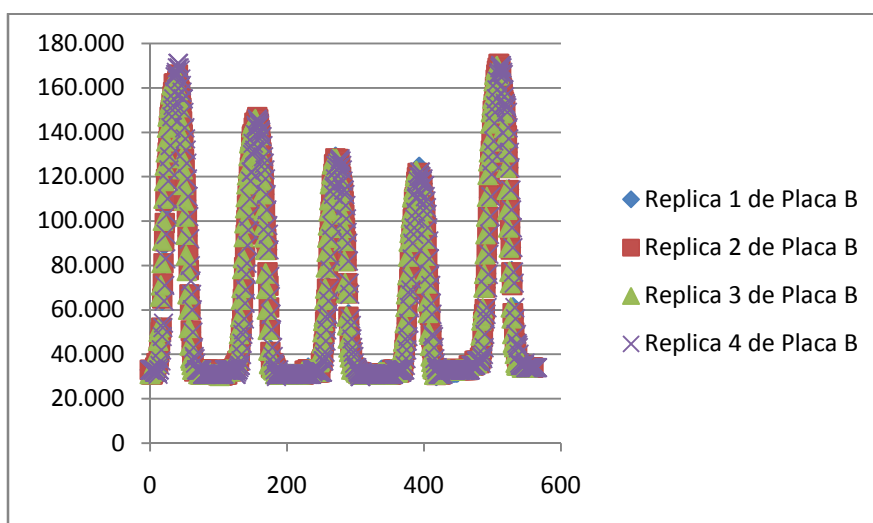
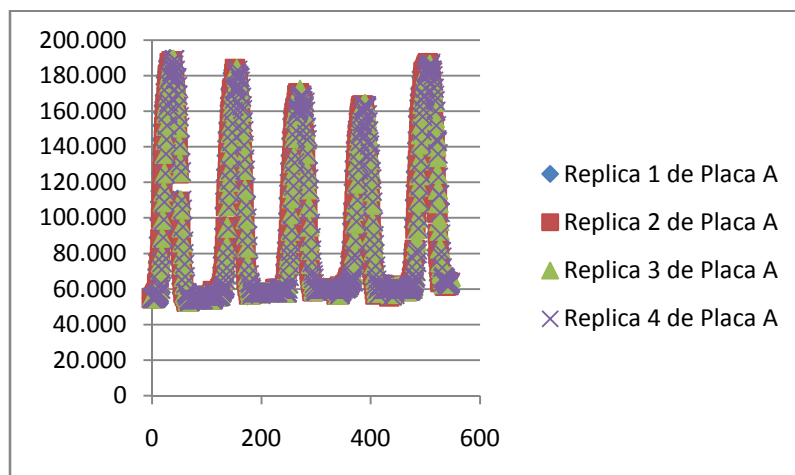
Patrones (mg/L)	Área (UA)			
	A	B	C	D
250	11290,740	11312,376	10941,790	12043,154
250	11518,447	11454,083	11306,205	11940,276
250	11158,447	11343,376	11199,790	12085,861
250	11513,861	11601,326	11394,033	11840,861
125	9861,790	9221,790	9120,962	9500,548
125	9996,083	9309,669	9297,255	9798,205
125	9742,255	9181,790	9210,376	9858,497
125	9808,962	9398,083	9554,790	9727,790
32	7927,083	6827,134	6664,134	8250,740
32	7983,255	6604,305	7244,598	7493,255
32	7592,134	6378,305	6903,012	7537,841
32	7924,962	6709,891	6725,548	7575,669
Parámetros de la recta en cada réplica				
m	15,896	21,741	20,675	19,472
b	7536,636	6162,365	6241,908	7162,699
r ²	0,9753	0,9792	0,9689	0,9899
Calculo de β-sitosterol (mg/L) a partir de la ecuación de recta				
X1	8599,841	7624,426	7509,010	8641,497
X2	8688,255	7508,134	7624,598	8267,962
X3	8370,841	7300,144	7383,012	8299,255
X4	8574,841	7599,719	7699,305	8282,719
Promedio	64,3	61,9	63,4	62,1
Error	0,9	0,3	0,6	0,4
Cv	1,4	0,5	0,9	0,6

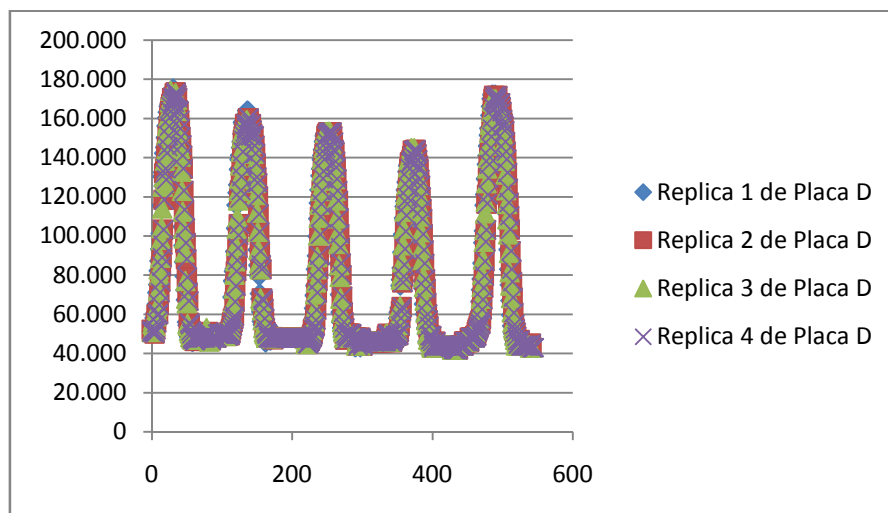
A continuación, se muestran las curvas de calibración obtenidas con las áreas de los densitogramas utilizados para la determinación de la exactitud.





A continuación, se muestran los gráficos donde se comparan las réplicas por placa de CCF para esta determinación. Así, es posible observar la reproducibilidad de los resultados para una determinación cuantitativa.





B. Cuantificación de lupeol en RtR-K

Las soluciones madres de lupeol y RtR-K fueron preparadas utilizando los datos que se encuentran en la Tabla 4.1 de la página 68.

La concentración M_c de las soluciones madres, el error propagado s_{M_c} y el coeficiente de variación (CV) fueron calculados utilizando las ecuaciones (9), (10) y (11), respectivamente.

$$M_c \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \text{mg } M \times \frac{1}{V_{\text{aforo}}(\text{mL})} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} \quad (9)$$

$$s_{M_c} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = M_c \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \sqrt{\frac{s_{V_{\text{aforo}}}^2}{V_{\text{aforo}}^2} + \frac{s_{\text{mgmuestra}}^2}{\text{mg}_{\text{muestra}}^2}} \quad (10)$$

$$\text{CV \%} = \frac{s_{M_c} \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{M_c \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \times 100\% \quad (11)$$

La masa de las muestras fue calculada por diferencia de masas (al 0,1 mg más cercano), de modo que el error en la determinación de la masa viene dado por la ecuación (12).

$$s_{mg_{muestra}} = \sqrt{s_{masa_{final}}^2 + s_{masa_{inicial}}^2} \quad (12)$$

Sabiendo que las medidas de masas (inicial y final) se realizaron en una balanza analítica de precisión $\pm 0,1$ mg, al sustituir estos valores en la ecuación [A4], se tiene que el error de la masa obtenida está representado por la ecuación (13):

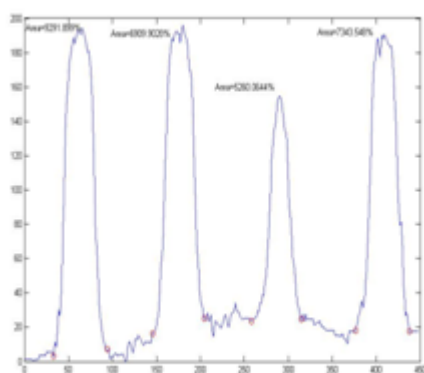
$$s_{mg_{muestra}} = \sqrt{0,1 \text{ mg}^2 + 0,1 \text{ mg}^2} = 0,02 \text{ mg} \quad (13)$$

Las concentraciones de las soluciones preparadas para construir la curva de calibración, se calcularon utilizando la ecuación (14), y para el cálculo de su desviación estándar, se utilizó la ecuación (15). Los resultados se observan en la tabla 4.4, página 73.

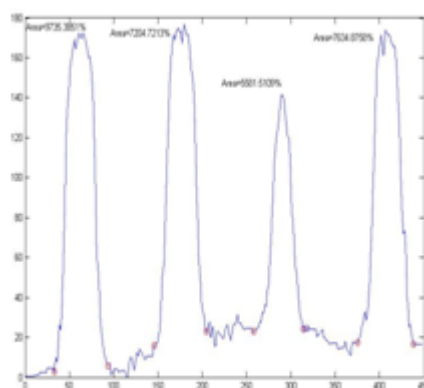
$$\text{Lupeol}_{diluída} = \text{Lupeol}_c \frac{\text{mg}}{\text{L}} \frac{V_{alícuota} \text{ (mL)}}{V_{aforo} \text{ (mL)}} \quad (14)$$

$$s_{\text{Lupeol}_{diluída}} = \text{Lupeol}_{diluída} \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \sqrt{\frac{s_{V_{aforo}}^2}{V_{aforo}^2} + \frac{s_{V_{alícuota}}^2}{V_{alícuota}^2} + \frac{s_{\text{Lupeol}_{concentrada}}^2}{\text{Lupeol}_{concentrada}^2}} \quad (15)$$

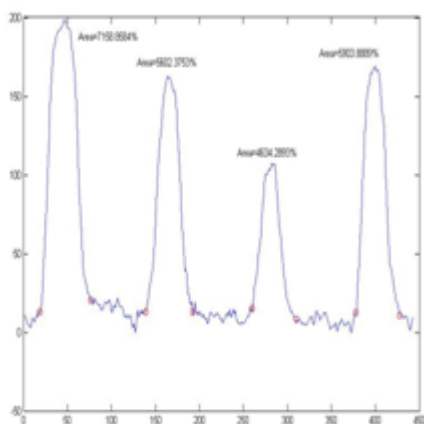
A continuación, se muestran las réplicas de los densitogramas obtenidos para la placa de la Figura 60(pág. 73), utilizada en la cuantificación de lupeol. En la Tabla 4.5, (pág. 74), se aprecian las áreas de los picos de los densitogramas para cada placa. Se realizaron 4 réplicas por cada placa, para obtener 4 resultados de áreas por cada concentración del estándar utilizado al igual que para la muestra, obteniéndose las Figuras B-1, B-2 y B-3.



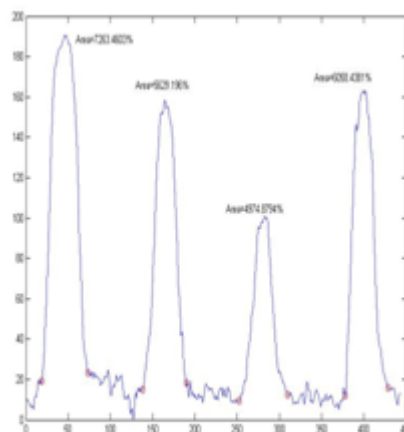
a)



b)



c)



d)

Figura B-1 .- Réplicas de los densitogramas obtenidos para la placa 60a, pág. 73. Con los diferentes fondos de placa.

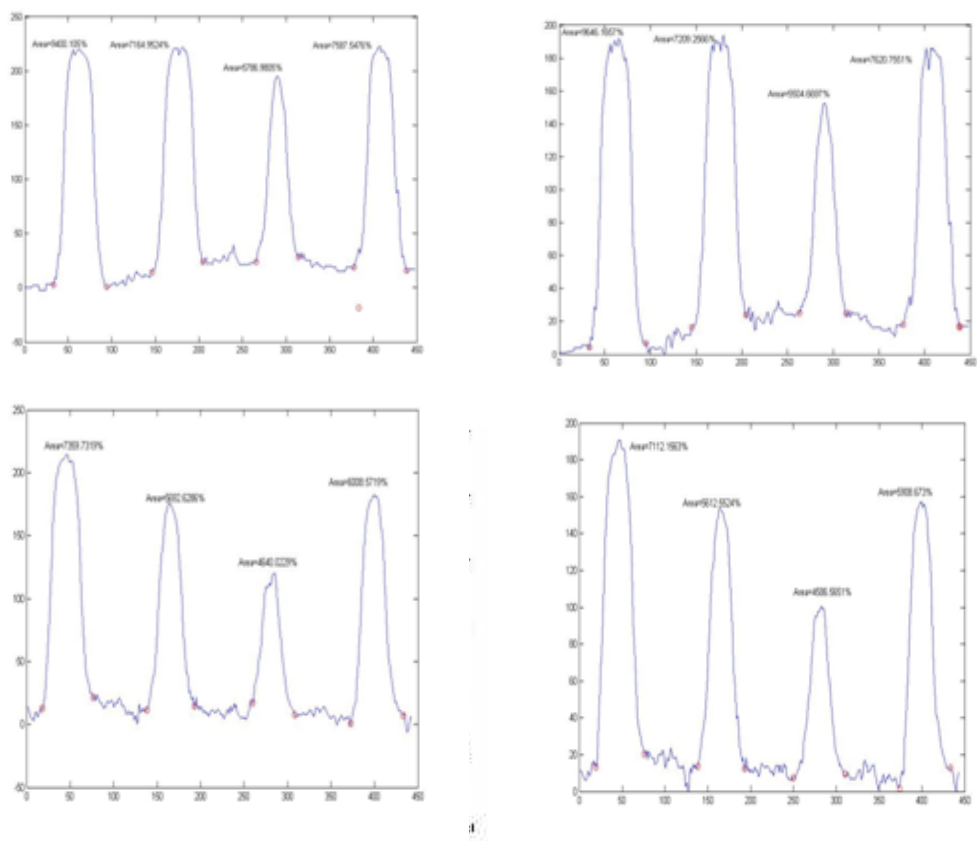


Figura B-2.- Réplicas de los densitogramas obtenidos para la placa 60b, pág. 73. Con los diferentes fondos de placa

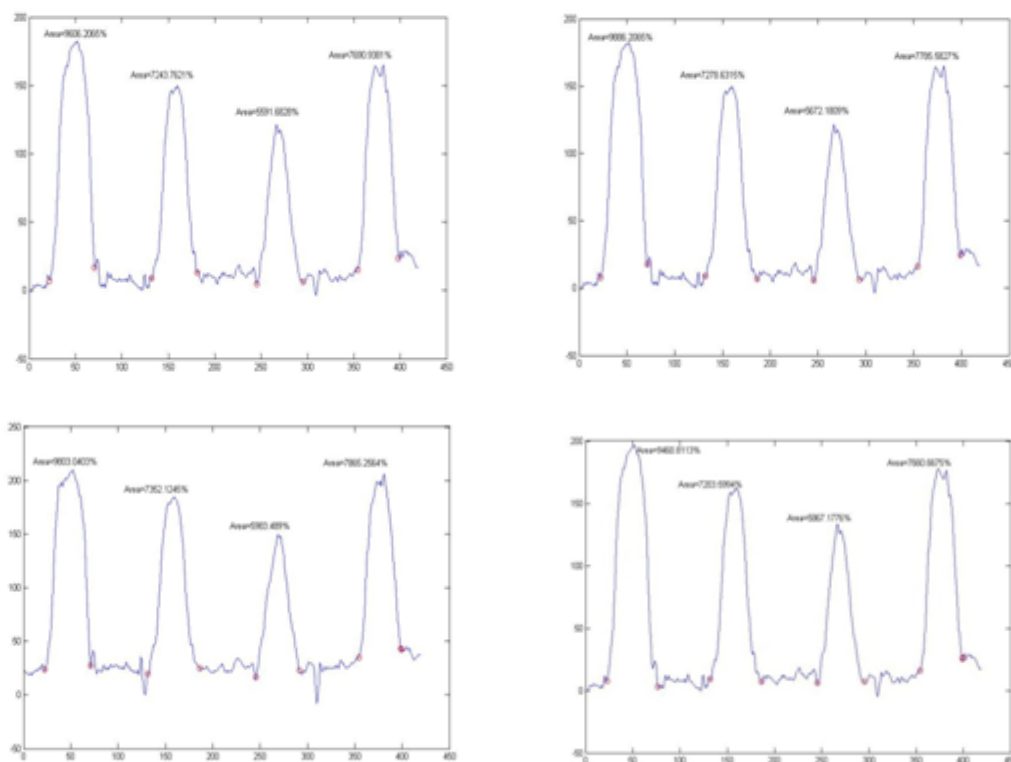


Figura B-3.- Replicas de los densitogramas obtenidos para la figura 60c, pág. 73 con diferentes fondos de placa.

Empleando el método de mínimos cuadrados en el programa Microsoft Excel, se graficó el área en función de la concentración de los patrones de lupeol para cada placa cromatográfica. Usando todos los valores de área (Figuras B-1 al B-3) y el promedio de los valores del área, se obtuvo la siguiente ecuación de recta en ambos casos:

$$A = m \cdot \text{Lupeol} \frac{\text{mg}}{\text{L}} + b \quad (16)$$

Dónde A, es el área bajo la curva medida en unidades de área (ua), m, es la pendiente de la curva expresada en (ua/ppm), y b, el punto de corte expresado en ua.

En cada serie de medidas se determinó los parámetros de la línea recta, por mínimos cuadrados, que cumple con la ecuación (16), los cuales varían entre sí sólo en los errores de la pendiente y el punto de corte así como en el valor de R^2 . Al utilizar los valores promedios, se obtuvo un R^2 más cercano a la unidad que al utilizar los valores de cada réplica, Tabla B-4.

Tabla B-1: Resultados de la placa a de los parámetros de la curva de calibración y concentración obtenida de lupeol en la fracción RtR-K.

Parámetros de la recta en cada réplica				
m	15,73	14,66	16,91	15,63
b	3869	4168	3823	3855
r²	0,9968	0,9965	0,9960	0,9932
Calculo de Lupeol (mg/L) a partir de la ecuación de recta				
X1	129,35	129,01	129,23	130,85
X2	129,41	131,38	129,23	130,91
X3	129,19	131,38	129,36	130,92
X4	129,35	131,38	129,34	130,91
Promedio	129,33	130,79	129,29	130,90
Error	0,09	1,18	0,07	0,03
CV (%)	0,07	0,90	0,05	0,02

Tabla B-2: Resultados de la placa 2 de los parámetros de la curva de calibración y concentración obtenida de lupeol en la fracción RtR-K.

Parámetros de la recta en cada réplica				
m	24,93	26,01	22,71	25,55
b	4095	4306	4647	4321
r^2	0,9929	0,9946	0,9967	0,9926

Calculo de Lupeol (mg/L) a partir de la ecuación de recta				
X ₁	130,30	127,98	129,48	129,13
X ₂	131,17	127,98	129,48	129,13
X ₃	130,49	127,31	125,77	129,15
X ₄	130,49	127,31	129,48	129,19
Promedio	130,61	127,64	128,55	129,15
Error	0,38	0,38	1,86	0,03
CV (%)	0,29	0,30	1,44	0,02

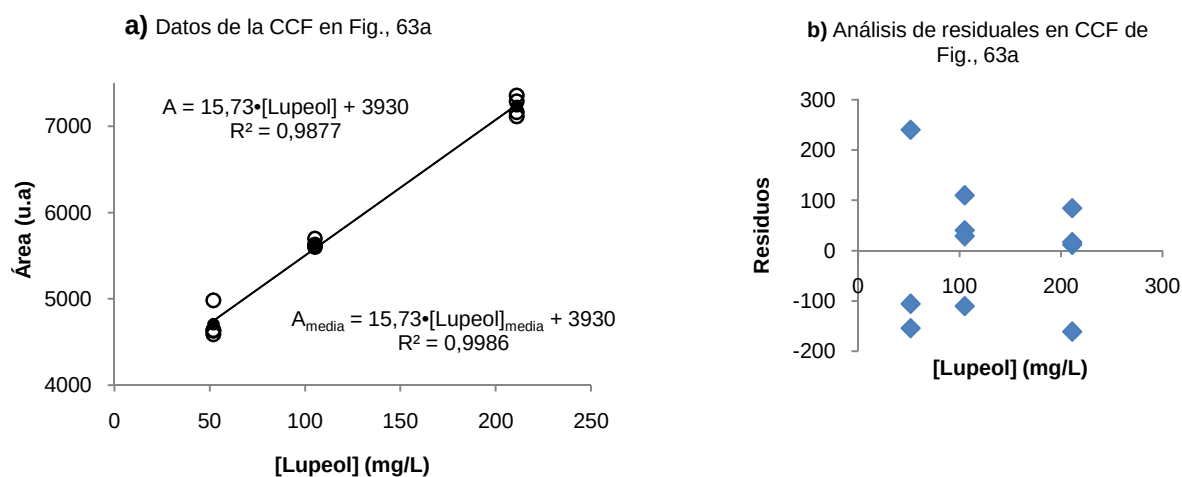
Tabla B-3: Resultados de la placa 3 de los parámetros de la curva de calibración y concentración obtenida de lupeol en la fracción RtR-K.

Parámetros de la recta en cada réplica				
m	24,80	26,22	23,90	22,44
b	4440	4401	4787	4757
r²	0,9923	0,9974	0,9990	0,9980
Calculo de Lupeol (mg/L) a partir de la ecuación de recta				
X1	131,08	129,10	128,84	129,36
X2	128,04	129,10	129,25	129,40
X3	129,65	129,22	129,25	129,24
X4	129,09	129,10	129,67	129,40
Promedio	129,46	129,13	129,25	129,35
Error	1,27	0,06	0,34	0,07
CV (%)	0,98	0,04	0,26	0,06

Tabla B-4. Parámetros de las rectas obtenidas durante la cuantificación de lupeol en RtR-K por densitometría óptica.

Datos	Pendiente	Punto de corte	R ²
Figura 63a			
Réplicas	15,73 ± 0,55	3930 ± 77	0,9877
Promedio	15,73 ± 0,58	3930 ± 81	0,9986
Figura 63b			
Réplicas	24,79 ± 0,97	4343 ± 135	0,9851
Promedio	24,79 ± 1,84	4343 ± 256	0,9945
Figura 63c			
Réplicas	24,33 ± 0,76	4597 ± 106	0,9902
Promedio	24,33 ± 1,29	4597 ± 180	0,9972

Debido a que el análisis de residuales (Figura B-4), produce una distribución de los residuos alrededor del eje horizontal, se concluye que los errores cometidos durante la adquisición de la data de área (Tabla 4.3, pág., 85), son aleatorios, lo cual implica que no hay errores asociados al analista u operador.



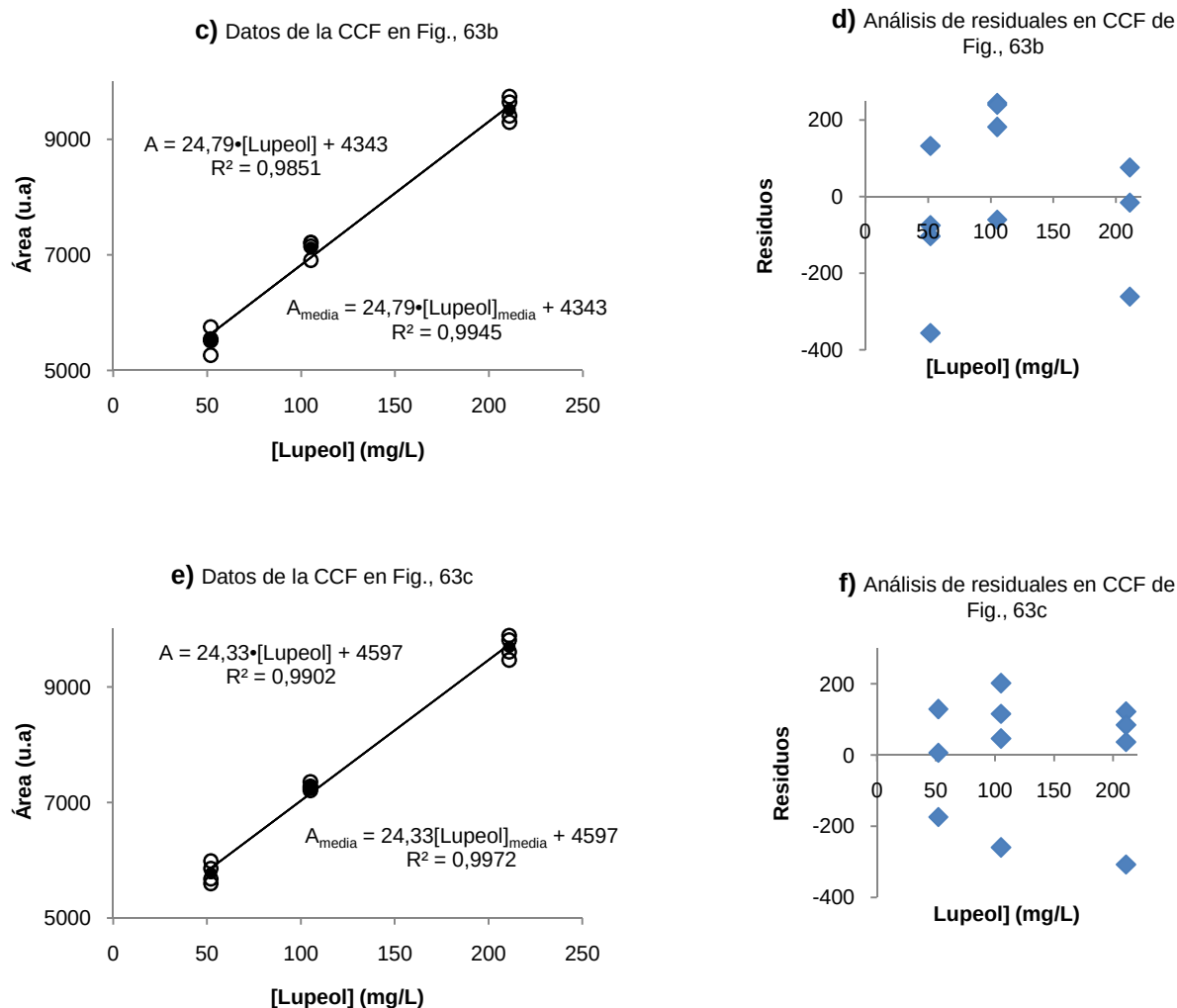


Figura B-4. Curvas de calibración y análisis de residuales de los datos obtenidos en la cuantificación de lupeol en la muestra RtR-K de (378 ± 4) ppm.

La concentración de lupeol (Tabla 4.5) en la muestra RtR-K, de (378 ± 4) ppm, fue calculada a través de la ecuación (17), proveniente de la ecuación (16). Para ello, se utilizaron los valores de área de RtR-K obtenidos en las placas cromatográficas de la Figura 63, reportadas en la Tabla 4.3.

$$\text{Lupeol } \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{A_{\text{RtR-K}} - b}{m} \frac{\text{mg}}{\text{L}} \quad (17)$$

Seguidamente, se calculó el error propagado de la concentración de lupeol empleando la ecuación (18).

$$s_{\text{Lupeol } \frac{\text{mg}}{\text{L}}} = \text{Lupeol } \frac{\text{mg}}{\text{L}} \sqrt{\frac{S_{(A_{\text{RtR-K}} - b)}^2}{A_{\text{RtR-K}} - b} + \frac{S_m^2}{m}} \quad (18)$$

Por otra parte, se determinó el contenido porcentual de lupeol a través de las ecuaciones (19) y (20) (Tabla 4.5).

$$\% \text{ Lupeol }_{\text{RtR-K}} \% = \frac{\text{Lupeol }_{\text{RtR-K}}}{\text{RtR} - \text{K}} \times 100\% \quad (19)$$

$$s_{\%[\text{Lupeol}]_{\text{RtR-K}}} \% = \% \text{ Lupeol }_{\text{RtR-K}} \% \times \sqrt{\frac{S_{[\text{Lupeol}]_{\text{RtR-K}}}}{\text{Lupeol }_{\text{RtR-K}}}^2 + \frac{S_{\text{RtR-K}}}{\text{RtR} - \text{K}}^2} \quad (20)$$

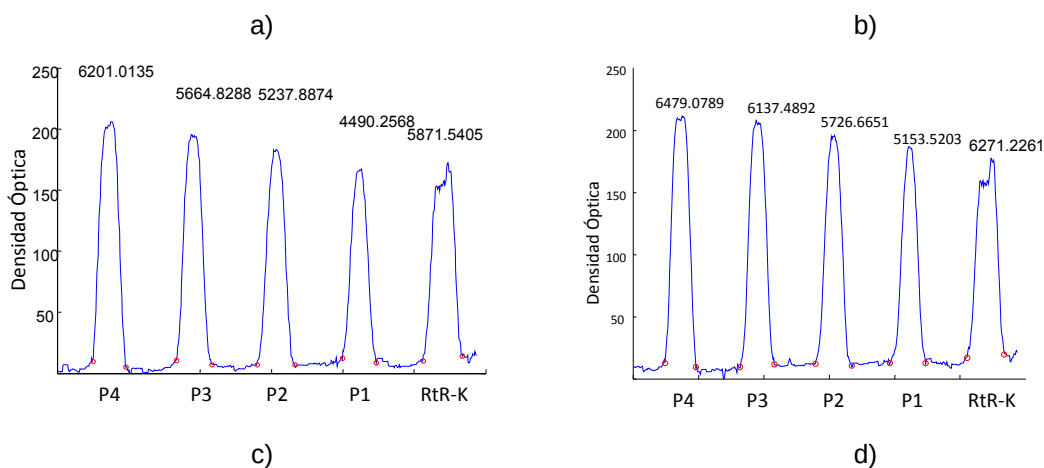
Los resultados de los cálculos para los valores de porcentaje de lupeol en la fracción RtR-K se muestran en la Tabla 4.7, de la página 75.

C. Cuantificación de β -sitosterol

Análogamente a la cuantificación de lupeol, se realizó la cuantificación de β -sitosterol; las soluciones madre de β -sitosterol y RtR-K, fueron preparadas por disolución en THF (Tabla 4.1, pág. 68). A partir de la solución madre de β -sitosterol se prepararon los patrones, para realizar la curva de calibración, por dilución de la solución madre en THF (Tabla 4.4, pág. 73), donde la concentración y su error fueron determinados a través de las ecuaciones (21) y (22). Para realizar la curva de calibración directa, se determinó el área por cuadruplicado (Tabla 4.9, pág. 78) de cuatro placas cromatográficas desarrolladas con AN-6 (Figura 61, pág. 77) y reveladas con anisaldehído- ácido sulfúrico. En las figuras C-1 a C-4, se muestra un densitograma obtenido para las placas cromatográficas de la figura 61. Cada placa cromatográfica contiene 3 μ L de la muestra RtR-K de (1000 ± 7) ppm y 5 μ L de los patrones de β -sitosterol indicados en la tabla 4.4.

$$\beta\text{-sitosterol diluida} = [\beta\text{-sitosterol}]_C \frac{\text{mg}}{\text{L}} \frac{V_{\text{alícuota}} (\text{mL})}{V_{\text{aforo}} (\text{mL})} \quad (21)$$

$$S_{\beta\text{-sitosterol diluida}} = \beta\text{-sitosterol diluida} \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \sqrt{\frac{S_{V_{\text{aforo}}}^2}{V_{\text{aforo}}^2} + \frac{S_{V_{\text{alícuota}}}^2}{V_{\text{alícuota}}^2} + \frac{S_{\text{Lupeol concentrada}}^2}{\text{Lupeol concentrada}^2}} \quad (22)$$



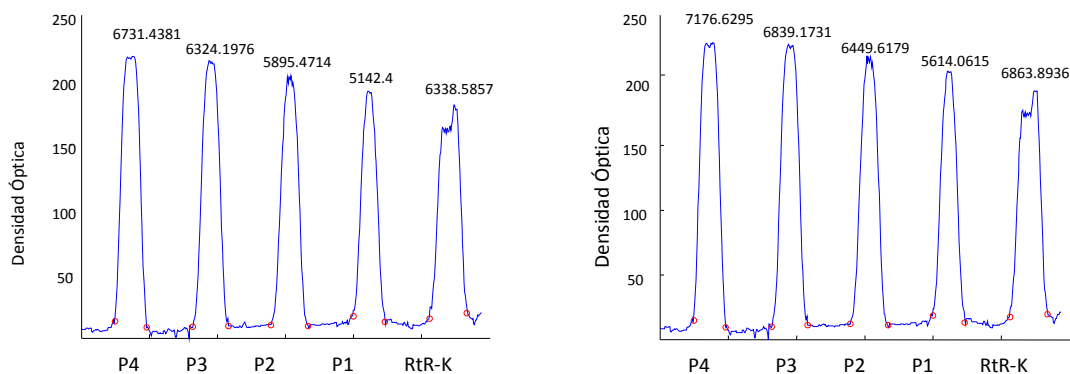


Figura C-1.- Replicas de los densitogramas obtenidos para la placa 1a de la Figura 64, diferentes fondos de placa.

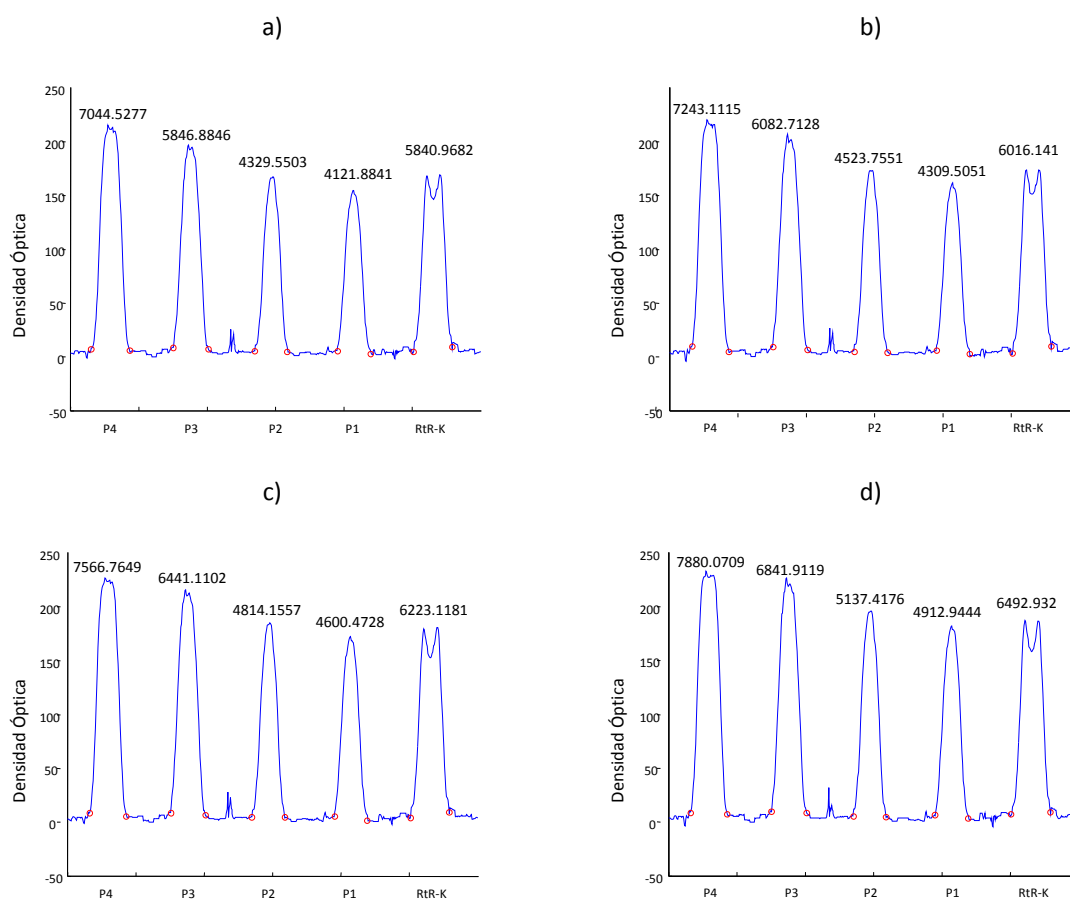


Figura C-2.- Replicas de los densitogramas obtenidos para la placa 1b de la Figura 64: con

diferentes fondos de placa.

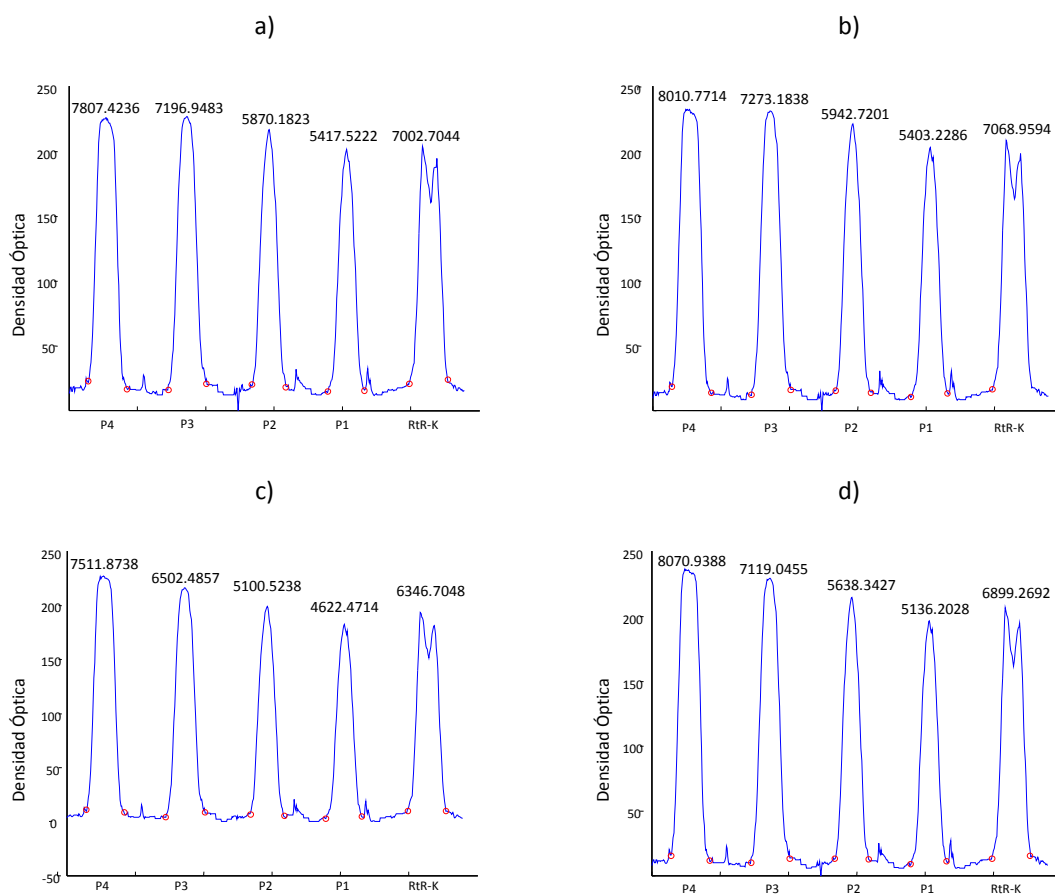


Figura C-3.- Replicas de los densitogramas obtenidos para la placa 1c de la Figura 64: con diferentes fondos de placa.

a)

b)

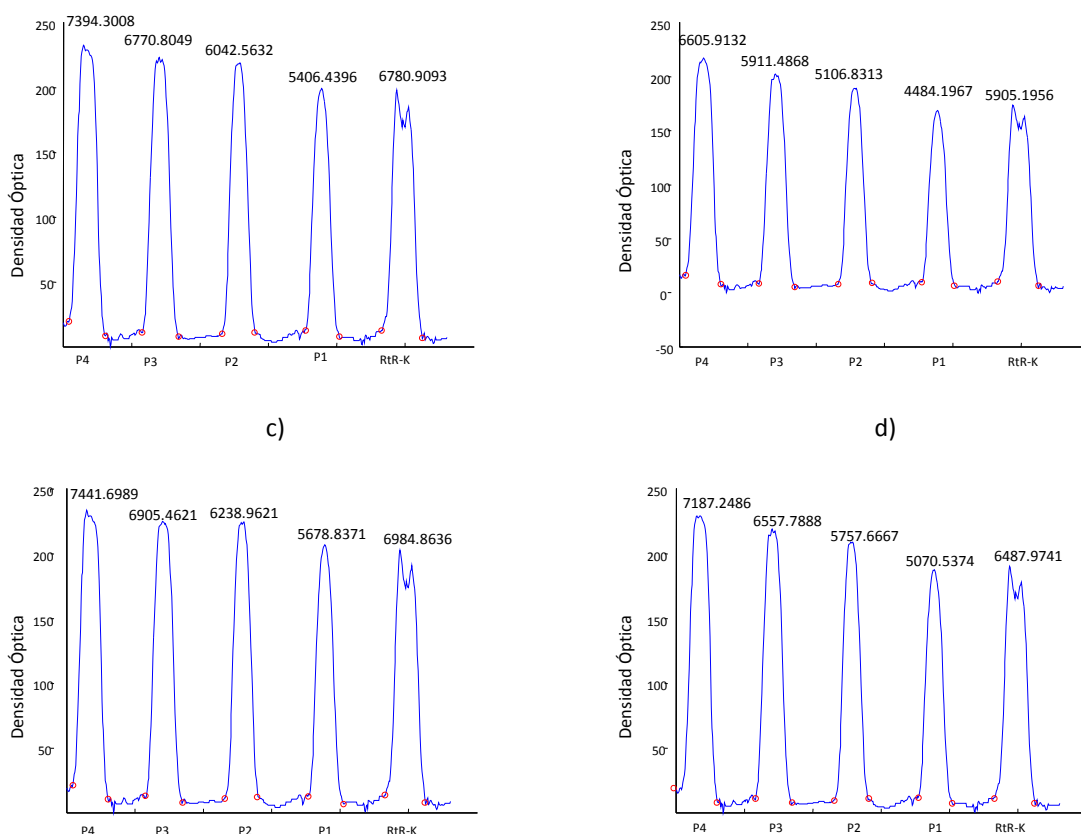


Figura C-4.- Replicas de los densitogramas obtenidos para la placa 1d de la Figura 64: con diferentes fondos de placa.

Empleando el método de mínimos cuadrados en el programa Microsoft Excel, se graficó el área en función de la concentración de los patrones de β -sitosterol para cada placa cromatográfica. Usando todos los valores de área (Figuras C-1 al C-4), y el promedio de los valores de esas área, se obtuvo la ecuación de recta en ambos casos que se muestra en la Tabla C-5:

$$A = m \cdot \beta\text{-sitosterol} \frac{\text{mg}}{\text{L}} + b \quad (23)$$

Dónde: A es el área bajo la curva medida en unidades de área (ua); m es la pendiente de la curva expresada en (ua/ppm); b es el punto de corte expresada en ua. En cada serie de medidas se determinó los parámetros de la línea recta por mínimos cuadrados que cumple con la ecuación (23), los cuales varían entre sí sólo en los errores de la pendiente y el punto de corte. Los valores de r^2 fueron prácticamente iguales en ambos casos y son cercanos a la unidad, tabla C-5.

Debido a que el análisis de residuales (Figura C-5) produce una distribución de los residuos alrededor del eje horizontal, se concluye que los errores cometidos durante la adquisición de la data de área (Tabla 4.7) son aleatorios, lo cual implica que no hay errores asociados al analista u operador.

Tabla C-1. Réplicas para una misma placa cromatográfica, Figura61a.

Patrones (mg/L)	Área (UA)			
	A1	A2	A3	A4
250	6201,0135	6479,0789	6731,4381	7176,6295
250	6201,0135	6479,0789	6736,9714	7193,2308
250	6195,7973	6451,1411	6745,4476	7176,6295
250	6201,0135	6479,0789	6736,9714	7203,1667
125	5664,8288	6137,4892	6324,1976	6839,1731
125	5651,6306	6137,4892	6333,3357	6848,7500
125	5651,6306	6127,3122	6324,1976	6839,1731
125	5651,6306	6127,3122	6314,6167	6839,1731
63	5237,8874	5726,6651	5895,4714	6449,6179
63	5234,0450	5716,4809	5885,0571	6439,9615
63	5259,1532	5713,4043	5885,0571	6414,7641
63	5246,3739	5726,6651	5873,4714	6428,1436
32	4490,2568	5153,5203	5142,4000	5614,0615
32	4515,2297	5043,4258	5154,9616	5667,6795
32	4499,9865	5076,2416	5154,9616	5634,9833
32	4505,5000	5043,4258	5154,9619	5634,9833
RtR-K	5871,5405	6271,2261	6338,5857	6863,8936
RtR-K	5871,5405	6202,3469	6378,7667	6884,2333
RtR-K	5871,5405	6251,1974	6376,4667	6904,8949
RtR-K	5856,0135	6251,1974	6378,7667	6863,8936

Parámetros de la recta en cada réplica

m	4,98	3,82	4,37	3,84
b	4972	5551	5678	6260
r2	0,9878	0,9403	0,9572	0,9434

Calculo de β -sitosterol (mg/L) a partir de la ecuación de recta

X1	180,46	188,61	151,26	157,23
X2	180,46	170,57	160,46	162,53
X3	180,46	183,36	159,93	167,91
X4	177,34	183,36	160,46	157,23
Promedio	179,7	181,5	158,0	161,2
Error	1,6	7,7	4,5	5,1
Cv	0,87	4,23	2,86	3,17

a) el patrón P1 de 32 ppm representó un dato anómalo en el comportamiento de r2

Tabla C-2. Réplicas para una misma placa cromatográfica, Figura 61b.

Patrones (mg/L)	Área (UA)			
	A1	A2	A3	A4
250	7044,5277	7243,1115	7566,7649	7880,0709
250	7021,2785	7253,6368	7566,7649	7880,0709
250	7027,1482	7253,6368	7556,6609	7868,9157
250	7017,0441	7243,1115	7572,3015	7889,8027
125	5846,8846	6082,7128	6441,1102	6841,9119
125	5841,2205	6081,4527	6453,1301	6851,8467
125	5835,0067	6071,9595	6435,2581	6820,5575
125	5841,2205	6095,2027	6453,1301	6833,8563
63	4329,5503	4523,7551	4814,1557	5137,4176
63	4332,3687	4538,3834	4801,3501	5132,705
63	4327,6892	4507,223	4801,3501	5141,9291
63	4327,6892	4514,625	4801,3501	5132,705
32	4121,8841	4309,5051	4600,4728	4912,9444
32	4127,4026	4308,397	4608,0183	4905,0843
32	4127,4026	4308,397	4600,4728	4912,9444
32	4135,2349	4317,8159	4610,6907	4912,9444
RtR-K	5840,9682	6016,1410	6223,1181	6492,9320
RtR-K	5840,9682	6020,1157	6223,1181	6492,9320
RtR-K	5831,3636	6020,1157	6223,1181	6485,9914
RtR-K	5840,9682	6016,1410	6223,1181	6485,9914

Parámetros de la recta en cada réplica				
m	13,65	13,81	13,95	13,94
b	3595	3775	4058	4376
r2	0,9952	0,9954	0,9949	0,9960

Calculo de β -sitosterol (mg/L) a partir de la ecuación de recta				
X1	164,55	162,26	155,27	151,89
X2	164,55	162,55	155,27	151,89
X3	163,85	162,55	155,27	151,39
X4	164,55	162,26	155,27	151,39
Promedio	164,4	162,4	155,3	151,6
Error	0,4	0,2	0,0	0,3
Cv	0,21	0,10	0,00	0,19

el patrón P₃ de 125 ppm representó un dato anómalo en el comportamiento de r^2

Tabla C-3. Réplicas para una misma placa cromatográfica, Fig 61c

Patrones (mg/L)	Área (UA)			
	A1	A2	A3	A4
250	7807,4236	8010,7714	7511,8738	8070,9388
250	7768,0148	7983,9808	7508,6595	8049,4948
250	7768,0148	8010,7714	7511,8738	8043,278
250	7802,1182	7997,9338	7524,6786	8070,9388
	7196,9483	7273,1838	6502,4857	7119,0455
	7179,1626	7273,1838	6494,5667	7128,7063
	7196,9483	7284,5812	6494,5667	7119,0455
	7196,9483	7273,1838	6496,8119	7119,0455
63	5870,1823	5942,7201	5100,5238	5638,3427
63	5869,7118	5899,1538	5100,5238	5662,4336
63	5906,9212	5956,1624	5097,1167	5676,3042
63	5906,9212	5883,4466	5092,7881	5650,6573
32	5417,5222	5403,2286	4622,4714	5136,2028
32	5386,234	5393,0791	4622,8095	5115,3986
32	5402,5099	5381,5641	4626,5857	5126,7832
32	5417,5222	5393,0791	4630,4048	5146,5105
RtR-K	7002,7044	7086,9594	6346,7048	6899,2692
RtR-K	7002,7044	7051,9637	6357,7452	6916,1311
RtR-K	7002,7044	7051,9637	6334,3881	6899,2692
RtR-K	6979,7118	7051,9637	6357,7452	6913,1503
Parámetros de la recta en cada réplica				
m	10,61	11,63	13,09	13,18
b	5142	5103	4244	4770
r ²	0,9960	0,9960	0,9995	0,9985
Calculo de β-sitosterol (mg/L) a partir de la ecuación de recta				
X1	175,31	170,57	160,67	161,59
X2	175,31	167,56	161,52	162,87
X3	175,31	167,56	159,73	161,59
X4	173,14	167,56	161,52	162,65
Promedio	174,8	168,3	160,9	162,2
Error	1,1	1,5	0,9	0,7
Cv	0,62	0,89	0,53	0,42

a) el patrón P₃ de 125 ppm representó un dato anómalo en el comportamiento de r^2

Tabla C-4. Réplicas para una misma placa cromatográfica, Fig 61d

Patrones (mg/L)	Área (UA)			
	A1	A2	A3	A4
250	7394,3008	6605,9132	7441,6989	7187,2486
250	7374,9945	6614,1725	7441,6989	7223,5302
250	7374,9945	6621,9890	7471,6837	7223,5302
250	7366,3132	6621,9890	7451,1004	7223,5302
125	6770,8049	5911,4868	6905,4621	6557,7888
125	6766,1951	5905,7973	6897,8598	6543,7823
125	6770,8049	5914,6544	6909,5871	6551,4555
125	6759,8049	5920,3440	6885,7992	6551,4555
63	6042,5632	5106,8313	6238,9621	5757,6667
63	6042,5632	5097,4451	6238,9621	5747,5797
63	6042,5632	5106,867	6254,2765	5746,2371
63	6053,8970	5116,2533	6254,2765	5757,4274
32	5406,4396	4484,1967	5678,8371	5070,5374
32	5399,8049	4485,9209	5678,8371	5064,7385
32	5423,4258	4502,5253	5678,8371	5077,2040
32	5413,0330	4502,5253	5643,4394	5070,5374
RtR-K	6780,9093	5905,1956	6984,8636	6487,9741
RtR-K	6775,2692	5894,7484	6993,3049	6495,6236
RtR-K	6780,9093	5899,8956	6979,7197	6507,4684
RtR-K	6768,4890	5905,1956	7013,5417	6495,6236
Parámetros de la recta en cada réplica				
m	8,33	9,12	7,54	9,10
b	5322	4359	5591	4968
r ²	0,9642	0,9767	0,9637	0,9661
Calculo de β-sitosterol (mg/L) a partir de la ecuación de recta				
X1	175,16	169,55	184,89	167,04
X2	174,48	168,41	186,01	167,88
X3	175,16	168,97	184,21	169,18
X4	173,67	169,55	188,70	167,88
Promedio	174,6	169,1	186,0	168,0
Error	0,7	0,5	2,0	0,9
Cv	0,41	0,32	1,06	0,53

a) el patrón P₃ de 125 ppm representó un dato anómalo en el comportamiento de r^2

Tabla C-5. Parámetros de las rectas obtenidas durante la cuantificación de β -sitosterol en RtR-K por densitometría óptica.

Datos	Pendiente	Punto de corte	R^2
Figura 61a			
Réplicas	$4,26 \pm 0,27$	5615 ± 44	0,9623
Promedio	$4,26 \pm 0,84$	5615 ± 139	0,9624
Figura 61b			
Réplicas	$13,85 \pm 0,30$	3950 ± 45	0,9953
Promedio	$13,85 \pm 0,95$	3950 ± 142	0,9954
Figura 61c			
Réplicas	$12,14 \pm 0,17$	4814 ± 26	0,9980
Promedio	$12,14 \pm 0,53$	4814 ± 80	0,9981
Figura 61d			
Réplica	$8,53 \pm 0,49$	5059 ± 73	0,9684
Promedio	$8,53 \pm 1,54$	5059 ± 231	0,9684

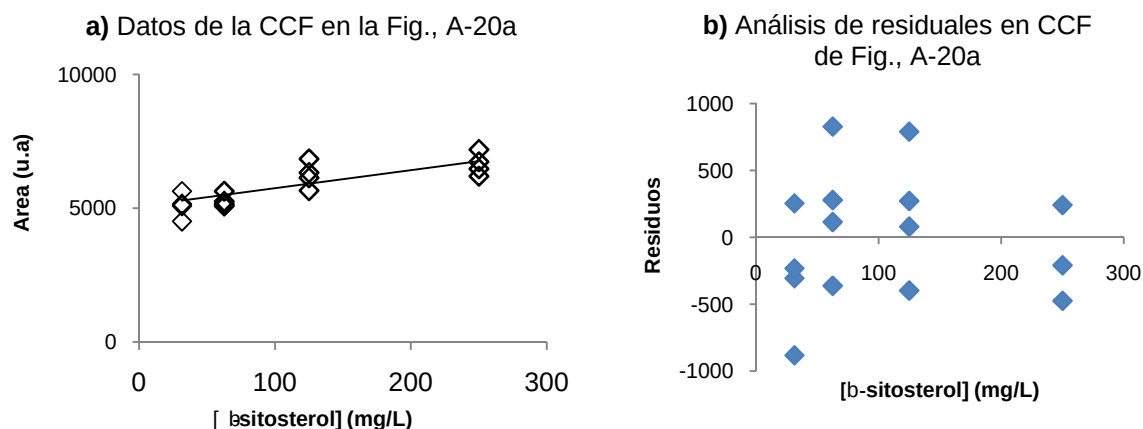


Figura C-5. Curvas de calibración y análisis de residuales de los datos obtenidos en la cuantificación de β -sitosterol en la muestra RtR-K de (1000 ± 7) ppm. (*continúa*).

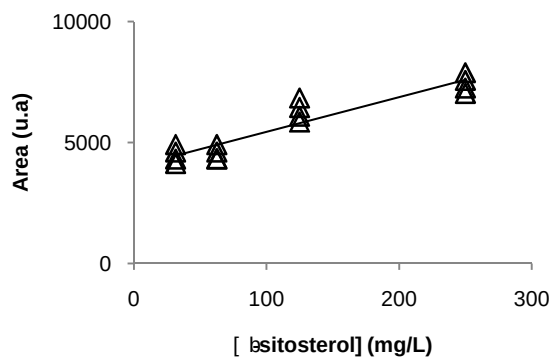
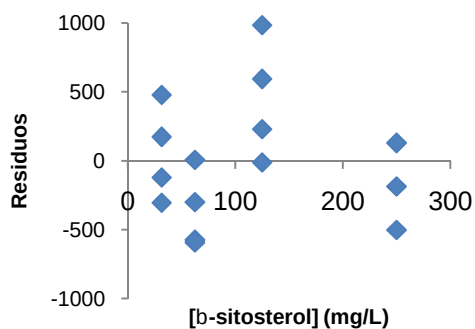
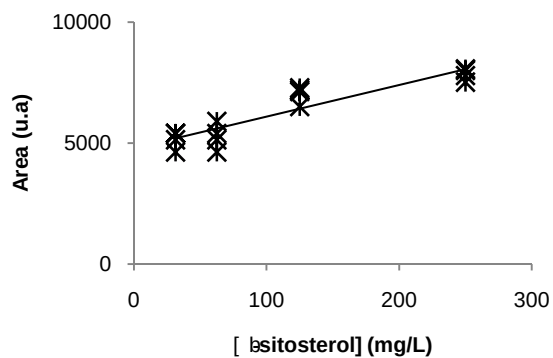
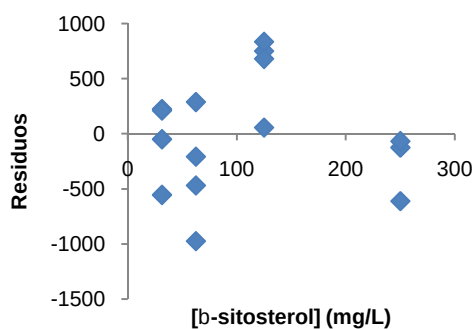
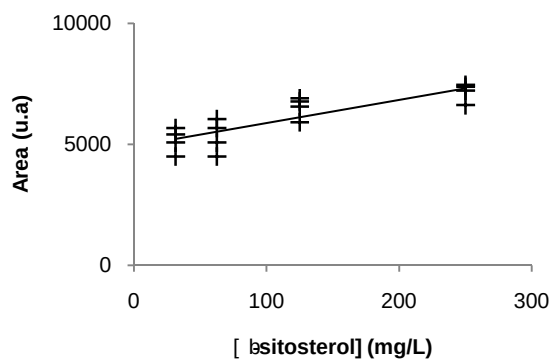
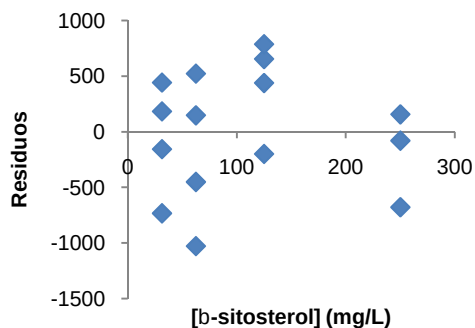
c) Datos de la CCF en la Fig., A-20b**d) Análisis de residuales en Fig., A-20b****e) Datos de la CCF en la Fig., A-20c****f) Análisis de residuales en Fig., A-20c****g) Datos de la CCF en la Fig., A-20d****h) Análisis de residuales en Fig., A-20d**

Figura C-5.Continuación

La concentración de β -sitosterol (Tabla 4.10, pág. 79) en la muestra RtR-K, de (1000 ± 7) ppm, fue calculada a través de la ecuación (24), proveniente de la ecuación (23). Para ello, se utilizaron los valores de área de RtR-K obtenidos en las placas cromatográficas de la Figura 61 reportadas en la Tabla 4.9.

$$\beta\text{-sitosterol} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{A_{\text{RtR-K}} - b}{m} \frac{\text{mg}}{\text{L}} \quad (24)$$

Seguidamente, se calculó el error propagado de la concentración de β -sitosterol empleando la ecuación (25).

$$s_{\beta\text{-sitosterol}} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \beta\text{-sitosterol} \frac{\text{mg}}{\text{L}} \sqrt{\frac{s_{(A_{\text{RtR-K}} - b)}^2}{A_{\text{RtR-K}} - b} + \frac{s_m^2}{m}} \quad (25)$$

Por otra parte, se determinó el contenido porcentual de β -sitosterol a través de las ecuaciones (26) y (27) (Tabla 4.11, pág. 79).

$$\% \beta\text{-sitosterol}_{\text{RtR-K}} \% = \frac{\beta\text{-sitosterol}_{\text{RtR-K}}}{\text{RtR-K}} \times 100\% \quad (26)$$

$$s_{\%[\beta\text{-sitosterol}]_{\text{RtR-K}}} \% = \% \beta\text{-sitosterol}_{\text{RtR-K}} \% \times \sqrt{\frac{s_{[\beta\text{-sitosterol}]_{\text{RtR-K}}}^2}{\beta\text{-sitosterol}_{\text{RtR-K}}} + \frac{s_{\text{RtR-K}}^2}{\text{RtR-K}}} \quad (27)$$

D. Cuantificación de Betulina en las fracción RtR-K

La cuantificación de este metabolito se realizó a partir de las áreas obtenidas de las placas que se observan en la Figura 62(pág., 81). El cálculo de la concentración de betulina en la fracción se realizó a partir de la siguiente ecuación (28):

$$\% \text{ mancha}_{R_f} = \frac{\text{mancha}_{R_f}}{\text{Área total}} \times 100\% \quad (28)$$

Los datos de las áreas de cada una de las manchas observadas en las placas de la figura 62 se encuentran reportadas en la Tabla 4.13(pág., 82) y los porcentajes de betulina en la fracción RtR-K se encuentra documentada en la Tabla 4.13.

A continuación, se muestran los densitogramas de donde se obtuvieron los valores de las áreas que fueron utilizadas para calcular la concentración de betulina en la fracción RtR-K.

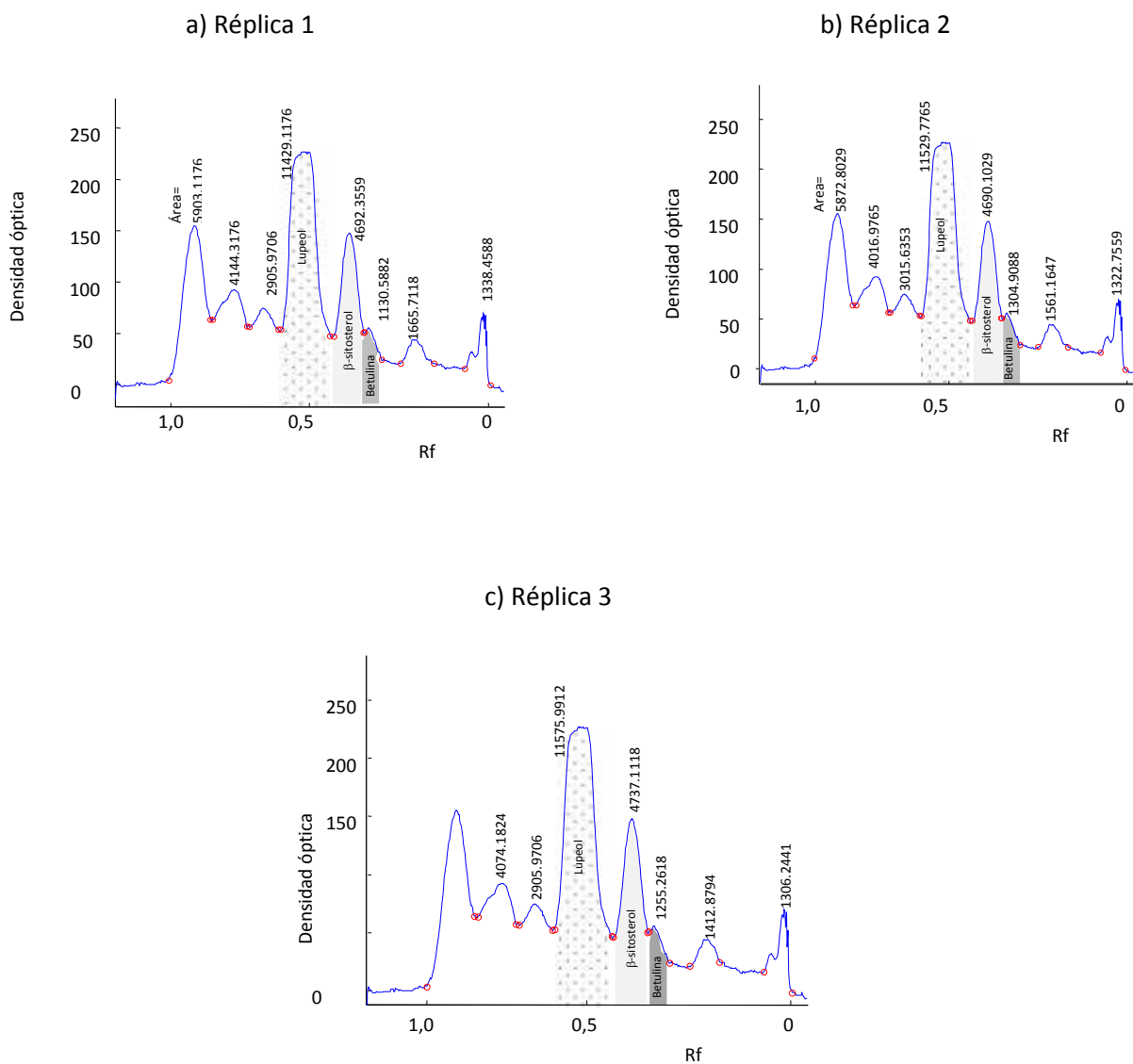


Figura D-1. Densitogramas obtenidos para la cuantificación porcentual de lupeol, β -sitosterol y betulina en la CCF de la Figura 63a.