



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 12/10/2018

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Jhon Alexander Gutiérrez Rivera, con C.C. No. 1075262127,

Jhonatan Germán Puentes Tovar, con C.C. No. 1081156178,

autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado

titulado IDENTIFICACIÓN DE RESINAS GLICOSÍDICAS Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SOBRE
ARTEMIA SALINA DE LOS EXTRACTOS DE *IPOMOEA CARNEA* JACQ

presentado y aprobado en el año 2018 como requisito para optar al título de

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

Jhon Alexander Gutiérrez Rivera

Jhonatan Germán Puentes Tovar

Firma:

Jhon Alexander G.

Firma:

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: IDENTIFICACIÓN DE RESINAS GLICOSÍDICAS Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SOBRE *ARTEMIA SALINA* DE LOS EXTRACTOS DE *IPOMOEA CARNEA* JACQ

AUTOR O AUTORES: Jhon Alexander Gutiérrez Rivera, Jhonatan Germán Puentes Tovar

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Gutierrez Rivera	Jhon Alexander
Puentes Tovar	Jhonathan German

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castañeda Gómez	Jhon Fredy

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

FACULTAD: Educación

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

CIUDAD: NEIVA

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2018

NÚMERO DE PÁGINAS: 91

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas_X_ Fotografías Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___
Tablas o Cuadros

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN :

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. resinas glicosídicas	glycosidic resins	6. <i>Artemia salina</i>	<i>Artemia salina</i>
2. extractos	extracts	7. dosis letal media	medium lethal dose
3. <i>Ipomoea carnea</i>	<i>Ipomoea carnea</i>		
4. cromatografía	chromatography		
5. toxicidad	toxicity		

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El propósito fundamental de este artículo es contribuir a la divulgación científica acerca de los hallazgos en fotoquímica en la especie vegetal *Ipomoea carnea* Jacq, acerca de la presencia de resinas glicosídicas en los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico por medio de pruebas de identificación cualitativas como lo son Molish, Antrona y Keller-Killiani y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y a su vez evaluar la toxicidad de esta especie sobre *Artemia salina* mediante la determinación de la dosis letal media (CL50).se logró demostrar la presencia de azúcares cuya mayor presencia radica en el extracto metanólico, indicando que estos compuestos son arrastrados con mayor facilidad mediante compuestos de característica media y altamente polar, se lograron determinar mediante cromatografía de gases – masas los ácidos y ésteres que componen a los glucósidos en los que se destacan el ácido octanoico, decanoico, giberelínico, 2- propenoico, hexanoico, hexadecanoico, actadecanoico y Bis (2-etilhexil) ftalato, A lo que respecta a la actividad biológica de los extractos obtenidos de la *Ipomoea carnea* Jacq sobre *Artemia salina*, la que presentó la mayor reactividad fue donde se presenciaron azúcares, indicando de cierta manera que la toxicidad de esta planta radica



en estos compuestos.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The main purpose of this article is to contribute to the scientific dissemination of the findings in photochemistry in the plant species *Ipomoea carnea* Jacq, about the presence of glycosidic resins in hexanic, chloroformic and methanolic extracts by means of qualitative identification tests such as are Molish, Antrona and Keller-Killiani and gas chromatography coupled to mass spectrometry, and in turn evaluate the toxicity of this species on *Artemia salina* by determining the mean lethal dose (LC50). It was demonstrated the presence of sugars whose The presence is greater in the methanolic extract, indicating that these compounds are more easily dragged by means of medium and highly polar compounds. The gas and acid chromatography were used to determine the acids and esters that make up the glycosides. octanoic acid, decanioco, gibberelinic, 2-



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

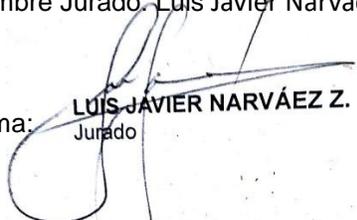
4 de 4

propenoic, hexanoic, hexadecanoic, actadecanoic and Bis (2-ethylhexyl) phthalate, As regards the biological activity of the extracts obtained from Ipomoea carnea Jacq on saline atemia, the one that presented the greatest reactivity was where sugars were observed, indicating a certain way that the toxicity of this plant lies in these compounds.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Jurado: Luis Javier Narváez Zamora

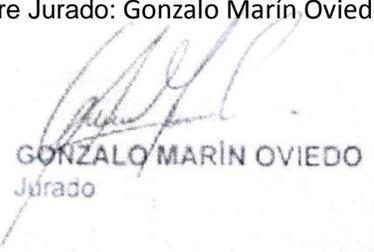
Firma:


LUIS JAVIER NARVÁEZ Z.

Jurado

Nombre Jurado: Gonzalo Marín Oviedo

Firma:


GONZALO MARÍN OVIEDO

Jurado

Vigilada mieducación



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

**IDENTIFICACIÓN DE RESINAS GLICOSÍDICAS Y
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SOBRE *ARTEMIA SALINA* DE
LOS EXTRACTOS DE *IPOMOEA CARNEA* JACQ**

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Presentan:

Jhon Alexander Gutiérrez Rivera

Jhonatan Germán Puentes Tovar

Neiva, Huila, Colombia

Julio, 2018

[Escriba aquí]



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

**IDENTIFICACIÓN DE RESINAS GLICOSÍDICAS Y
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SOBRE *ARTEMIA SALINA* DE
LOS EXTRACTOS DE *IPOMOEA CARNEA* JACQ**

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Presentan:

Jhon Alexander Gutiérrez Rivera

Jhonatan Germán Puentes Tovar

Asesor:

PhD. Jhon Fredy Castañeda Gómez

Neiva, Huila, Colombia

Julio, 2018

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha podido realizar mediante el apoyo de muchas personas, a las cuales se les ha dedicado un espacio muy especial en este documento y de antemano un inmenso agradecimiento de nuestra parte.

Damos gracias a Dios que nos otorgó la vida y por ende disfrutar esta gratificante experiencia plasmada en el trabajo que hoy se logra culminar.

Al profesor Jhon Fredy Castañeda Gómez, por su asesoramiento, dedicación, comprensión y apoyo, gracias ya que nos brindó las herramientas para sacar este proyecto adelante, por ser parte del semillero SIQUS, además de inculcarnos el entusiasmo de investigar.

A la Universidad Surcolombiana, por otorgarnos las instalaciones para llevar a cabo este trabajo, de manera especial a las encargadas de los laboratorios de Biología y Química quienes con su paciencia y buena atención nos brindaron los espacios necesarios dentro de los recintos que ellas custodian.

A nuestros padres, Víctor Germán Puentes Polanía, Martha Cecilia Tovar Marulanda, Sandra Yineth Rivera Conde y Humberto Gutiérrez, por su apoyo, amor y comprensión en todo momento.

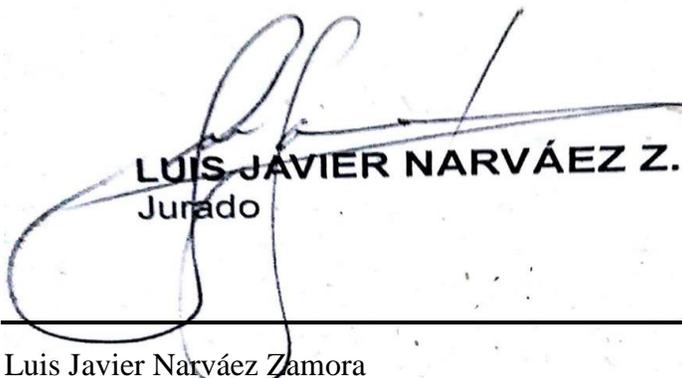
**IDENTIFICACIÓN DE RESINAS GLICOSÍDICAS Y
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SOBRE ARTEMIA SALINA DE
LOS EXTRACTOS DE IPOMOEA CARNEA JACQ**

Por:

Jhon Alexander Gutiérrez Rivera

Jhonatan Germán Puentes Tovar

Aprobado por los jurados



LUIS JAVIER NARVÁEZ Z.
Jurado

Luis Javier Narváez Zamora



GONZALO MARÍN OVIEDO
Jurado

Gonzalo Marín Oviedo

DEDICATORIA

“De manera muy especial dedico esto a dos personas muy importantes, a mi compañera de aventuras; Laura Soraya Puentes Ninco y a mi hija Anggye Ximenna Puentes quienes fueron mi pilar central, la inspiración de sueños e ilusiones y que con su amor y cariño me dieron el más grande de los apoyos, también a mis padres y hermanos quienes me dieron su respaldo en este largo proceso, y a mis maestros quienes aportaron miles de cosas tanto a mi formación como docente y persona.”

Jhonatan Germán Puentes.

“Para Lía Gutiérrez Bermeo, por ser el motor que impulsa mis deseos de superación y el motivo de mis alegrías”

Jhon Alexander Gutiérrez.

ÍNDICE

i. Introducción	144
2. Antecedentes	16
2.2. Nacional	22
2.3 Departamental	22
2.4 Institucional	23
3. Planteamiento del problema	24
4. Objetivos	25
4.1 General	25
5. Justificación	26
6. Marco Teórico	28
6.1. Aspectos generales de la especie vegetal <i>Ipomea carnea</i>	28
6.1.1 Descripción botánica de la especie vegetal <i>Ipomoea carnea</i>	29
6.2 Composición química de las especies vegetales tóxicas	29
6.2.1 Resinas Glicosídicas	29
6.2.2. Identificación de Resinas Glicosídicas	30
6.3 Obtención de azúcares y ésteres	32
6.3.1 Identificación de azúcares	33

6.4. Método cualitativo: Cromatografía de gases-masas (CG-MS)	36
6.5. Evaluación de toxicidad	38
6.5.1. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀)	39
6.5.2. Especie: Descripción Artemia salina	40
7. Metodología	41
7.1 Enfoque Metodológico.....	41
7.2 Colecta y Secado del Material Vegetal	41
7.3 Obtención de los Extractos	42
7.3.1 Prueba de Keller- Killiani	43
7.3.2 Prueba de Molish	43
7.3.3 Prueba de la Antrona.....	43
7.4 Hidrólisis Alcalina de los Extractos	43
7.5 Hidrólisis Ácida de los Extractos	43
7.6 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas para la Identificación de los Ácidos Orgánicos	44
7.6.1 Método T. Pátula:.....	44
7.6.2 Método Alcanos:	44
7.7 Protocolo Experimental para la Preparación de Bioensayo de Toxicidad con Artemia salina	44

8. RESULTADOS Y Análisis.....	46
8.1. Secado y Pulverizado de la Especie Vegetal Ipomoea carnea Jacq	46
8.2 Preparación de los Extractos	46
8.3 Pruebas de Reconocimiento de Azúcares	48
8.4. Hidrólisis Alcalina y Acida de los Extractos de Ipomoea carnea Jacq	53
8.5 Identificación de los Ácidos Grasos Mediante CG-MS	53
8.6 Bioensayo de toxicidad sobre Artemia salina	67
9. Conclusiones	84
10. Bibliografía	85
11. Anexos	89

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura No.1.</i> Estructura general de una resina glicosídica realizada en ACD Labs... 31	31
<i>Figura No.2.</i> Reacción química obtenida para la prueba de Molish en ACD Labs.... 34	34
<i>Figura No.3.</i> Reacción química obtenida para la prueba de Antrona en ACD Labs.. 35	35
<i>Figura No.4.</i> Reacción química obtenida para la prueba de Keller-Killani en ACD Labs 36	36
<i>Figura No.5.</i> Equipo cromatografo de masas CG-MS..... 37	37
<i>Figura No.6.</i> Diagrama de funcionamiendo del equipo CG-MS 38	38
<i>Figura No.7.</i> Mapa saletilal en los puntos de muestreo Vereda el Triunfo 41	41
<i>Figura No.8.</i> Proceso general de obtención de extractos..... 42	42
<i>Figura No.9.</i> Proceso de extracción mediante maceración con disolventes 47	47
<i>Figura No.10.</i> Montaje del proceso de rotaevaporación..... 47	47
<i>Figura No.11.</i> Proceso de filtrado del macerado de la planta. 48	48
<i>Figura No.12.</i> Prueba de Molish positiva para el extracto clorofórmico. 49	49
<i>Figura No.13.</i> Prueba de Molish positiva para el extracto metanólico..... 49	49
<i>Figura No.14.</i> Prueba de Keller-Killani positiva para el extracto clorofórmico. 50	50
<i>Figura No.15.</i> Prueba de Keller-Killiani positiva para el extracto metanólico. 51	51
<i>Figura No.16.</i> Prueba de la Antrona negativa para el extracto clorofórmico 52	52
<i>Figura No.17.</i> Prueba de la Antrona negativa para el extracto metanólico. 52	52
<i>Figura No.18.</i> Cromatograma del producto de hidrólisis acida del extracto clorofórmico..... 53	53
<i>Figura No.19.</i> Espectro de masas del ácido octanoico. 54	54

<i>Figura No.20.</i> Cromatograma de la hidrolisis básica del extracto clorofórmico.....	55
<i>Figura No.21.</i> Espectro de masa ácido 3- fenil-2-propenoico (hidrolisis básica del extracto clorofórmico, Alcanos).....	56
<i>Figura No.22.</i> Espectro de masas del ácido hexadecanoico (hidrolisis básica del extracto clorofórmico; método Alcanos).	57
<i>Figura No.23.</i> Espectro de masas del ácido octadecanoico (hidrolisis básica del extracto clorofórmico; método Alcanos).	58
<i>Figura No.24.</i> Cromatograma de la hidrolisis acida del extracto metanólico	59
<i>Figura No.25.</i> Cromatograma de la hidrolisis básica del extracto metanólico.....	59
<i>Figura No.26.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido octanoico mediante el software ADC LABS	60
<i>Figura No.27.</i> Estructuras en 3D del ácido octanoico mediante el software ADC LABS	61
<i>Figura No.28.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido decanoico mediante el software ADC LABS	61
<i>Figura No.29.</i> Estructuras en 3D del ácido decanoico mediante el software ADC LABS	61
<i>Figura No.30.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido 2 propenoico mediante el software ADC LABS	62
<i>Figura No.31.</i> Estructuras en 3D del ácido 2 propenoico mediante el software ADC LABS	62
<i>Figura No.32.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido octadecanoico mediante el software	

ADC LABS	63
<i>Figura No.33.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido octadecanoico mediante el software	
ADC LABS	63
<i>Figura No.34.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido hexanoico mediante el software ADC	
LABS	63
<i>Figura No.35.</i> Estructuras en 3D del ácido hexanoico mediante el software ADC	
LABS	64
<i>Figura No.36.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido decanoico mediante el software ADC	
LABS	64
<i>Figura No.37.</i> Estructuras en 3D del ácido decanoico mediante el software ADC	
LABS	64
<i>Figura No.38.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido 3- fenil-2 – propenoico mediante el	
software ADC LABS	65
<i>Figura No.39.</i> Estructuras en 3D del ácido 3- fenil-2 – propenoico mediante el	
software ADC LABS	65
<i>Figura No.40.</i> Estructuras en Zig-Zag del ácido hexadecanoico mediante el software	
ADC LABS	66
<i>Figura No.41.</i> Estructuras en 3D del ácido hexadecanoico mediante el software ADC	
LABS	66
<i>Figura No.42.</i> Montaje del bioensayo de Artemia salina con extractos de Ipomoea	
carnea jac (elaboración propia)	68
<i>Figura No.43.</i> Montaje del bioensayo en Artemia salina	69

<i>Figura No.44.</i> Monitoreo del bioensayo en Artemia salina.....	69
<i>Figura No.45.</i> Gráfica de dispersión de numero de organismos muertos vs la concentración del extracto hexánico.	75
<i>Figura No.46.</i> Gráfica de dispersión de numero de organismos vs la concentración del extracto clorofórmico.	76
<i>Figura No.47.</i> Gráfica de dispersión de numero de organismos vs la concentración del extracto Metanólico.....	77
<i>Figura No.48.</i> Gráfica de la relación dosis respuesta del extracto metanólico.....	79
<i>Figura No.49.</i> Grafica de la relación dosis respuesta del extracto clorofórmico.....	80
<i>Figura No.50.</i> Gráfica de la relación dosis respuesta del extracto metanólico.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla No.1.</i> Antecedentes internacionales para la familia Convolvulaceae	17
<i>Tabla No.2.</i> Antecedentes internacionales para la especie Ipomoea carnea Jacq.....	21
<i>Tabla No.3.</i> Resultados obtenidos de las pruebas de identificación de azúcares.....	48
<i>Tabla No.4.</i> Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula.....	54
<i>Tabla No.5.</i> Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula.....	55
<i>Tabla No.6.</i> Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula.....	59
<i>Tabla No.7.</i> Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula.....	60
<i>Tabla No.8.</i> Control de mortalidad en el extracto Hexánico.....	70
<i>Tabla No.9.</i> Control de mortalidad en el extracto Clorofórmico.	71
<i>Tabla No.10.</i> Control de mortalidad en el extracto Metanólico.....	72
<i>Tabla No.11.</i> Datos para hallar el CL50 por el método probit.....	76
<i>Tabla No.12.</i> Clasificación de toxicidad de acuerdo a la dosis letal media según CYTED.	83

1. INTRODUCCIÓN

Por milenios, a las plantas se les ha atribuido incontables usos dentro de las civilizaciones, como medicinas, alimento, para decoración y fragancias, etc. Para el caso de las especies pertenecientes al género *Ipomoea* (Familia Convolvulaceae) se encuentran estudios etnomédicos que muestran su potencial como antiinflamatorias, antioxidantes, antidiabéticas, anticancerosas, antimicrobianas, cicatrización de heridas, inmunomoduladoras, cardiovasculares y hepatoprotectoras, lo que ha llevado a que estas características milenarias de diferentes tribus a nivel mundial abran un campo nuevo en la medicina producto de las resinas glicosídicas de este género de plantas.

En la agricultura, estas especies han sido empleadas como insecticidas, antimicóticos y repelentes contra ciertas plagas de insectos y contra algunas clases de herbívoros. Para el desarrollo de este trabajo de investigación, se seleccionó la especie *Ipomoea carnea*, la cual presenta cierta toxicidad para el ganado, posiblemente asociado a la bioacumulación de selenio en sus hojas, flores y frutos. Estas especies son empleadas como ornamentales en hogares y parques, debido al colorido de sus flores y su fácil adaptabilidad al clima.

La especie *Ipomoea carnea* pertenece a la familia *convolvulácea*, crece en el bosque seco tropical, en donde encuentra las condiciones necesarias para su desarrollo. Es un arbusto que presenta un tallo grueso leñoso y con muchas ramas en su base, hojas alternas simples y pecioladas.

Con respecto a los usos etnobotánicos de esta planta, se ha encontrado que puede actuar como “antidiabética, antiinflamatoria, antioxidante, anticancerosa”, entre otras Meira, Silva, & David. (2012) (página 18).

Para la especie *Ipomoea carnea* no hay estudios en la literatura científica sobre el conocimiento de las resinas glicosídicas, como metabolitos únicos presentes en especies de la familia Convolvulaceae. Sin embargo, se ha establecido que los glicósidos de otras especies de Convolvuláceas actúan como fitotoxinas que inhiben la germinación y el crecimiento radicular de semillas a nivel *in vitro*.

Este trabajo de investigación describe la identificación de azúcares en los extractos

de la especie *Ipomoea carnea*, la naturaleza de estos azúcares como moléculas que se encuentran asociadas a ésteres de ácidos grasos y el potencial biocida de los extractos ricos en azúcares sobre el crustáceo *Artemia salina*, ya que sobre esta especie se realizará una evaluación de toxicidad que permitirá conocer el potencial agresivo de esta especie vegetal.

Por lo tanto, este trabajo ha sido organizado en los siguientes capítulos, como son: a) los estudios previos o antecedentes de la familia *Convolvulaceae*, el género *Ipomoea* y la especie *Ipomoea carnea* b) el planteamiento del problema, c) los objetivos del trabajo, c) la justificación, d) el marco teórico o estado del arte sobre la química de las resinas glicosídicas, e) la metodología, f) los resultados y los análisis, g) las conclusiones del trabajo, i) las referencias bibliográficas y finalmente los anexos que soportan los resultados obtenidos.

2. ANTECEDENTES

La revisión de trabajos previos o antecedentes sobre la química de resinas glicosídicas en especies de Convolvuláceas a nivel internacional, nacional, departamental e institucional, se realizó mediante una búsqueda en las bases de datos vinculadas a la biblioteca de la Universidad Surcolombiana, tales como: *Redalyc*, *Scielo* y *Science direct*. La revisión se hizo desde el año 2000 hasta el 2016, encontrándose las siguientes investigaciones relacionadas.

2.1 Internacional

A nivel mundial, son muchos los trabajos de investigación relacionados con el tema de las resinas glicosídicas, presentes en especies vegetales de la familia Convolvulaceae. Países centroamericanos y asiáticos como México, China y Japón, han contribuido al conocimiento de esta clase de productos naturales y al desarrollo de técnicas analíticas para la separación y la identificación de glicósidos, los cuales componen la compleja mezcla de resinas localizadas tanto en las partes aéreas como en las raíces de las plantas. A continuación, se hace una síntesis de los trabajos previos relacionados con esta temática, que apoyan la propuesta de identificar oligosacáridos o glicolípidos en la especie vegetal *Ipomoea carnea*, y dentro de los cuales, no hay estudios profundos en la literatura científica. Lo anteriormente dicho se encuentra condensado en las Tablas No. 1 y No. 2 correspondiente a los antecedentes

Tabla No. 1. Antecedentes internacionales para la familia Convolvulaceae

Autor	Nombre del trabajo	Objetivo	Metodología	Conclusiones
Pereda, Fragoso, Escalante., Hernández, Linares (2006)	Resin glycosides from <i>Ipomoea wolcottiana</i> as modulators of the multidrug resistance phenotype in <i>vitro</i>	Aumentar el conocimiento de la diversidad estructural de las resinas glicosídicas de <i>I. wolcottiana</i> como moduladores de la multifármaco resistencia en células tumorales humanas.	Se preparó el extracto clorofórmico y se obtuvieron las fracciones ricas en resinas por cromatografía de columna que se purificaron mediante cromatografía de líquidos en fase reversa con C ₁₈ . Los compuestos se evaluaron como	Se purificaron cinco glicolípidos denominados wolcotina I y wolcotinosidos I-IV. Los compuestos mostraron revertir la resistencia de las células de cáncer en combinación con los antibióticos (con 25 µg/mL del glicolípidos, se

			moduladores de la actividad antibiótica en bacterias resistentes a tetraciclina, Kanamicina y Cloranfenicol y como moduladores de citotoxicidad en células de cáncer de mama resistentes a Vinblastina.	observó una actividad antibiótica de 64 µg/mL)
Al, Sezgin, Dnmez, Redi,& Tasdemir (2007)	Crypto philic Acids A, B, and C: Resin Glycosides from Aerial Parts of <i>Scrophularia crythophyla</i>	Aislar y Elucidar los glicósidos de resina de <i>Scrophularia crythophyla</i>	Las partes aéreas de <i>S. cryptophyla</i> fueron secadas al aire y pulverizadas para su extracción con MeOH. Se realizaron extracciones con hexano, cloroformo y metanol. La fase acuosa de MeOH se repartió con <i>n</i> -BuOH. El extracto de <i>n</i> -BuOH se hidrolizó y se sometió a cromatografía líquida para su identificación.	Se aislaron y se identificaron mediante espectroscopia (UV, IR, ¹ H NMR, RMN ¹³ C y MS), los ácidos criptofílicos A, B y C.
Yong, Q., Song &Guang (2009)	Novel acylated lipooligosa ccharides from the tubers of <i>Ipomoea batatas</i>	Aislar glucósidos de resina solubles en éter, elucidar sus estructuras mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas y llevar a cabo estudios de actividad citotóxica	La extracción se realizó por reflujo con EtOH. El sobrenadante se concentró para producir un residuo, que se repartió entre cloroformo y agua. El extracto de cloroformo se cromatografió sobre gel de sílice y cromatografía en columna de RP-C18 para proporcionar tres fracciones que se purificaron mediante HPLC preparativa RP-18 y con MeOH al 90%. Las resinas se sometieron a tratamiento con base y ácido para la identificación de los azúcares y los ácidos grasos.	Se obtuvieron los batatósidos del ácido operculínico A, ácido operculínico E, y ácido simónico El contenido de "glucósidos de resina" se correlacionó positivamente con la inhibición relativa de la castaña amarilla (<i>Cyperus esculentum</i> L.)
Castañeda & Miranda	Resin Glycosides	Aislar, purificar y	Se llevó a cabo la purificación de las	Se purificó la purgina I como un

(2011)	from the Herbal Drug Jalap (<i>Ipomoea purga</i>)	elucidar los glicolípidos individuales intactos de las partes aéreas de la Jalapa (<i>I. purga</i>).	resinas mediante la extracción con cloroformo, cromatografía de columna y cromatografía de líquidos en fase reversa con C ₁₈ .	dimero tipo éster y los purginósidos I-II como pentasacáridos derivados del ácido hexadecanoico (ácido jalapínico).
Takigawa., Muto, Kabata, Okawa, Kinjo., Yoshimitsu, Nohara & Ono (2011)	Calyso lins I-IV, Resin Glycosides from <i>Calystegia soldanella</i>	Aislar y purificar los glicósidos de resina de la especie <i>Calystegia soldanella</i>	Las hojas, tallos y raíces de <i>C. soldanella</i> se extrajeron con metanol. Este extracto se suspendió en H ₂ O y después se extrajo sucesivamente con acetato de etilo y alcohol <i>n</i> - butílico para proporcionar una fracción soluble. La hidrólisis alcalina de los glicolípidos permitió la identificación de los ácidos glicosídicos y los ácidos orgánicos.	Se aisló e identificó la calisolina IV como el primer ejemplo de un hexaglucósido de jalapina, y las calisolinas II y III como los primeros representantes del ácido calisólico A.
Cruz, Castañeda, Figueroa, Mendoza, Lorence, & Pereda (2012)	Mamalian Multidrug Resistance Lipopentase Inhibitors from <i>Ipomoea alba</i> Seeds	Conocer la diversidad química de agentes de reversión de multifármaco resistencia (MDR) mediante el aislamiento de los glicolípidos de <i>Ipomoea alba</i> L (<i>Convolvulaceae</i>)	Los glicolípidos de las semillas se obtuvieron mediante extracción con metanol, cromatografía de columna y cromatografía de líquidos en fase reversa con C ₁₈ .	Se aislaron los albinosidos I-III como pentasacáridos ramificados parcialmente acilados derivados de tres nuevos ácidos glicosídicos, llamados ácidos albinosínicos A-C. Los compuestos mostraron un efecto de potenciación de la susceptibilidad a la vinblastina a 2140 veces, 3,1 veces y 2,6 veces a una concentración de 25 µg / ml.
Castañeda, Charry & Miranda (2012)	Purgin II, a Resin Glycoside Ester-Type Dimer and Inhibitor of Multidrug	Identificar inhibidores de resistencia a múltiples fármacos de tipo glicolípido a partir de las partes	Una fracción de glicósido del extracto cloroformico de <i>I purga</i> se sometió a cromatografía de columna para el aislamiento de	Se obtuvieron cuatro nuevos compuestos, purginas II y III y purginosidos III y IV, además de los purginosidos

	Efflux Pumps from <i>Ipomoea purga</i>	aéreas de <i>Ipomoea purga</i>	glicolipidos que fueron purificados mediante cromatografía de líquidos. Los compuestos se probaron en células tumorales resistentes.	conocidos I y II y Purgin I. La purgina II y III, son dimeros tipo éster del ácido operculínico B, que demostraron revertir la multifármaco resistencia en células de cáncer de mama.
Coro na, Rosas, Castañeda, Aparicio, Figueroa, Pereda, (2016)	Resin glycosides from <i>Ipomoea wolcottiana</i> as modulators of the multidrug resistance phenotype in vitro	Aumentar el conocimiento de las resinas glicosídicas de <i>I. wolcottiana</i> como agentes modificadores de la multifármaco resistencia en células tumorales humanas.	Los glicolípidos de las flores secas de la planta se obtuvieron del extracto clorofórmico que fueron purificados por cromatografía de columna y por cromatografía de líquidos en fase reversa con C ₁₈ . Los compuestos fueron probados como moduladores de la actividad antibiótica en bacterias resistentes a tetraciclina, Kanamicina y Cloranfenicol.	Se purificó la wolcotina I, un dimero tipo éster, y cuatro glicolipidos denominados wolcotinosidos I-IV. Los compuestos mostraron un efecto en combinación con los antibióticos (con 25 µg/mL del glicolípido, se observó una actividad antibiótica de 64 µg/mL)

Tablas No 2. Antecedentes internacionales para la especie *Ipomoea carnea* Jacq

Autor	Nombre del trabajo	Objetivo	Metodología	Conclusiones
Haraguchi, Gorniak, Ikeda, Minami, Kato, Watson, Nash, Molyneux.& Asano (2003)	Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, <i>Ipomoea carnea</i> (<i>Convolvulaceae</i>)	Describir el aislamiento, caracterización y cuantificación de los alcaloides de <i>I. carnea</i> en Brasil.	La extracción y aislamiento de los alcaloides de <i>I. carnea</i> se realizó con EtOH acuoso al 50%. El extracto alcaloidal se cromatografió inicialmente con, Amberlite IR-120B e NH ₄ OH, y luego con la fase Dowex 1 - X2 y agua, produciendo un jarabe incoloro.	Los niveles de swainsonina medidos en todas las partes de la planta, pero especialmente las semillas, superan los niveles mínimos, estimados en 0,001%, necesarios para producir síntomas de locura. Los niveles totales de caliciformes detectados en hojas y semillas de <i>I.</i>

<p>Ríos, Bogado, Merlo, Mussart, Acosta, & Acosta (2007)</p>	<p>Hepatotoxici dad inducida por <i>Ipomoea carnea</i> var. <i>Fistulosa</i> de Argentina en Cabras</p>	<p>Estudiar los efectos tóxicos que causa el consumo de la especie en cabras</p>	<p>Se suministraron tallos, hojas y flores, de forma directa a cinco cabras las cuales se les complementaba su dieta con alfalfa y pastoreo de nueve a diez semanas, en donde se hacía control diario de los síntomas relacionadas con alteraciones orgánicas (postura en marcha y detención, modificación de su temperamento y estado de consciencia) y controles de reflejo. Para medir el efecto de esta planta, sobre las cabras se midió el nivel sérico de la sangre yugular una vez por semana, de igual forma a los animales que</p>	<p><i>carnea</i> en esta investigación se aproximan o superan a los de la swainsonina. Los niveles de toxicidad de las calisteginas en animales aún no se han establecido, pero sus potentes propiedades inhibidoras de la glicosidasa, en particular hacia la \ gamma glucosidasa, sugieren que pueden tener un efecto significativo.</p> <p>Por los niveles séricos y a la histopatología se determinó que por acción del metabolismo reductor de la micro flora y fauna, como también del rumen, se liberan los principios tóxicos y causan grandes afecciones en el hígado, tales como áreas con necrosis centrolubillar como también cambio graso hepatocitario</p>
--	---	--	--	--

<p>Khatiwora, Adsul, Kulkarni, Deshpande, & Kashalkar (2010)</p>	<p>Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of <i>Ipomoea carnea</i></p>	<p>Estimar cuantitativamente el contenido total de flavonoides y fenoles totales de las hojas, tallos y flores de <i>I. carnea</i> por el método espectrofotométrico.</p>	<p>manifestaran severa sémiotica de intoxicación, eran sacrificados para su posterior necropsia</p> <p>Alícuotas de los extractos de éter de petróleo, cloroformo, etanol y agua, se mezclaron con 0,5 mL del reactivo de Folin ciocalteau hasta la obtención de una coloración azulosa.</p>	<p>La presente investigación reveló que las hojas, tallos y flores de <i>I. carnea</i> contienen una cantidad significativa de fenoles y flavonoides.</p>
<p>Khalid, Kumar, Reddy, Jinesh, Kumar, Kumar, & Rao (2011)</p>	<p>Antiinflammatory activity of aqueous extract of <i>Ipomoea carnea</i> jacq</p>	<p>Evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos de hojas de <i>Ipomoea carnea</i>.</p>	<p>Para la determinación del contenido total de flavonoides, se tomaron alícuotas de soluciones del extracto hasta 3 mL de disolución con metanol, añadiéndose secuencialmente 0,1 mL de AlCl₃ (10%), 0,1 mL de tartrato de Na - K y 2,8 mL de agua destilada, esta solución se agita vigorosamente para medir su absorbancia alrededor de 415 nm.</p> <p>La extracción de hojas secas y pulverizadas se llevó a cabo utilizando éter de petróleo, cloroformo, etanol y agua.</p> <p>La actividad antiinflamatoria de los extractos acuosos de las</p>	<p>El extracto acuoso de <i>Ipomoea carnea</i> a una dosis de 500 mg/kg presentó actividad antiinflamatoria en comparación con Etoricoxib (6 mg / kg) empleado como control.</p>

			hojas, se realizó en ratas Winstar albinas sanas entre 10-15 semanas de nacidas.	
Srivastava & Shukla (2015)	Pharmaceutical efficacy of <i>Ipomoea carnea</i>	Poner de relieve los usos tradicionales, la investigación farmacéutica, fitoquímica y farmacológica llevada a cabo en la planta	No se especifica	Las diferentes partes de <i>Ipomoea carnea</i> han sido seleccionadas para diversas actividades farmacológicas en las que se destacan, Actividad antioxidante, antidiabética, antimicrobiana, cardiovascular, antifúngica y anticancerígena.

2.2. Nacional

A nivel nacional son muy pocos los trabajos que tienen como eje de investigación la caracterización de glicósidos en especies de Convolvuláceas colombianas. Con base en la revisión sobre metabolitos secundarios de tipo glicolipídico, se encontró una publicación de la universidad del Quindío, acerca del empleo de métodos cromatográficos por HPLC como el “rasurado de pico”, “corte de núcleo” y “reciclo” para el aislamiento de resinas glicosídicas. Adicionalmente, en este artículo se describen los métodos espectroscópicos de RMN: ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, y NOESY y espectrométricos (FABMS, ESIMS, MALDIMS) para la identificación de esta clase de compuestos (Castañeda, Charry, & Miranda, 2013).

2.3 Departamental

A nivel del departamento del Huila, no se encuentran registros referentes que se relacionen con la temática de la presente investigación.

2.4 Institucional

En la Universidad Surcolombiana se encuentra solamente un trabajo de grado relacionado con la caracterización de resinas glicosídicas de la especie vegetal *Ipomoea purpurea*. En esta investigación se caracterizaron los extractos hidrolizados de la planta a través de las técnicas de cromatografía en capa fina y gases acoplada a espectrometría de masas. A través de la técnica de cromatografía de gases se logró identificar la presencia de azúcares asociados a ácidos grasos en los extractos metanólico y clorofórmico (Vivas & Viveros, 2017)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante los últimos años se ha investigado acerca de los beneficios curativos de las plantas. Específicamente, especies de Convolvuláceas han sido referenciadas por sus usos terapéuticos, así como elemento de decoración en hogares, como cubiertas de cultivos para mejorar su producción.

Los azúcares en forma de resinas y alcaloides han sido los compuestos químicos que se han identificado en las Convolvuláceas como una característica de su quimiotaxonomía. Sin embargo, para la especie *Ipomoea carnea*, son pocos los estudios relacionados con la separación e identificación de azúcares, en contraste con los alcaloides, que han sido ampliamente estudiados, debido a sus componentes presentan un alto poder medicinal. Adicionalmente, evaluaciones sobre la toxicidad de esta especie ha sido documentada, sin embargo, a pesar de su característica como especie nociva, se le ha encontrado algunos usos como planta curativa, tales como, antiinflamatoria, antioxidante, antidiabética, anticancerosa, antimicrobiana, entre otras (Srivastava & Shukla, 2015)

Es de suma importancia identificar la presencia de glucósidos en la especie vegetal *Ipomoea carnea*, y conocer el efecto de los extractos sobre la toxicidad en el crustáceo *Artemia salina*, ya que es un organismo estándar para realizar pruebas de toxicidad de compuestos químicos.

De lo anterior, surgen las siguientes preguntas problema: ¿Hay presencia de azúcares en forma de resinas glicosídicas en los extractos de *Ipomoea carnea*? ¿Cuál es el grado de toxicidad de los extractos de *Ipomoea carnea*?

4. OBJETIVOS

4.1 General

Identificar la presencia de resinas glicosídicas en los extractos de la especie vegetal *Ipomoea carnea* y evaluar su toxicidad contra *Artemia salina*.

4.2 Específicos

Aislar las resinas glicosídicas de las partes aéreas de *Ipomoea carnea*, mediante el empleo de diferentes disolventes.

Obtener los ésteres y los azúcares de las resinas glicosídicas de *Ipomoea carnea* mediante su hidrólisis alcalina y ácida.

Identificar los azúcares y los ácidos grasos presentes en las resinas glicosídicas de *Ipomoea carnea*, mediante pruebas cualitativas y a través de la técnica de cromatografía de gases CG-MS, respectivamente.

Evaluar la toxicidad de los extractos contra *Artemia salina*, y determinar la Concentración letal media CL₅₀.

5. JUSTIFICACIÓN

A nivel de Latinoamérica, las investigaciones que tienen como base el aislamiento de sustancias químicas y sus efectos en algunos seres vivos, tales como bacterias, virus y pequeños mamíferos, no alcanzan a tener el impacto suficiente en relación con la gran cantidad de flora y fauna que se encuentra presente. En Colombia, son pocos los estudios químicos sobre las resinas glicosídicas que se encuentran presentes en especies de Convolvuláceas, a pesar de que hay reportes sobre el uso de estas plantas para el tratamiento de enfermedades, ocasionadas, bien sea, por un agente externo (picaduras de insectos, serpientes, agentes bacterianos etc) o por un mal funcionamiento de nuestro organismo (Cruz, S; Castañeda, J; Figueroa, G; Mendoza, A; Lorence, A; Pereda, R, 2012).

En cuanto al uso de las plantas que son empleadas en la parte agrícola, cabe resaltar que algunas especies de Convolvuláceas han mostrado un gran potencial para servir como cubiertas de cultivo, así como suelen ser empleadas de manera ornamental dentro de los hogares, por la forma y el colorido de su flor.

A pesar de ser una familia de carácter invasivo, se ha encontrado que los glucósidos de algunas Convolvuláceas como es el caso de la especie *Ipomoea alba* mejora el rendimiento y la producción de cultivos de papa, maní, frijol camote y trigo (Cruz, S; Castañeda, J; Figueroa, G; Mendoza, A; Lorence, A; Pereda, R, 2012).

Para nuestro país, muchas especies de Convolvuláceas son comúnmente conocidas como batatillas, que se encuentran ampliamente distribuidas y diversificadas dentro de nuestro territorio nacional, estimándose un total de 81 especies (Castañeda, Charry, & Miranda, 2013).

En el departamento del Huila, el género *Ipomoea*, según el herbario de la Universidad Nacional de Colombia se registran 6 especies, tales como *Ipomoea cholulensis* Kunth, *Ipomoea colombiana* O'Donell, *Ipomoea cordatotriloba* Dennst, *Ipomoea hederifolia* L, *Ipomoea indivisa* (Vell.) Hallier f, *Ipomoea squamosa* Choisy, dentro de las cuales la especie *Ipomoea colombiana* O'Donell es la única que se encuentra reportada como endémica en nuestra región del suroccidente colombiano.

En lo que concierne a la especie vegetal *Ipomoea carnea*, se ha identificado en diversos estudios su alto nivel tóxico en las partes aéreas, raíces y frutos, probados en ensayos con especies de mamíferos como ganado vacuno, entre las cuales hay registro en ovejas y cabras, también en ratas y de igual forma en peces, generando diversos trastornos como pérdida de peso, cambios de conducta, marcha descoordinada y la muerte, esto solo se ha podido identificar en especies químicas de carácter alcaloidal en las que se resalta swainsonina, 2-epi-lentiginosina, y las calysteginas B1, B2 y B3, desconociéndose de esta manera los efectos de las resinas glicosídicas (Haraguchi, M; Gorniak, S; Ikeda, K; Minami, Y; Kato, A; Watson, A; Nash, R; Molyneux, R; Asano, N., 2005).

A nivel etnobotánico, se ha reportado para esta especie, algunos usos para la diabetes, como agente antioxidante, anticancerosa y antimicrobiana. De igual forma que en el resto de *Ipomoeas* estas también juegan un papel importante en la agricultura como fungicida y control de plagas en los cultivos de arroz; a nivel industrial se ha usado para la fabricación de papel, textiles y biogás (Srivastava & Shukla, 2015).

La identificación de azúcares de las resinas de la especie *Ipomea carnea* permitirá ampliar el conocimiento sobre la química de las resinas glicosídicas en las Convolvuláceas, siendo este estudio realizado en esta planta por primera vez. Adicionalmente, la evaluación del efecto biocida de los extractos de *Ipomea Carnea* sobre el crustáceo *Artemia salina*, permitirá conocer el potencial agresivo que tiene este arbusto sobre otras especies de animales.

6. MARCO TEÓRICO

El departamento del Huila se encuentra localizado al suroccidente del país, con una superficie de 19900 Km², su extensión es atravesada por el gran valle del Magdalena entre las cordilleras Central y Oriental dentro de las cuales se encuentran importantes sitios geográficos, como el Nevado del Huila, Páramo de Sumapaz, Volcán del Puracé y el Estrecho del Magdalena. La variación del clima permite encontrar gran diversidad de suelos y ecosistemas adaptados para la fauna y flora de la región. (Gobernación del Huila, 2017)

Neiva, capital del departamento del Huila, se encuentra a una altura de 442 msnm, sobre una planicie de la margen oriental del río Magdalena y cuenta con una extensión de 1553 km², dentro de las cuales, 1507 km² son ocupados por la zona rural y 45,94 km² por la zona urbana. La ciudad cuenta principalmente con el Río Las Ceibas y el Río del Oro y su temperatura promedio es de 27.7 °C. (Alcaldía de Neiva, 2017)

Al sur del municipio de Neiva hacia la zona rural, se encuentra la vereda el Triunfo, limitando al occidente por el sector de Agua Blanca y al norte con el sector de Normandía, dentro del corregimiento El Caguán, aledaño a la zona urbana (Figueroa, 2015). La vereda cuenta con la fuente hidrográfica del río Arenoso que vierte a las quebradas el Limón y el Neme, presentando un clima cálido y seco con una temperatura mínima de 19 °C, cabe resaltar que dentro de esta vereda se encuentran asentamientos indígenas (Ríos, 2008).

6.1. Aspectos generales de la especie vegetal *Ipomea carnea*

De acuerdo al Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (Sistema de Información sobre Biodiversidad para Colombia, 2015) nuestro país cuenta con un total de 62.829 de especies entre fauna y flora registrados hasta el momento, dentro de las cuales, 22. 840 especies corresponden a plantas con presencia de flores. Se estima que 1500 especies pertenecen a la familia Convolvulaceae y 39 al género *Ipomoea*.

En su mayoría las plantas de la familia Convolvulaceae, se caracterizan por la presencia de látex, que ha sido empleado como purgante. Adicionalmente, las semillas

de algunas convolvuláceas han sido usadas por sus propiedades alucinógenas en rituales (Castañeda, Charry, & Miranda, 2013).

6.1.1 Descripción botánica de la especie vegetal *Ipomoea carnea*

La especie vegetal *Ipomoea carnea* es un arbusto que crece en diversos tipos de climas. Por lo general, suele encontrarse en zonas de bosque seco tropical, ya que se encuentran las condiciones necesarias para su crecimiento, el cual es de 1.5 a 6 m; presenta un tallo grueso de forma cilíndrica, erecto y leñoso, con coloración verde.

Sus hojas son de tamaño mediano, con coloración verde mate en el haz o cara adaxial (parte superior de la hoja) y más pálida en el envés o cara abaxial (parte inferior de la hoja). La disposición suele ser simple y peciolada, siendo este último de forma cilíndrica alcanzando a medir de 4 a 7,5 cm de longitud y de 3 a 2,5 mm de diámetro.

En esta especie, las flores son axiales, el pedicelo es de color verde y cilíndrico, cuya medida oscila entre los 1,5 a 2,0 cm de longitud y 0,15 a 0,20 cm de diámetro, la corola es en forma de campana, con pétalos de coloración violeta pálido de 5,2 a 6,0 cm de largo y 1,6 a 1,8 cm de ancho. (Srivastava & Shukla, 2015)

6.2 Composición química de las especies vegetales tóxicas

Las plantas se caracterizan por sintetizar una gran diversidad de principios activos, unos benéficos y otros de carácter tóxico, ya sea de índole orgánico o inorgánico, estos últimos comúnmente los usan como mecanismo de defensa contra posibles depredadores, causando reacciones entre las que se destacan irritación, comezón, vómito, diarrea y en algunos casos la muerte.

Los principios tóxicos de carácter inorgánico se acumulan en diferentes órganos de la planta, como raíces, tallos, hojas flores y frutos, en forma de sales, tales como: el oxalato de calcio y algunos metales pesados como el selenio, zinc y cobre. Los Principios tóxicos de carácter orgánico, se encuentran asociados a los alcaloides, proteínas, heterósidos y resinas glicosídicas (González & Recalde, 2006)

6.2.1 Resinas Glicosídicas

Las resinas glicosídicas son mezclas de glicolípidos de alto peso molecular, cuya estructura la integran dos porciones: una hidrofílica, lo que les permite tener afinidad

con disolventes polares como el metanol y el agua y una porción hidrofóbica, que le permite a los glicolípidos su solubilidad en disolventes poco polares, como hexano, éter y cloroformo.

A nivel estructural, la porción hidrofílica la compone un oligómero de hasta 7 unidades de monosacáridos denominado núcleo oligosacárido, el cual se encuentra esterificado por ácidos grasos que componen la parte hidrofóbica. Adicionalmente, se encuentra un ácido graso de 14 a 16 átomos de carbonos unido al núcleo de azúcares mediante un enlace éster formando una macrolactona como se muestra en la figura No. 1 (Castañeda, Charry, & Miranda, 2013).

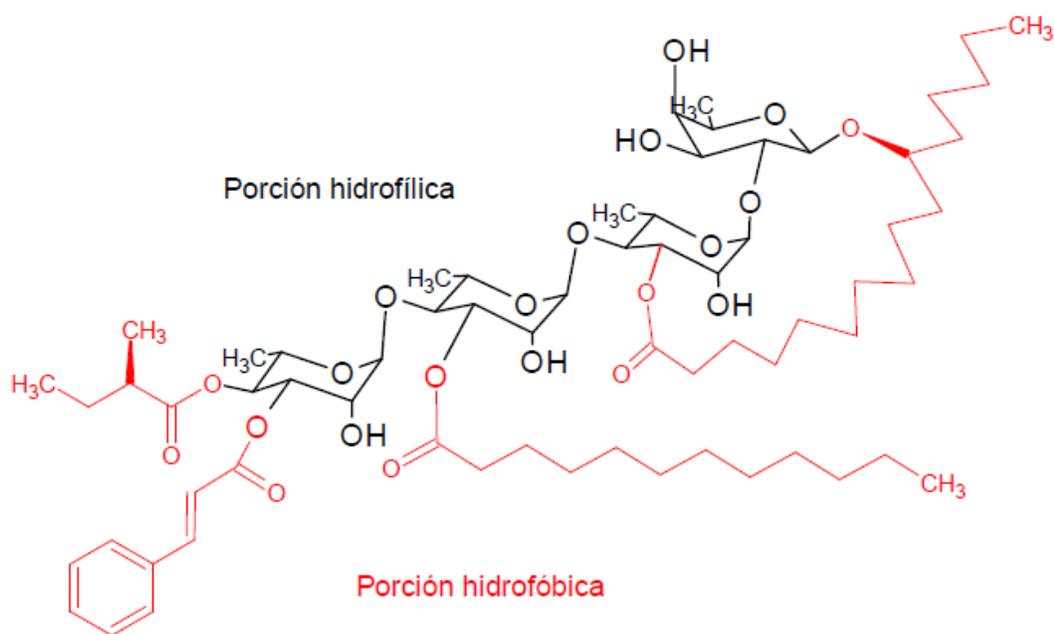


Figura No. 1. “Estructura general de una resina glicosídica” realizada en ACD, por Castañeda, J. Charry, P. y Miranda, R. 2013. Empleo de métodos analíticos modernos para el aislamiento y la identificación de resinas glicosídicas de la familia convolvulaceae. Recuperado de: http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/d299_Art%202.%20Galera.pdf

6.2.2. Identificación de Resinas Glicosídicas

Debido a su compleja estructura, las resinas glicosídicas resultan ser moléculas muy difíciles de aislar o separar, debido a que se encuentran, en la mayoría de los casos,

como mezclas con el mismo núcleo oligosacárido, pero con distintos sustituyentes como el éster.

Para su caracterización, se han determinado dos caminos. El primero recurre al uso de reacciones que desintegran los glicolípidos, como la saponificación que favorece la ruptura de los ésteres que se encuentran enlazados a los oligosacáridos y los cuales son fáciles de analizar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Otra técnica de degradación es la hidrólisis ácida, que permite no sólo la obtención de los ácidos que corresponden a los ésteres, sino también el rompimiento de cada una de las unidades de azúcar, pudiéndose identificar por pruebas cualitativas y/o a través de las técnicas de cromatografía en capa fina y cromatografía de gases acoplado a masas.

Por su parte el segundo camino, se basa en el empleo de técnicas cromatográficas y espectroscópicas (Resonancia magnética nuclear RMN ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HSQC y HMBC) y espectrométricas de alta resolución, como las técnicas de ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) y la ionización por electrospray (ESIMS) para la purificación e identificación de las resinas glicosídicas intactas (Castañeda, Charry, & Miranda, 2013).

En primera lugar, la técnica de ionización por bombardeo de átomos rápidos usa matrices líquidas las cuales facilitan la producción de iones mediante dos tipos átomos rápidos, el Argón o el Xenón que generan de 3 a 10 keV como también Cesio el cual está arriba de los 35 keV, estos entran en contacto con el analito por medio de una pistola de iones, haciendo que esta absorba energía de las partículas con las que impactan produciendo iones secundarios los cuales son expulsados de la superficie de la muestra por aceleración para ser enfocados por el analizador.

En segundo lugar este método de electrospray, el cual usa la presión atmosférica, en donde la muestra es diluida en medio ácido o básico, esta es rociada en la punta de un emisor o capilar al que se le suministra de 3 a 4 kV, la solución empieza a salir del emisor al ir incrementando su carga tomando diversas formas que van desde cónica, cilíndrica hasta una línea fina donde la muestra se inestabiliza dispersándose en una niebla cuyas gotas están altamente cargadas, esto se repite varias veces hasta obtener

gotas y moléculas cada vez más pequeñas con la particularidad de ser protonadas, estas son dirigidas a un espectrómetro de masas para su respectivo análisis (Villa, 2003).

De igual forma para la purificación de las resinas glicosídicas intactas, se emplea la cromatografía de columna y la cromatografía líquida de alta resolución. Mediante la cromatografía en columna, el extracto rico en estos componentes es purificado por la elución de una fase móvil, iniciándose con hexano como disolvente, debido a su baja polaridad, este disolvente permite el arrastre de ácidos grasos, o la separación de glicolípidos con sustituyentes éster de cadena larga. Sucesivamente, se emplea el cloroformo o diclorometano y finalmente, el metanol, que permite extraer sustancias polares como alcoholes y azúcares o resinas glicosídicas con pocos sustituyentes acilantes (Rojas, 2013). Finalmente, las mezclas complejas de glicolípidos son resueltas por el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) (Castañeda, Charry, & Miranda, 2013)

6.3 Obtención de azúcares y ésteres

Para la obtención de los azúcares individuales que constituyen los oligosacáridos o polisacáridos, se usan tres procesos distintos, en primer lugar, está el método físico, el cual permite obtener los azúcares del material vegetal particulado a través de la técnica de extracción.

El segundo método es el uso de sustancias químicas, en este se emplea una solución ácida y calor para la liberación de los azúcares individuales. Por último, está el biológico el cual usa bacterias y hongos para extraer azúcares del material vegetal por medio de la fermentación. Como los glucósidos que metabolizan las convolvuláceas se encuentran esterificados, se decidió en esta investigación emplear el método químico para la degradación de las resinas glicosídicas en sus azúcares y ésteres individuales a través, no solo de la hidrólisis ácida sino también con base. El tratamiento con base sólo permite la liberación de los esterios en forma de ácidos orgánicos, dejando al núcleo de azúcares intacto, permitiendo así, determinar la identidad química de los esterios

mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, CG-MS (Rojas, 2013).

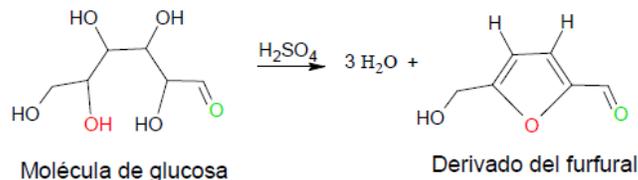
6.3.1 Identificación de azúcares

Los azúcares constituyen la mayor parte de la materia orgánica en la naturaleza, actuando como productor de energía en los seres vivos y como estructura ya sea a nivel celular como en el caso de la capa lipídica, como componente en los ácidos nucleicos y en estructuras de protección externa. Estos se clasifican de acuerdo con: el número de átomos de carbono, número de unidades de azúcar, posición del grupo carbonilo, como oxiazúcares o desoxiazúcares. Para la identificación de azúcares, se emplean ensayos colorimétricos, como son: Benedict, Barfoed, Lugol, Seliwanoff, bial, Molish, Keller - Killani y antrona. Para esta investigación se usaron tres pruebas de identificación de azúcares, la prueba de Molish, Keller - Killani y antrona, de acuerdo con las condiciones existentes en nuestro laboratorio (Nelson, Cox, & Lehninger, 2006).

6.3.1.1. Prueba de Molish.

En este tipo de prueba el ácido sulfúrico hidroliza los glucósidos, originando los monosacáridos, los cuales después de ser deshidratados forman furfural, que al combinarse con α -naftol originan un complejo de color púrpura dando como positivo la presencia de azúcares (Verde, García, & Rivas, 2016). La reacción química correspondiente a la prueba de Molish se muestra en la figura No. 2.

1. Ruptura catalizada por el ácido sulfúrico. Se liberan 3 moléculas de agua.



2. Reacción del derivado del furfural con el α -naftol

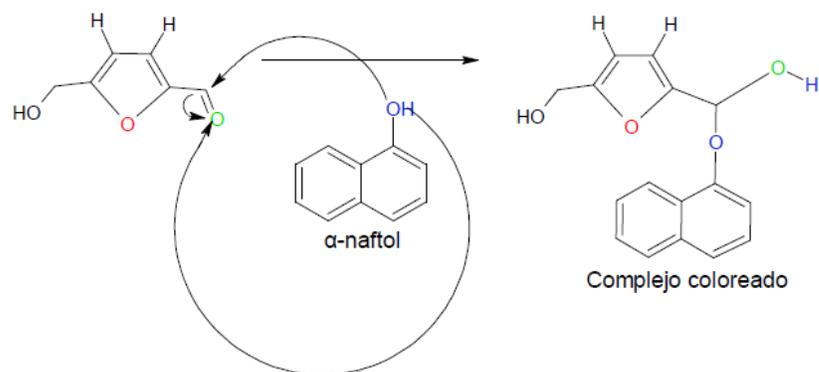
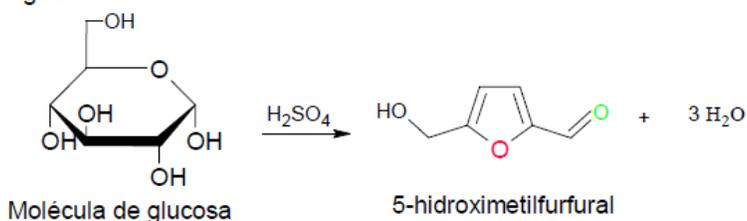


Figura No. 2. “Reacción Química obtenida para la prueba de Molish” en ACD labs, por Delgado, B. 2008. Reacción de los carbohidratos. Recuperado de: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/45190/mod_resource/content/0/REACCIONES_DE_LOS_CARBOHIDRATOS-2008.pdf

6.3.1.2. Prueba de Antrona.

En esta prueba de identificación de carbohidratos las sustancias sometidas reaccionan con el reactivo de Antrona y ácido sulfúrico concentrado, esto origina un complejo verde azulado indicando como positivo la presencia de azúcares (Verde, 2016). La reacción química correspondiente a la prueba de Antrona se muestra en la figura No. 3.

1. Ruptura catalizada por el ácido sulfúrico. Se liberan 3 moléculas de agua.



2. Reacción del derivado 5-hidroximetilfurfural con Antrona.

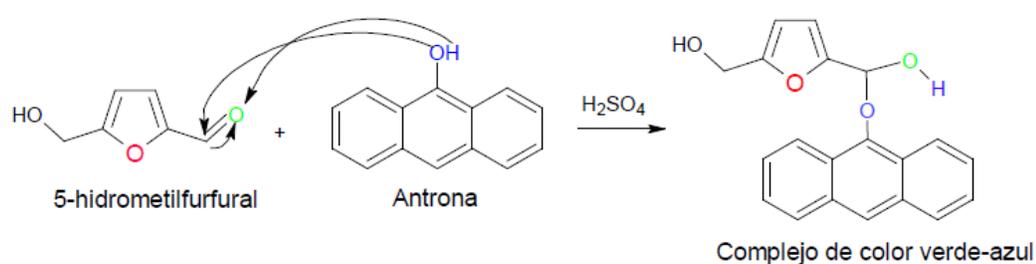
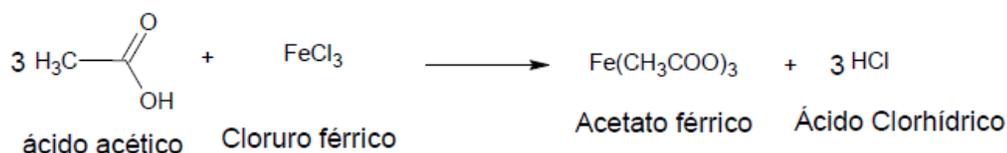


Figura No. 3. “Reacción Química obtenida para la prueba de Antrona” en ACD labs, por Briceño, A. 2017. La reacción de la Antrona en la determinación de los hidratos de carbono. Recuperado de: <http://adbsunidoc.blogspot.com/2017/02/>

6.3.1.3. Prueba de Keller-Killani.

En este tipo de método permite identificar glucósidos con desoxiazúcares. Las sustancias sometidas reaccionan en primer lugar con el ácido acético glacial y con el cloruro férrico el cual actúa como revelador para su posterior interacción con ácido sulfúrico concentrado, esto hace que se generen dos fases separadas por una interface de color café- rojizo, y una fase superior de Verde (Verde, García, & Rivas, 2016). La reacción química correspondiente a la prueba de Keller-Killani se muestra en la figura No. 4.

1. Formación del reactivo de Keller-Killani.



2. Formación del complejo con la Desoxiazúcar.

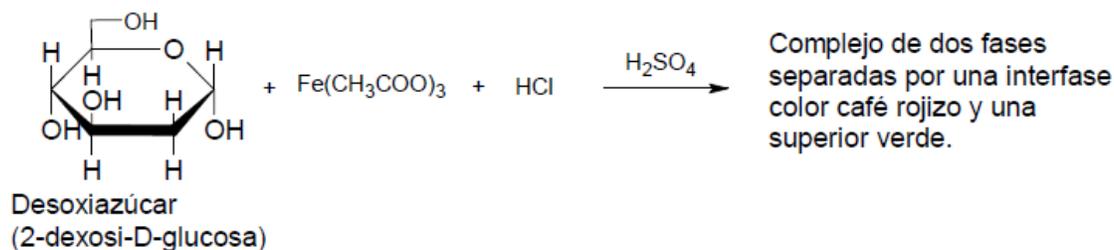


Figura No. 4. "Reacción Química obtenida para la prueba de Keller-Killani" en ACD labs, por Bhat, S. Nagsampagi, B.y Sivakumar, M. 2006. Chemistry of natural products. Recuperado de: https://books.google.com.co/books?id=C3la6a_gnKUC&pg=PA104&dq=prueba+de+Keller-Kiliani&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj43P2A1bDdAhULj1kKHel4AdMQ6AEILzAB#v=onepage&q=prueba%20de%20Keller-Kiliani&f=false

6.4. Método cualitativo: Cromatografía de gases-masas (CG-MS)

Como se ha mencionado anteriormente, existen técnicas para liberar los ácidos grasos que componen a las resinas glicosídicas, entre estas se encuentran: las técnicas degradativas como la hidrolisis en medio ácido y básico. Los ácidos son identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).

El equipo de CG-MS (Figura No. 5) se compone de las siguientes partes principales: una fuente de gas, un sistema de inyección, un horno, una columna cromatográfica, el equipo de acople de detección de masas y el sistema de registro de los cromatogramas. (Olgún & Magadán, 2004).



Figura No. 5. Equipo Cromatografo de gases acoplada a masas CG-MS. En "GC/MS Perkin Elmer Autosystem XL", por Martín y Pelillo, 2012, <https://www.galileoequipos.com/es/>. Copyright [2012]. Uso autorizado.

El funcionamiento de este equipo se basa principalmente en la volatilización de la muestra, la cual es inyectada a través de la columna, todo por acción del movimiento de gases inertes como Helio, Argón o Nitrógeno que actúan como la fase móvil. Luego, ocurre la separación de la muestra en la columna cromatográfica en partes iguales, ubicada dentro del horno de temperatura programable siendo este la fase estacionaria, teniendo en cuenta los límites de temperatura. Finalmente, se lleva a cabo la detección de los componentes a través del procesador-amplificador y se obtiene el registro cromatográfico, lo anterior se muestra en la figura No. 6. (Olguín & Magadán, 2004).

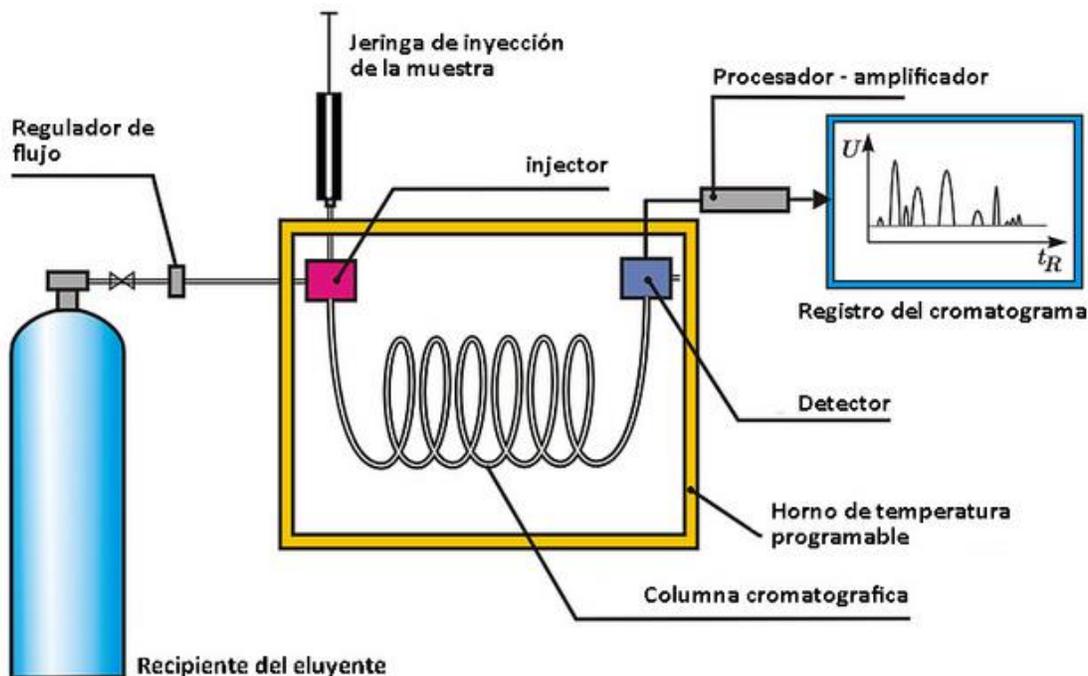


Figura No. 6. Diagrama del funcionamiento del equipo CG-MS. En "Cromatografo de gases", por Bretó, 2011, <https://www.flickr.com/>. Copyright [2011] por Dubaj. Uso autorizado.

6.5. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD

Los estudios en fauna y flora son parte fundamental para la determinación de diversos factores como la inhibición del crecimiento en plantas, células cancerígenas y colonias de microorganismos, como también los efectos a los que son expuestos dichos organismos en un periodo determinado por sustancias de carácter exógeno.

Si bien no todos los seres vivos reaccionan de manera similar a todas las sustancias, los datos que se toman en estos ensayos cobran una especial significancia, ya que permiten identificar: a) productos químicos altamente nocivos, b) la concentración mínima del agente químico para inhibir el crecimiento de la mitad de la población CI_{50} o la concentración letal para matar la mitad de la población CL_{50} , c) determinar la relación dosis – respuesta, d) establecer criterios de contingencia hacia las células y/u organismos evaluados y obtener información en busca de mejorar dichas pruebas.

Aunque esta clase de estudios presenten esas finalidades, estos se clasifican según el objetivo que se busque, cumpliendo primordialmente una serie de características tales como presentar un amplio espectro toxico, facilidad de obtención en forma pura, alta solubilidad en agua, persistencia y estabilidad en la solución, por último, facilidad de acumulación, esta clasificación se puede abordar desde dos puntos de vista, desde su respuesta y desde su técnica.

Para la clasificación de acuerdo a la respuesta, podemos encontrar los ensayos de toxicidad aguda (bioensayo de esta investigación), que se caracteriza por que los organismos se exponen a la toxina en periodos cortos no mayores de 96 horas, en contraste, con los ensayos de toxicidad subaguda en los cuales los organismos se someten hasta un periodo de cuatro semanas a la toxina. En los ensayos de toxicidad crónica, se ocupa al menos una generación de la especie, permitiendo evaluar la exposición a largo plazo y los efectos sublévales, por último, está el subcrónico, el cual cubre hasta el 10% del tiempo de generación de un organismo permitiendo evaluar periodos de exposición y no exposición a la toxina.

Existen cinco técnicas distintas para clasificar un ensayo. En primer lugar, se encuentran los ensayos estáticos, en los cuales los organismos están en contacto con la solución que se va a utilizar. Los ensayos semiestáticos se caracterizan por remover periódicamente el medio toxico; mientras en el ensayo de flujo continuo se remueve el medio de forma continua. El ensayo de reproducción cubre al menos tres generaciones y permite evaluar el comportamiento reproductivo como consecuencia a la exposición de la toxina. Finalmente, se encuentra el ensayo de recuperación, en los cuales se usan periodos de sometimiento al medio toxico (Corredor & Cortéz, 2011).

6.5.1. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀)

Para la determinación de la CL₅₀ se es necesario en primera medida, determinar una serie de cálculos, como la concentración de las sustancias en porcentaje; el logaritmo en base diez de las concentraciones; el número de organismos en cada concentración; el porcentaje de mortalidad y el probit calculado; el cual usa los datos de los cálculos anteriormente mencionados. El probit empírico está contenido en tablas. La

finalidad de estos cálculos es establecer las gráficas de dispersión, a las cuales se les traza una línea media en el punto cinco y así hallar las pendientes, que permiten determinar la CL_{50} mediante la aplicación del antilogaritmo (Corredor & Cortéz, 2011).

6.5.2. Especie: Descripción Artemia salina

Este crustáceo se puede encontrar en lagos salados del planeta, en los cuales se desarrolla todo su ciclo de vida. Los huevos de esta especie eclosionan un día después de estar en contacto con el agua, en su primer estadio alcanzan una longitud de 500 micras, de ahí en adelante, este organismo sufre diversas transformaciones (alrededor de 15), donde aparecen apéndices lobulares y ojos laterales complejos (Leu, 2001).

7. METODOLOGÍA

7.1 Enfoque Metodológico

Para el transcurso de esta investigación se ha escogido el enfoque cualitativo el cual nos permite comprender y profundizar los fenómenos, sin desconocer la relación entre conceptos y variables, teniendo en cuenta que la investigación sobre las resinas glicosídicas a nivel mundial y nacional parecen ser muy pocas, lo que hace que este enfoque sea el más indicado (Hernández, Fernández, & Baptista, 2010).

7.2 Colecta y Secado del Material Vegetal

La colecta de partes aéreas se realizó en la vereda El Triunfo, localizada al suroriente de la ciudad de Neiva (Huila) en el pie de monte del cerro de Neiva, limitando al norte con la vereda Normandía, al sur con El Dinde, al occidente con Agua Blanca y al oriente con Chapuro (ver figura No.7). Para este proceso se empleó una bolsa de polietileno grande, guantes, tijeras de podado, un bisturí y una navaja. Las hojas se colectaron en estado joven y libre de hongos mediante inspección visual. Un ejemplar se envió al herbario de la universidad Surcolombiana para su respectiva clasificación botánica.

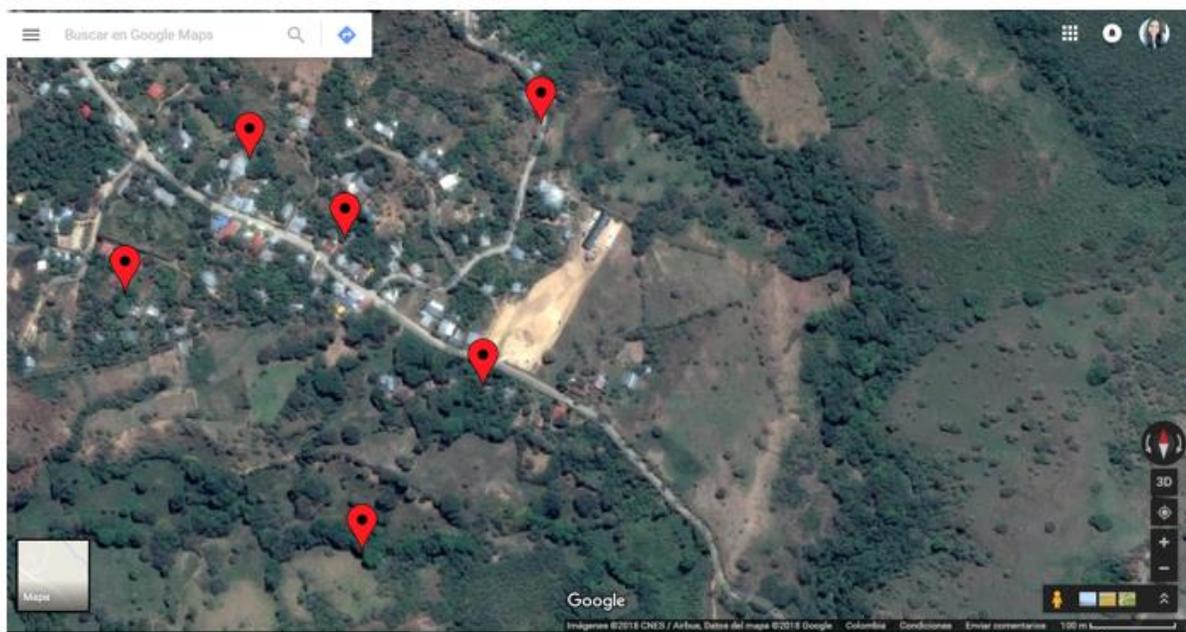


Figura No. 7. Mapa satelital de los puntos de muestreo en la vereda El Triunfo. Google Maps. (2018). [Mapa de El Triunfo, Neiva]. Recuperado el 12 de junio de 2018; de <https://www.google.com.co/maps/place/El+Triunfo,+Neiva,+Huila/@2.8623499,-75.2065199,1557m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x8e3b71b6ca816af5:0x85da761e47e0add6!8m2!3d2.86153!4d-75.20462>.

El material vegetal se secó de manera natural por 3 días (exposición a la sombra), después se realizó un secado artificial en un horno a 40 °C durante un día para los tallos

7.3 Obtención de los Extractos

El material vegetal seco se sometió a su pulverización con la ayuda de un molino, posteriormente, se llevó a cabo la extracción por maceración con disolventes tales como: hexano, cloroformo y metanol. El procedimiento se muestra en la Figura No. 8.

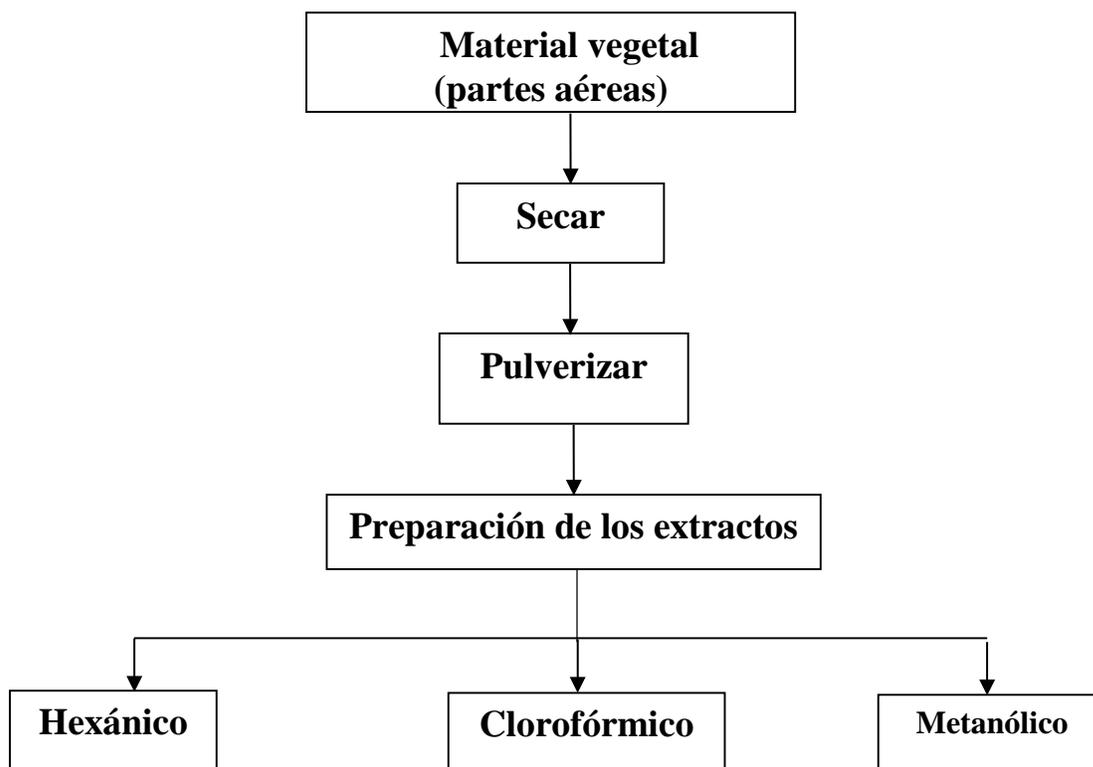


Figura No. 8. Proceso general de obtención de extractos.

Las resinas glicosídicas se identificaron de los extractos, mediante cromatografía en capa fina empleándose como revelador sulfato sérico en ácido sulfúrico, en donde la formación de un color marrón fue indicativo de la presencia de azúcares en las muestras.

Adicionalmente, los desoxiazúcares se reconocieron mediante tres reacciones:

7.3.1 Prueba de Keller- Killiani

Una pequeña cantidad de cada extracto se disolvió en 3 mL de ácido acético glacial junto con dos gotas de cloruro férrico al 5%, cuidadosamente, se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La identificación de azúcares se realizó por la coloración café rojizo en la interfase y una coloración verde azulosa en la capa superior.

7.3.2 Prueba de Molish

Se agregaron dos gotas de α -naftol a 2.0 mg de cada extracto, posteriormente, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado hasta la formación de dos capas. El cambio de coloración al purpura indicó positiva esta prueba para glicósidos.

7.3.3 Prueba de la Antrona

A 2 mL de la solución de Antrona se le adicionaron 2.0 mg de los extractos y se observó el cambio de coloración a azul-verdoso, lo que indicaría positivo la prueba para hidratos de carbono.

7.4 Hidrólisis Alcalina de los Extractos

401 mg de cada extracto se disolvieron en 50 mL de una solución de NaOH al 5%. Posteriormente, la solución se sometió a reflujo durante un tiempo de 3h, una vez terminada la reacción la solución se acidificó a pH 5.0 con HCl al 5%. Posteriormente, el crudo se disolvió en 40 mL de éter etílico para la extracción de los extractos. Posteriormente, se empleó cloroformo (40 mL x 2) para completar la extracción. Las fases orgánicas se agruparon para la identificación de los ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

7.5 Hidrólisis Ácida de los Extractos

400 mg de cada extracto se disolvieron en una solución de HCl al 5N. Posteriormente, la solución se sometió a reflujo durante un periodo de 3h. Una vez terminada la reacción la solución se diluyó en 50 mL de agua. Posteriormente, la mezcla se extrajo con éter etílico (30 mL x 2) y cloroformo (30 mL x 2), posteriormente las fases orgánicas se agruparon para la identificación de los ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

7.6 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas para la Identificación de los Ácidos Orgánicos

Para el análisis de los ácidos grasos se utilizó un equipo GC-MS (SHIDMAZU - QP2010 ultra), ubicado en el laboratorio de análisis instrumental de la universidad del Quindío. Se emplearon dos métodos cromatográficos que difieren en las condiciones cromatográficas como flujo de la columna y la rampa de calentamiento. El empleo de esto dos métodos se hicieron con el objetivo de confirmar la identidad química de los ácidos mediante el detector de masas. Los dos métodos de corrida cromatográfica fueron nombrados como T. PATULA y ALCANOS y las condiciones de cada uno se muestran como sigue:

7.6.1 Método T. Pátula:

Columna: 5% difenil-polisiloxano,

Modo de Inyección: Split

°T Inicial: 40 °C, °T Final: 310 °C, °T interface: 300 °C, °T detector: 250 °C

Velocidad de calentamiento: 10 °C/min

Flujo columna: 1.0 mL/min

Velocidad Lineal: 36.1 cm/s

7.6.2 Método Alcanos:

Columna: 5% difenil-polisiloxano,

°T Inicial: 40 °C, °T Final: 310 °C, °T interface: 290 °C, °T detector: 230 °C

Velocidad de calentamiento: 20 °C/min

Flujo columna: 1.0 mL/min

Velocidad Lineal: 36 cm/s

7.7 Protocolo Experimental para la Preparación de Bioensayo de Toxicidad con *Artemia salina*

Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en una solución de sal marina (3%) a temperatura ambiente durante 48 h, bajo aireación e iluminación permanente. Los extractos se solubilizaron en Tween 80 (5%) a concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL. Los ensayos se realizaron en cajas de Petri previamente esterilizadas.

Posteriormente, en cada caja se pusieron 10 organismos de *Artemia salina* en contacto con la solución de extracto. El monitoreo para la determinación del número de organismos vivos y muertos se realizó a través del estereoscopio por 4, 6, 12 y 24 horas. Se empleó como control una solución de sal marina y otra con tween 80 (Finney, 1978). El cálculo de la Concentración letal media o CL_{50} , se determinó a través del análisis Probit con el paquete estadístico *Statgraphics centurion XVI* versión 16.2.04.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1. Secado y Pulverizado de la Especie Vegetal *Ipomoea carnea*

Jacq

Para la colecta se tuvo en cuenta la calidad de las hojas y los tallos de la planta. Hojas jóvenes y con ausencia de hongos. Los procesos de secado y pulverización permitieron obtener 847 g de material vegetal.

8.2 Preparación de los Extractos

La extracción con hexano, cloroformo y metanol permitió la obtención de 1.8 g, 2.78 g y 4.23 g, de cada pasta, respectivamente.

En primera medida la extracción con hexano permite el arrastre de compuestos poco polares, tales como ácidos grasos mono y dihidroxilados y algunas resinas glicosídicas altamente sustituidas por grupos éster, si se encuentran presentes en los extractos; mientras que la maceración con cloroformo como se muestra en la figura No. 9, permite la remoción de compuestos de carácter medianamente polares, tales como oligosacáridos con cadenas carbonadas más cortas. Entre tanto la extracción con metanol permite el aislamiento de sustancias más polares tales como resinas glicosídicas poco sustituidas con un mayor número de azúcares.

Existe una gran cantidad de glucósidos que han sido aislados con disolventes de baja polaridad (jalapinas), sin embargo, glucósidos de alta polaridad (convolvulinas) aún permanecen siendo poco conocidos, por la dificultad que representan para ser purificadas por técnicas cromatográficas de HPLC. La probabilidad del descubrimiento de glucósidos nuevos del extracto metanólico es prepondera una vez pueda resolverse el gran inconveniente que presenta la purificación de este tipo de compuestos, por cromatografía en fase reversa (Castañeda & Pereda, 2011).

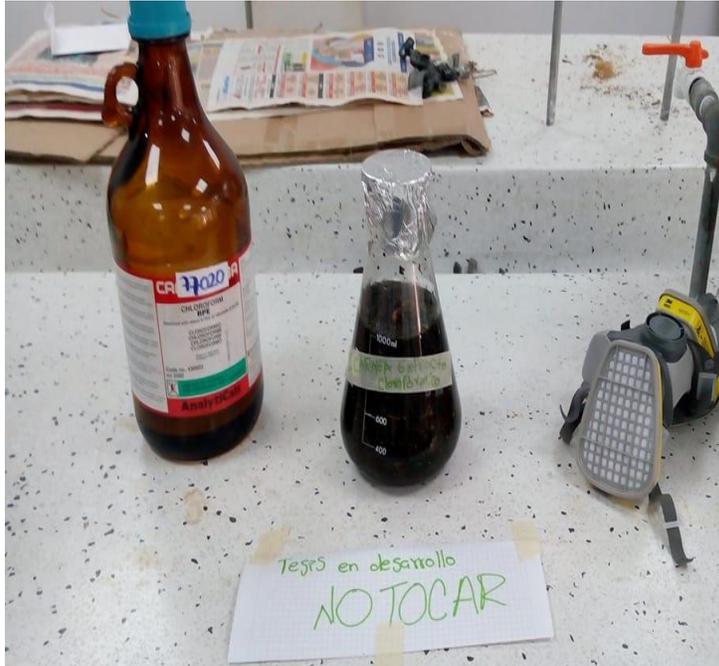


Figura No. 9. Proceso de extracción mediante maceración con disolventes.

El disolvente en cada extracción fue removido mediante rotaevaporación (figura No. 10), previa filtración a gravedad (figura No. 11) permitiendo la obtención de los extractos en forma de sólidos de color oscuro.



Figura No. 10. Montaje del proceso de rotaevaporación



Figura No. 11. Proceso de filtrado del macerado de la planta.

8.3 Pruebas de Reconocimiento de Azúcares

Para la identificación de glucósidos en los extractos, se realizaron diversas pruebas cualitativas que son adecuadas para este tipo de compuestos, tales como Molish, Antrona y Keller-killiani. Los resultados obtenidos para cada una de estas pruebas sobre los extractos metanólico y clorofórmico en glucósidos se muestran en la Tabla No. 3.

Tabla No. 3. Resultados obtenidos de las pruebas de identificación de azúcares

Prueba	Extracto metanólico		Extracto clorofórmico	
	Positivo para glucósidos	Negativo para glucósidos	Positivo para glucósidos	Negativo para glucósidos
Molish	X		X	
Antrona		X		X
Keller-Killiani	X		X	

De acuerdo con los resultados de las pruebas de Molish y Keller-Killiani para azúcares, se determinó que los extractos clorofórmico y metanólico identificaron la presencia de este tipo de compuestos por la formación de un color púrpura, como indicativo de la presencia de glucósidos. La coloración positiva para el extracto

clorofórmico se muestra en la figura No. 12 y para el extracto metanólico en la Figura No. 13.



Figura No. 12. Prueba de Molish positiva para el extracto clorofórmico.

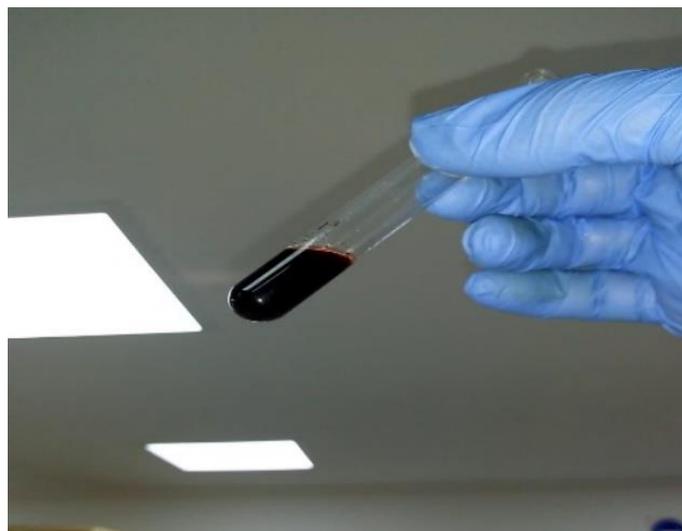


Figura No. 13. Prueba de Molish positiva para el extracto metanólico.

En la prueba de Molish, el ácido sulfúrico en contacto con el extracto, hidroliza los glucósidos, originando los monosacáridos, los cuales después de ser deshidratados

forman furfural, que al combinarse con α -naftol origina un complejo de color púrpura, como indicativo de la presencia de glucósidos tal como se muestra en la Figura No. 2.

Para la prueba de Keller-Killiani se logró determinar la presencia de glucósidos para los extractos metanólico y clorofórmico como se muestra en la Tabla No. 3, debido a la formación inmediata de dos fases separadas, en la parte superior se presenta una coloración verde y en la inferior una interface de color café- rojizo. Esta coloración positiva de la prueba de Keller-Killiani sobre el extracto clorofórmico se muestra en la figura No. 14 y sobre el extracto metanólico en la figura No. 15.

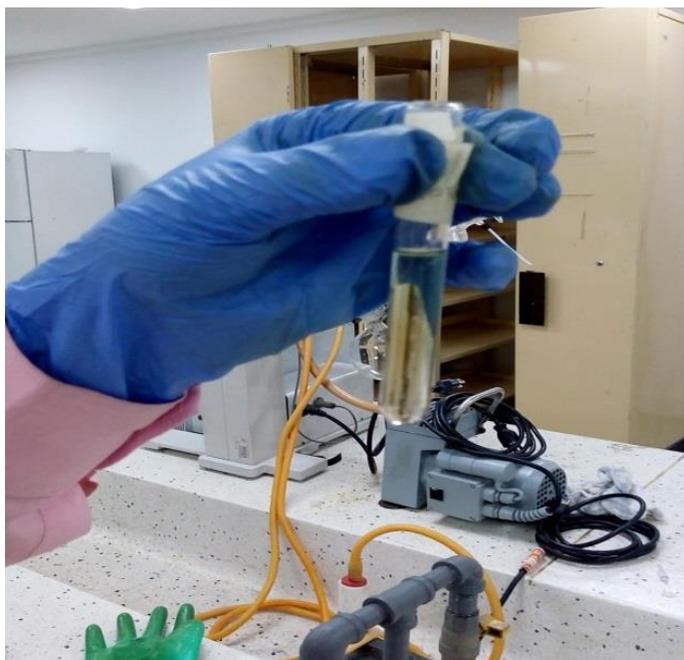


Figura No. 14. Prueba de Keller-Killiani positiva para el extracto clorofórmico.



Figura No. 15. Prueba de Keller-Killiani positiva para el extracto metanólico.

La reacción con Antrona es una prueba general para hidratos de carbono la cual debe formar un complejo verde azulado como indicativo de la prueba. De acuerdo a la Tabla No 3, para los extractos metanólico y clorofórmico la prueba dio negativa, pues no se evidenció de manera clara el cambio en la coloración aun después de haberlos sometido a calentamiento, indicando la ausencia de oxiazúcares en las resinas glicosídicas de los extractos. El resultado de la coloración negativa de la prueba de Antrona sobre extracto clorofórmico se muestra en la Figura No. 16 y para el extracto metanólico en la Figura No. 17.



Figura No. 16. Prueba de la Antrona negativa para el extracto clorofórmico

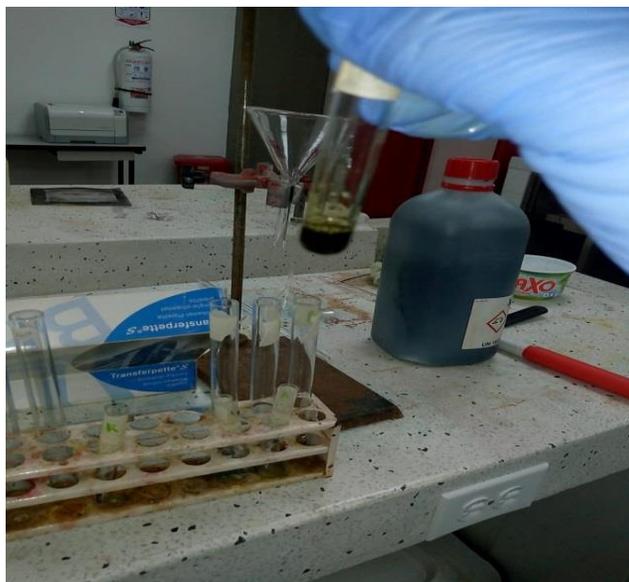


Figura No. 17. Prueba de la Antrona negativa para el extracto metanólico.

8.4. Hidrólisis Alcalina y Acida de los Extractos de *Ipomoea carnea* Jacq

La hidrólisis alcalina de los extractos metanólico y clorofórmico, se realizó con el objetivo de liberar los ácidos grasos que se encuentra esterificando los azucres de las resinas glucosídicas de *Ipomoea carnea* Jacq.

Mediante la hidrólisis acida de los extractos metanólico y clorofórmico, permite la liberación de los ácidos grasos que se encuentran acilando los glicolípidos, así como la aglicona que se encuentra formando la macrolactona con el núcleo oligosacárido.

Los ácidos grasos se identificaron mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

8.5 Identificación de los Ácidos Grasos Mediante CG-MS

Para este tipo de análisis se emplearon dos métodos por cromatografía de gases, los cuales difirieron en las condiciones cromatográficas de estudio como: velocidad lineal del gas de arrastre, rampa de calentamiento (T Pátula y Alcanos).

Estas condiciones arrojaron una serie de cromatogramas, los cuales mostraron la cantidad de picos correspondientes a los productos volátiles de la reacción de hidrólisis. Por ejemplo, para el producto de la hidrólisis ácida del extracto clorofórmico se lograron identificar 55 picos evidenciados en la figura No. 18.

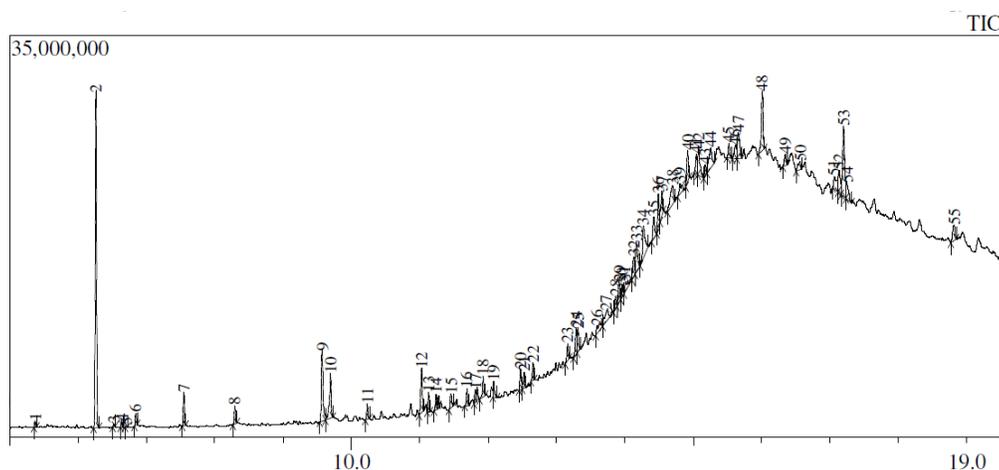


Figura No. 18. Cromatograma del producto de hidrólisis acida del extracto clorofórmico.

La técnica de espectrometría de masas permitió identificar que, de los 55 picos registrados, 4 de ellos correspondieron a ácidos orgánicos los cuales fueron: ácidos octanoico, decanoico, giberelínico y cinámico (3-fenil-2-propenoico) mostrados en la Tabla No. 4, el restante corresponden a alcoholes, amidas, alcanos de cadena sencilla y cíclica, alquenos, aldehídos y aldehídos aromáticos.

Tabla No. 4. Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula

Hidrolisis ácida extracto clorofórmico de <i>Ipomoea carnea Jacq</i>			
Compuesto	Tiempo de retención	Pico	m/z
Ácido octanoico	3.8	6	144
Ácido decanoico	6.2	8	172
Ácido giberelínico	17.0	54	346
Ácido 3-fenil-2-propenoico	3.8	4	148

A manera de ejemplo se muestra en la figura No. 19 el espectro de masas del ácido octanoico. El espectro muestra el pico del ion molecular $[M^+]$ con un valor m/z de 143 que es correspondiente a la formula molecular $C_8H_{16}O_2$. Adicionalmente, se observan picos de fragmentación características a las rupturas de la molécula del ácido octanoico como 115, 129, 73 y 60.

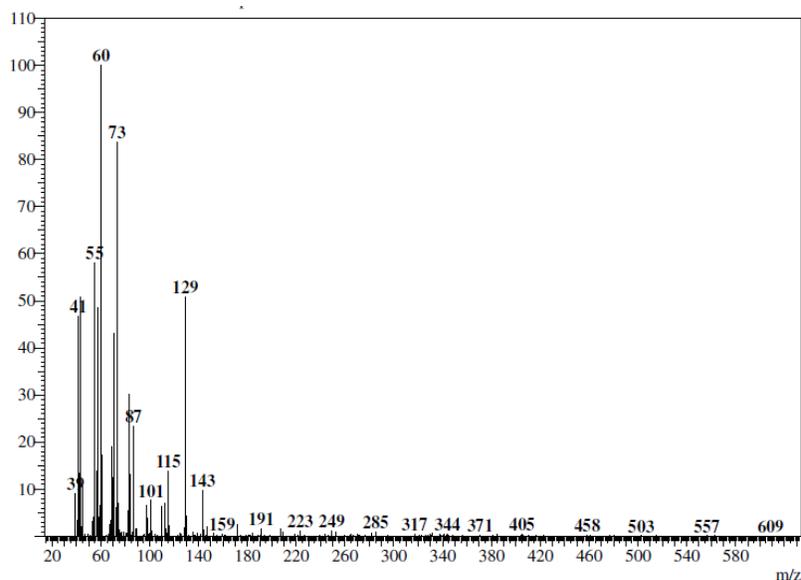


Figura No. 19. Espectro de masas del ácido octanoico.

Para el producto de la hidrólisis básica del extracto clorofórmico se lograron identificar 30 picos evidenciados en la figura No. 20.

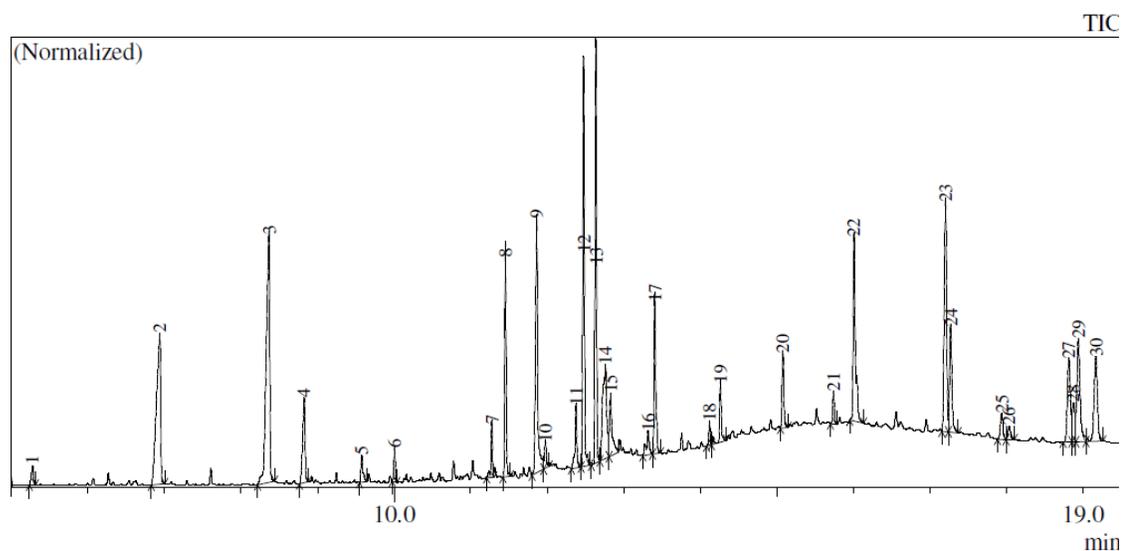


Figura No. 20. Cromatograma de la hidrólisis básica del extracto clorofórmico.

La técnica de espectrometría de masas permitió identificar que de los 30 picos registrados, 6 de ellos correspondieron a ácidos orgánicos, los cuales fueron: ácidos hexanoico, octanoico, decanoico, cinámico (3-fenil-2-propenoico), hexadecanoico y octadecanoico (Tabla No. 5), el restante corresponden a alcoholes, alcoholes aromáticos y alquenos.

Tabla No. 5. Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula.

Hidrólisis básica extracto clorofórmico <i>Ipomoea carnea Jacq</i>			
Compuesto	Tiempo de retención	Pico	<i>m/z</i>
Ácido hexanoico	5.27	3	116
Ácido octanoico*	6.94	4	144
Ácido decanoico*	8.36	5	172
Acido 3- fenil, 2 - propenoico	8.82	6	148
Ácido hexadecanoico	11.8	9	256
Ácido octadecanoico		12.8	15 284

A manera de ejemplo se muestra en la figura No. 21, el espectro de masas del ácido 3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico). El espectro muestra el pico del ion molecular $[M^+]$ con un valor *m/z* de 148 que es correspondiente a la formula molecular

$C_9H_8O_2$. Adicionalmente, se observan picos de fragmentación correspondientes a las rupturas de la molécula 131, 103, 91 y 77.

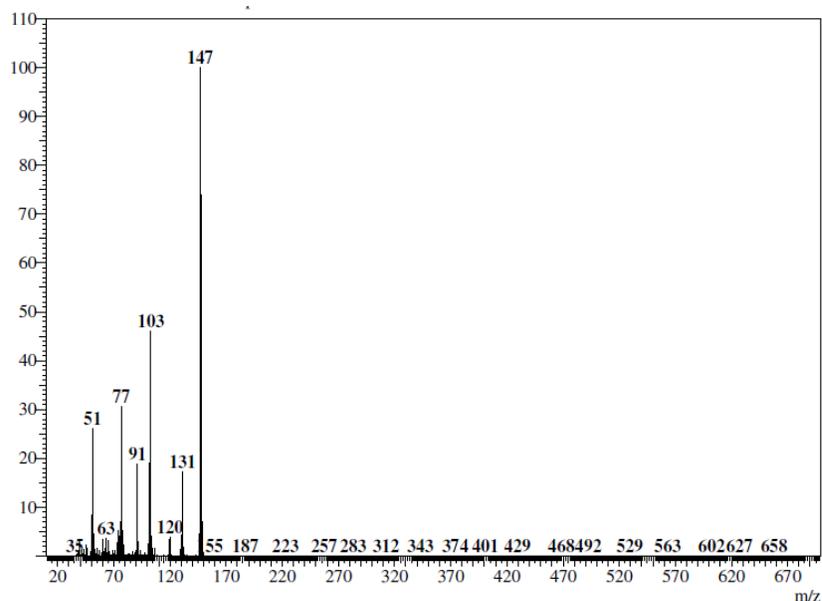


Figura No. 21. Espectro de masa ácido 3- fenil-2-propenoico (hidrolisis básica del extracto clorofórmico, método Alcanos).

En la figura No. 22, se muestra el espectro de masas del ácido hexadecanoico. El espectro muestra el pico del ión molecular $[M^+]$ con un valor m/z de 256 que es correspondiente a la formula molecular $C_{16}H_{32}O_2$. Adicionalmente, se observan picos de fragmentación correspondientes a las rupturas de la molécula 227, 213, 185, 157, 129, 115, 73.

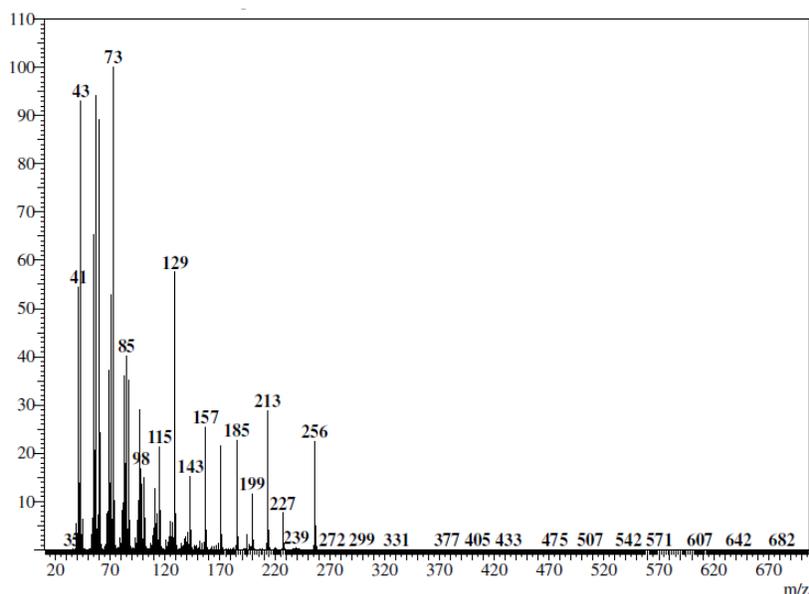


Figura No. 22. Espectro de masas del ácido hexadecanoico (hidrolisis básica del extracto clorofórmico; método Alcanos).

En la figura No. 23, se muestra el espectro de masas del ácido octadecanoico. El espectro muestra el pico del ión molecular $[M^+]$ con un valor m/z de 284 que es correspondiente a la fórmula molecular $C_{18}H_{36}O_2$. Adicionalmente, se observan picos de fragmentación correspondientes a las rupturas de la molécula 241, 185, 129, 73.

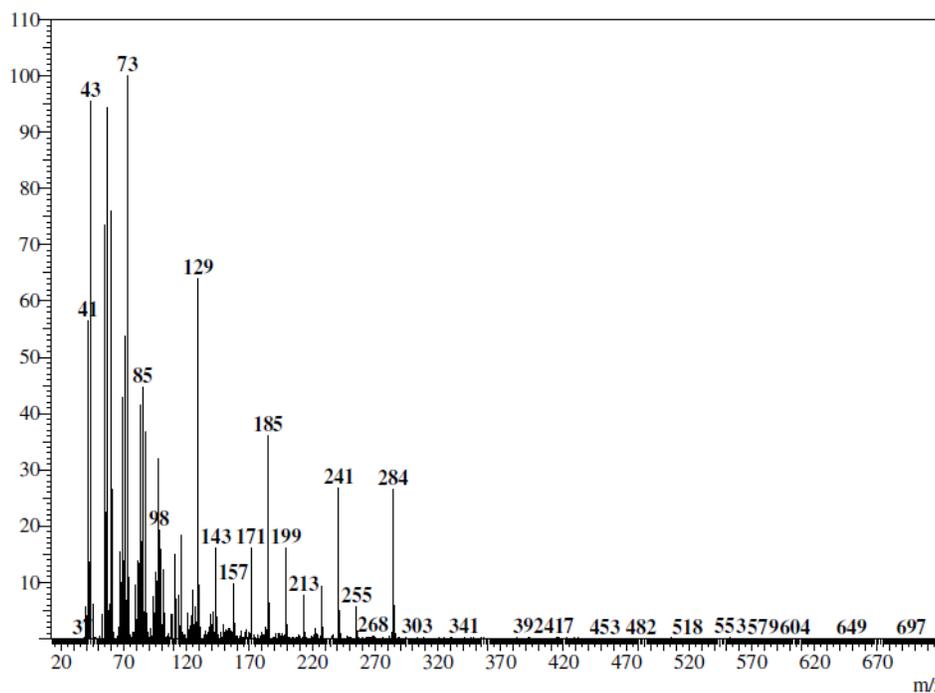


Figura No. 23. Espectro de masas del ácido octadecanoico (hidrólisis básica del extracto clorofórmico; método Alcanos).

Para el producto tanto de la hidrólisis ácida como básica del extracto metanólico se lograron identificar 20 picos (figura No. 24 y No. 25), dentro de los cuales dos picos correspondieron a los ácidos octanoico y octadecanoico obtenidos a través de la hidrólisis ácida (Tabla No. 4), mientras que 8 picos fueron caracterizados como ácidos orgánicos: octanoico, decanoico, cinámico, hexadecanoico, octadecadienoico, octadecanoico y que fueron obtenidos a través de la hidrólisis básica y ácida (ver Tabla No. 6 y No. 7)

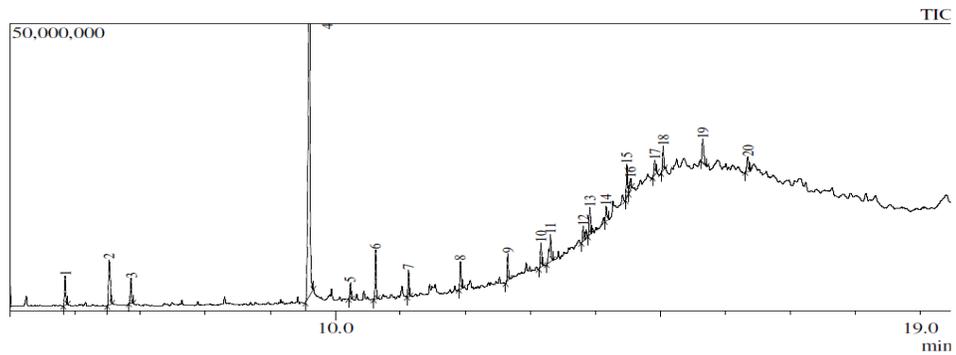


Figura No. 24. Cromatograma de la hidrolisis acida del extracto metanólico

Tabla No. 6. Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula

Hidrolisis acida extracto metanólico			
Compuesto	Tiempo de retención	Pico	<i>m/z</i>
Ácido octanoico	3.8	3	144
Ácido octadecanoico	13.8	12	343

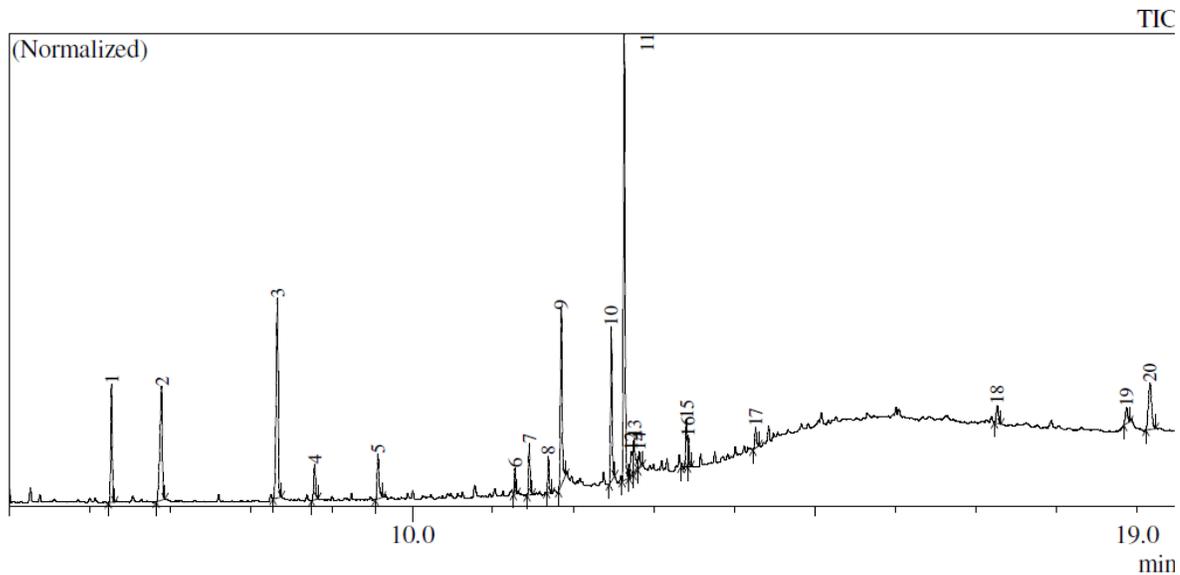


Figura No. 25. Cromatograma de la hidrolisis básica del extracto metanólico

Tabla No 7. Ácidos orgánicos encontrados por los métodos Alcanos y T pátula

Compuesto	Hidrolisis básica del extracto metanólico		
	Tiempo de retención	Pico	Peso molecular
Ácido octanoico	3.8	2	144
Ácido decanoico	8.325	3	172
Ácido-3-fenil-2-propenoico	8.788	4	148
Ácido hexadecanoico	11.853	9	320
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	12.718	12	276
9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	12.756	13	282
Ácido octadecanoico	12.822	14	291
Ácido 2-propenoico, éster 2- metílico, etenílico	4.735	3	305

Todos los ácidos orgánicos que se identificaron por la técnica de cromatografía de gases-masas se representan a continuación en dos formas: Zig-Zag y en 3D mediante el uso del software ADC LABS, lo anterior evidenciado en las Figuras No. 26 a la No. 41:

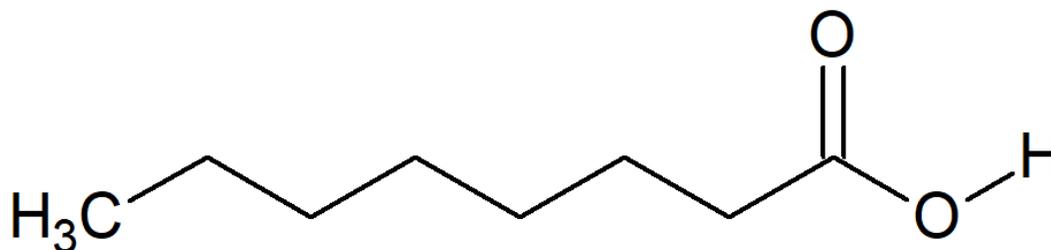
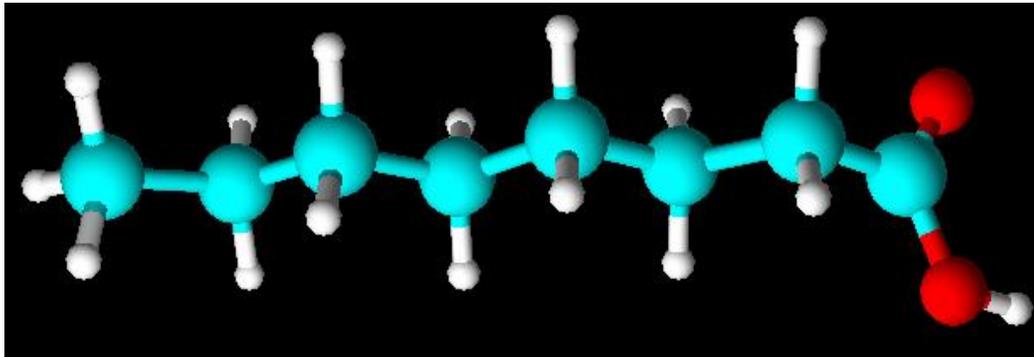


Figura No. 26. Estructuras en Zig-Zag del ácido octanoico mediante el software ADC LABS



Figuras No. 27. Estructuras en 3D del ácido octanoico mediante el software ADC LABS

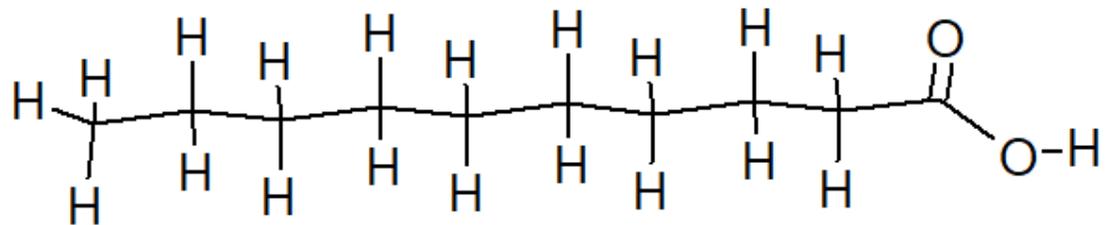


Figura No. 28. Estructuras en Zig-Zag del ácido decanoico mediante el software ADC LABS

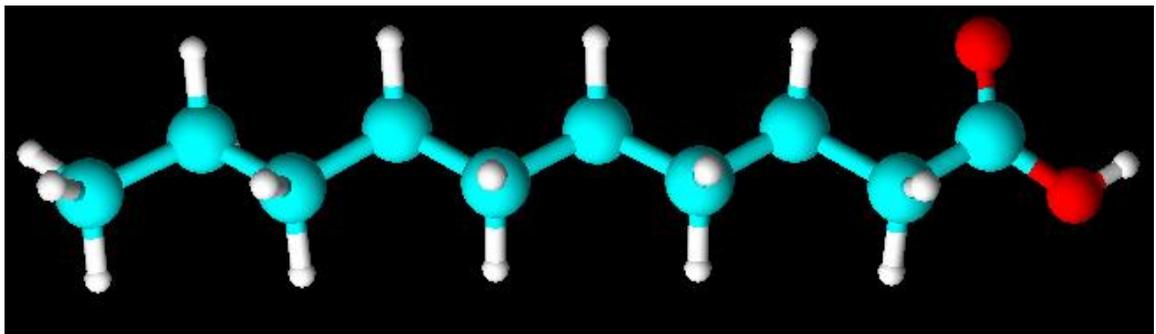


Figura No. 29. Estructuras en 3D del ácido decanoico mediante el software ADC LABS

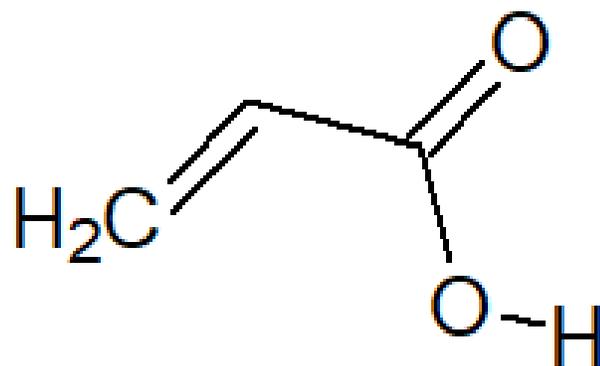


Figura No. 30. Estructuras en Zig-Zag del ácido 2 propenoico mediante el software ADC LABS

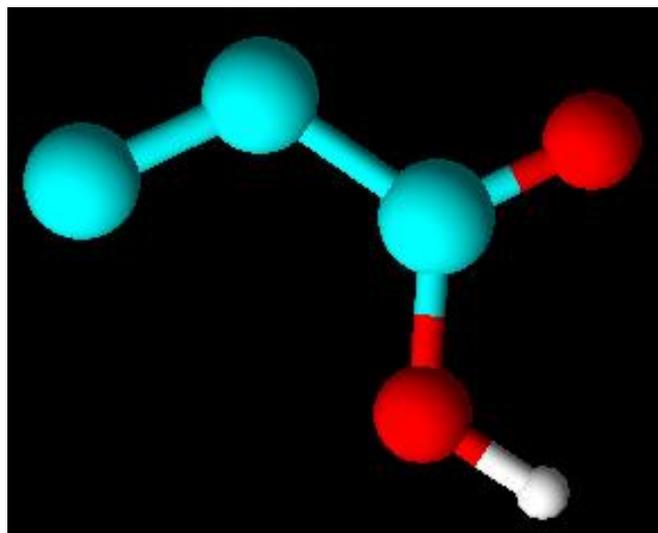


Figura No. 31. Estructuras en 3D del ácido 2 propenoico mediante el software ADC LABS

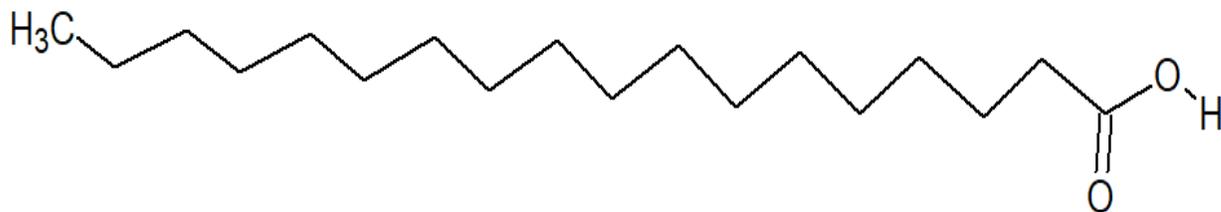


Figura No. 32. Estructuras en Zig-Zag del ácido octadecanoico mediante el software ADC LABS

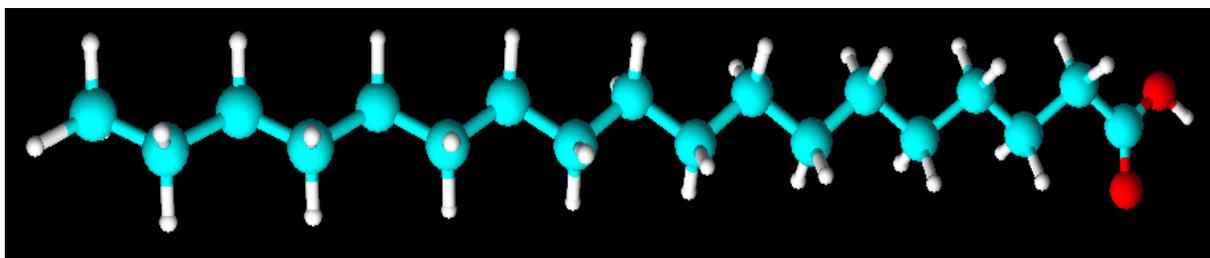


Figura No. 33. Estructuras en Zig-Zag del ácido octadecanoico mediante el software ADC LABS

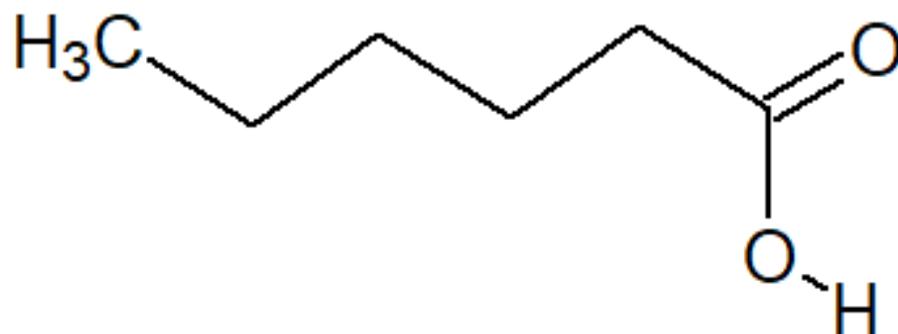


Figura No. 34. Estructuras en Zig-Zag del ácido hexanoico mediante el software ADC LABS

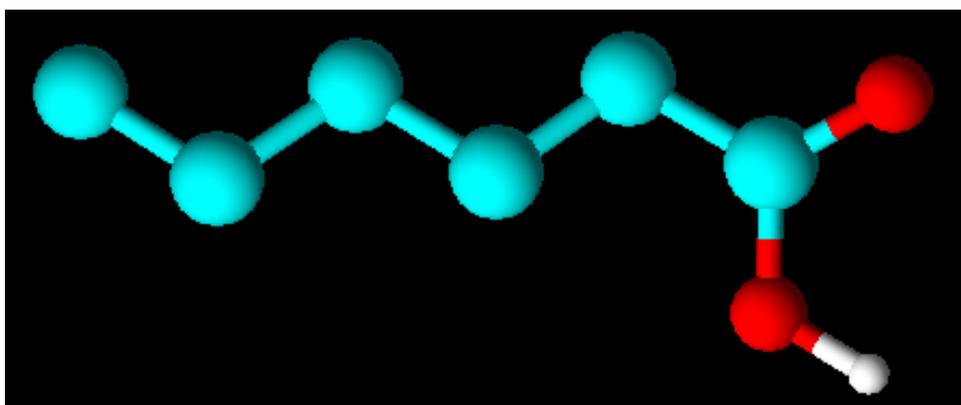


Figura No. 35. Estructuras en 3D del ácido hexanoico mediante el software ADC LABS

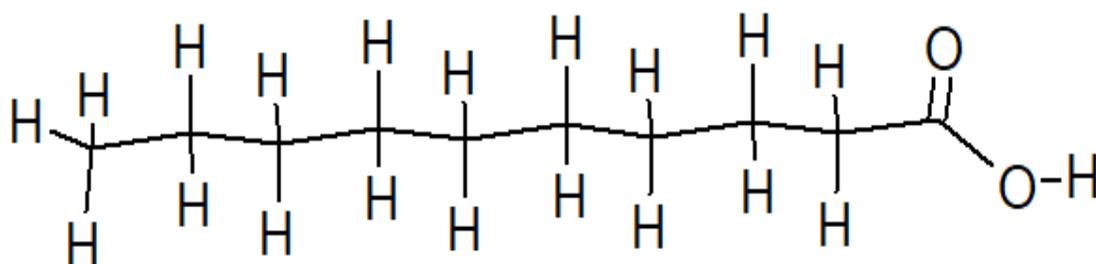


Figura No. 36. Estructuras en Zig-Zag del ácido decanoico mediante el software ADC LABS

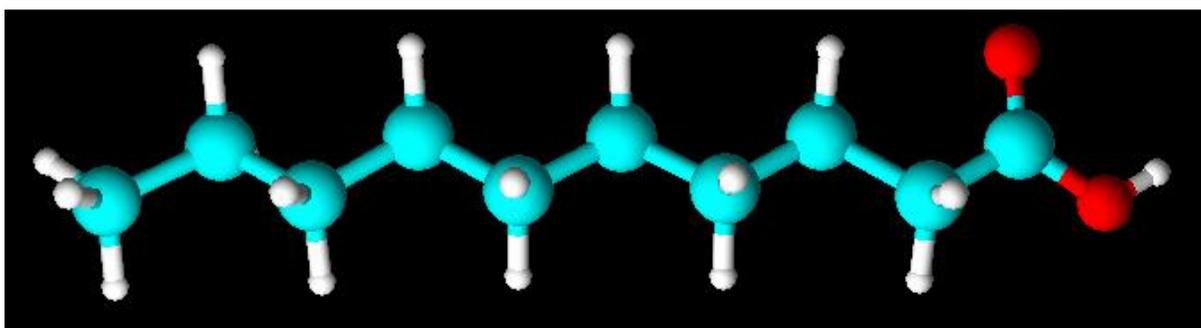


Figura No. 37. Estructuras en 3D del ácido decanoico mediante el software ADC LABS

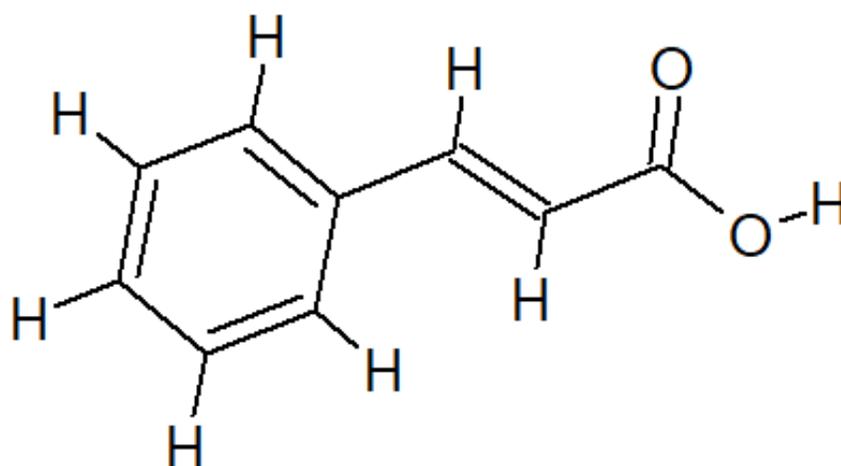


Figura No 38. Estructuras en Zig-Zag del ácido 3- fenil-2 – propenoico mediante el software ADC LABS

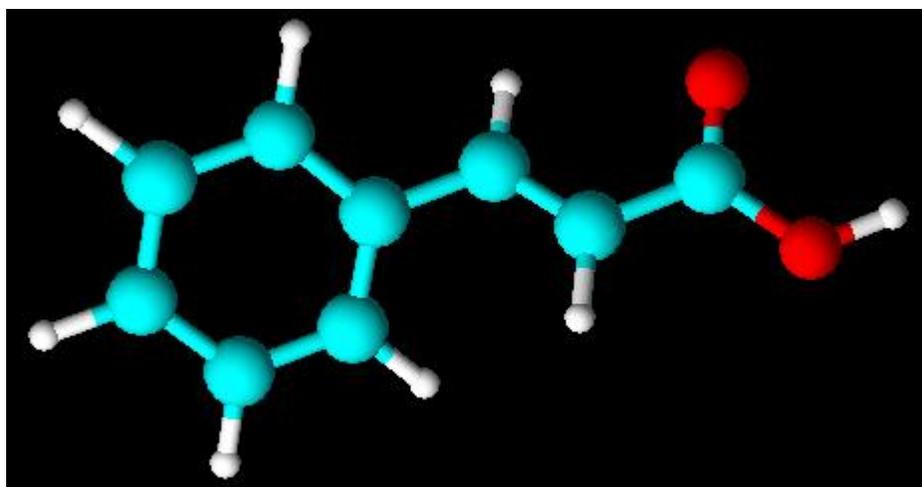


Figura No 39. Estructuras en 3D del ácido 3- fenil-2 – propenoico mediante el software ADC LABS

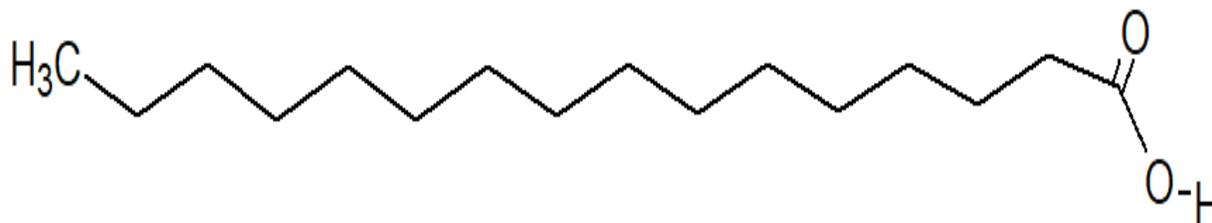


Figura No. 40. Estructuras en Zig-Zag del ácido hexadecanoico mediante el software ADC LABS

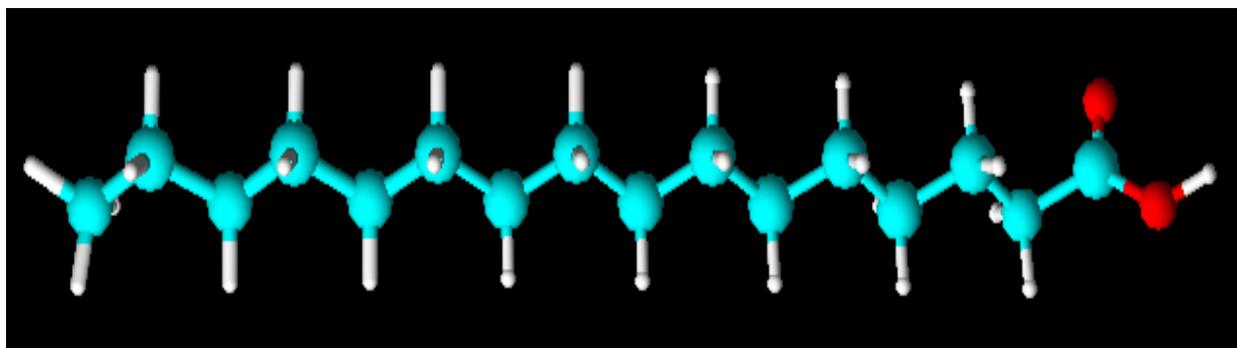


Figura No. 41. Estructuras en 3D del ácido hexadecanoico mediante el software ADC LABS

Los espectros de masas permitieron confirmar la naturaleza de los compuestos como ácidos orgánicos, en los cuales para la hidrólisis ácida de los extractos clorofórmico y metanólico fueron respectivamente: ácido octanoico *, ácido decanoico, ácido giberenilico, ácido 2 – propenoico y el ácido octadecanoico. Cabe resaltar que estos ácidos orgánicos fueron identificados con los dos métodos analíticos, igualmente los que presentan un asterisco en su nombre son aquellos que se detectaron en la hidrólisis ácida del extracto metanólico.

En la hidrólisis básica fueron detectados en los extractos clorofórmico y metanólico los siguientes ácidos de manera respectiva: ácido hexanoico, ácido octanoico *, ácido decanoico*, ácido 3- fenil, 2 – propenoico*, ácido hexadecanoico*, ácido octadecanoico*, 9,12-ácido octadecanoico (Z,Z), 9,12,15 ácido octadecatrienoico (Z,Z,Z)-. De igual forma que en el caso de las hidrólisis ácida, los ácidos nombrados

anteriormente corresponden a los dos métodos y a su vez los que tienen un asterisco son aquellos que se repiten en la hidrólisis básica del extracto metanólico.

8.6 Bioensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*

Para la realización del bioensayo se tomó como referencia el protocolo experimental de manejo de *Artemia salina* propuesto por Fitni en 1978. De manera previa al ensayo se procede a hacer la esterilización de 30 cajas de Petri y la preparación de las disoluciones de agua salada y tween 80 y de esta solución con cada uno de los extractos a diferentes concentraciones.

Las 3 primeras cajas, las cuales servirán como blanco se les adicionaron una solución de sal marina al 3% con tween 80, el cual ayuda a la disolución de los extractos en el agua actuando como emulsificante, a otras 3 cajas se les agrega una solución en agua salada con tween 80 del extracto hexánico a una concentración de 1000 ppm, a otras 3 cajas la misma solución del extracto hexánico a una concentración de 500 ppm y 3 cajas con el extracto hexánico a una concentración de 250 ppm. El mismo procedimiento se realizó para el extracto clorofórmico y metanólico todos por triplicado, esto se observa en las Figuras No. 42 y la No. 43, donde se logra evidenciar el montaje usado durante el bioensayo, de igual forma la No 44, la cual establece la forma de hacer el monitoreo a la especie *Artemia salina*.

Seguido a esto se les adiciona a cada una de las cajas 10 crustáceos realizando el monitoreo mediante el uso de un estereoscopio con el cual se procedió hacer el conteo de crustáceos vivos, dando una espera de 10 segundos para determinar la muerte de cada organismo mediante la carencia de movimiento; esto se hizo en diferentes lapsos de tiempo: dos horas después al momento de adicionar los crustáceos, a las cuatro, seis, ocho, y veinticuatro horas (Pino & Fanny, 2010). Dando como resultado los datos contenidos en las tablas No 8 – No 10 respectivamente.

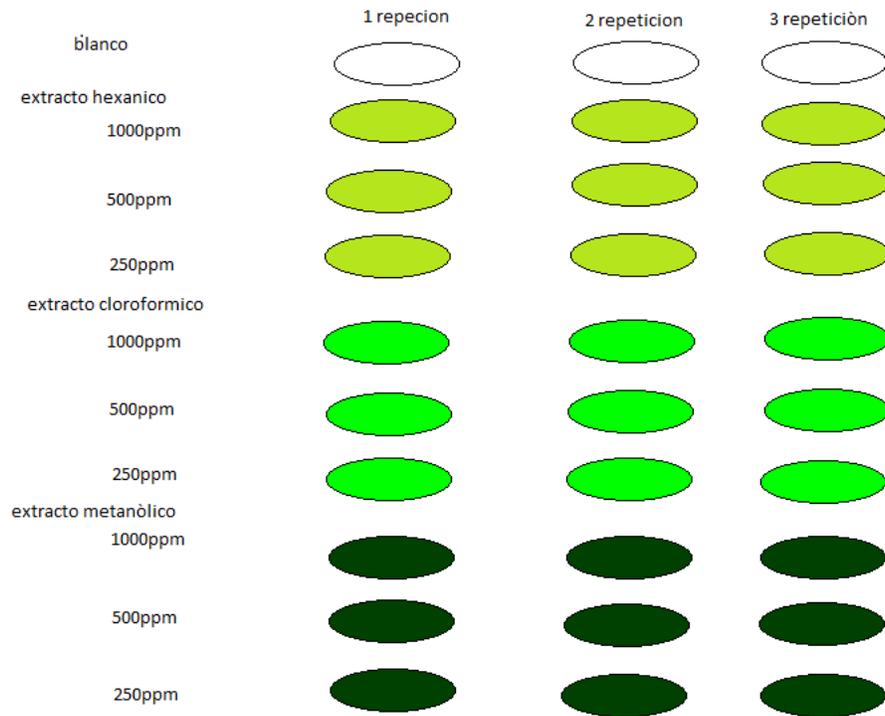


Figura No. 42. Montaje del bioensayo de *Artemia salina* con extractos de *Ipomoea carnea jac* (elaboración propia)

Para cada concentración se realizaron los siguientes cálculos estequiométricos:

$$ppm = \frac{mg \text{ del soluto}}{\text{litro de la solución}}$$

$$5ml \frac{1000mg}{1000ml} = 5mg = 1000 \text{ ppm}$$

$$5ml \frac{500mg}{1000ml} = 2,5mg = 500 \text{ ppm}$$

$$5ml \frac{250mg}{1000l} = 1,25mg = 250 \text{ ppm}$$



Figura No 43. Montaje del bioensayo en *Artemia salina*



Figura No 44. Monitoreo del bioensayo en *Artemia salina*

Tabla No 8. Control de mortalidad en el extracto Hexánico.

extracto hexánico	Número de organismos muerto /horas de control															N° de organismos muertos /total de organismos			
	2 horas			4 horas			6 horas			8 horas			24 horas						
blanco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000 ppm	2	0	0	2	0	2	2	0	1	2	0	1	4	1	1				2
500 ppm	0	0	0	0	2	1	0	2	0	1	2	0	1	2	1				1,33
250 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0				0,6

Tabla No 9. Control de mortalidad en el extracto Clorofórmico.

Extracto clorofórmico	Número de organismos muerto /horas de control															N° de organismos muertos /total de organismos	
	2 horas			4 horas			6 horas			8 horas			24 horas				
concentración																	
blanco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000 ppm	0	0	0	0	0	0	7	4	7	7	4	7	7	4	0		6
500 ppm	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0	4	2	3	0		3,66
250 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	0		0

Tabla No 10. Control de mortalidad en el extracto Metanólico.

Extracto metanólico	Número de organismos muerto /horas de control															N° de organismos muertos /total de organismos	
	2 horas			4 horas			6 horas			8 horas			24 horas				
concentración																	
blanco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000 ppm	0	0	3	1	0	3	3	0	4	6	7	6	8	10	10	9,3	
500 ppm	0	0	2	0	2	3	1	3	3	1	4	4	9	9	9	9	
250 ppm	0	1	1	0	1	1	1	2	1	3	4	2	6	4	5	5	

En los bioensayos de toxicidad es muy común encontrar diversas variables, tales como la concentración del extracto, el número de organismos vivos o muertos y la eficacia de dicho extracto al momento de afectar el ciclo de vida de cualquier organismo que se someta a este tipo de estudio.

El cálculo del porcentaje del número organismos muertos en esta prueba, se determinó como modelo matemático la siguiente fórmula:

$$P = \frac{r}{n} \times 100$$

Donde **r** es el número de organismos muertos y **n** es el número de organismos totales.

Vale la pena señalar que de manera previa se realizó un promedio de los organismos muertos en cada uno de los montajes usados para cada uno de los extractos (Hexánico, Clorofórmico y Metanólico) con su correspondiente concentración (250 ppm, 500 ppm y 1000 ppm), donde se logró obtener los siguientes resultados:

Para el extracto Hexánico:

Hexánico a 250 ppm

$$P = \frac{0,6}{10} \times 100 = \mathbf{6\%}$$

Hexánico a 500 ppm

$$P = \frac{1,3}{10} \times 100 = \mathbf{13\%}$$

Hexánico a 1000 ppm

$$P = \frac{2}{10} \times 100 = \mathbf{20\%}$$

Para el extracto Clorofórmico:

Clorofórmico a 250 ppm

$$P = \frac{3,3}{10} \times 100 = \mathbf{33\%}$$

Clorofórmico a 500 ppm

$$P = \frac{3,6}{10} \times 100 = 36\%$$

Clorofórmico a 1000 ppm

$$P = \frac{6}{10} \times 100 = 60\%$$

Para el extracto Metanólico:

Metanólico a 250 ppm

$$P = \frac{5}{10} \times 100 = 50\%$$

Metanólico a 500 ppm

$$P = \frac{9}{10} \times 100 = 90\%$$

Metanólico a 1000 ppm

$$P = \frac{9,3}{10} \times 100 = 93\%$$

Los cálculos anteriormente mostrados anteriormente corresponden a los porcentajes obtenidos a partir del deceso de los crustáceos los cuales están consignados en las tablas No 6, No 7 y No 8 respectivamente En muchas ocasiones las representaciones gráficas de concentración vs el porcentaje de mortalidad, presentan dificultades al momento de graficarlas, por lo cual se hace necesario abordar este inconveniente transformando dichas concentraciones a una escala logarítmica, permitiendo de esa manera graficar en un modelo lineal.

Por consiguiente se realizaron las transformaciones de las concentraciones a una escala logarítmica mediante la fórmula $X = \log_{10} ()$, de donde se obtuvo:

$$\log_{10} (1000\text{ppm}) = 3$$

$$\log_{10} (500\text{ppm}) = 2,698$$

$$\log_{10} (250\text{ppm}) = 2,397$$

De esta manera la forma de mostrar la relación existente entre la dosis suministrada y la respuesta a la exposición del crustáceo con la muestra se hace mediante la gráfica de la dispersión del número de organismos muertos en relación con el logaritmo de la concentración de cada uno de los extractos. Para el extracto hexánico, la gráfica de esta relación se muestra en la figura No. 45, para el extracto clorofórmico en la figura No 46 y para el extracto metanólico en la figura No. 47.

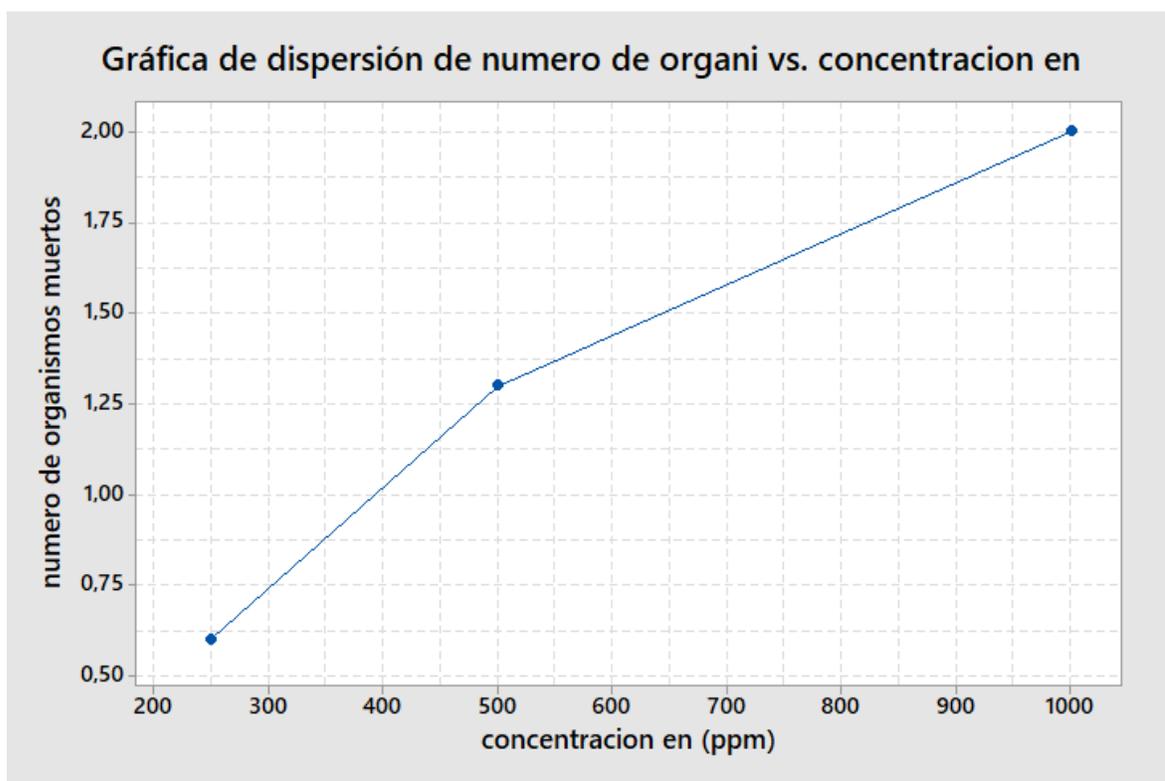


Figura No. 45. Gráfica de dispersión de numero de organismos muertos vs la concentración del extracto hexánico.

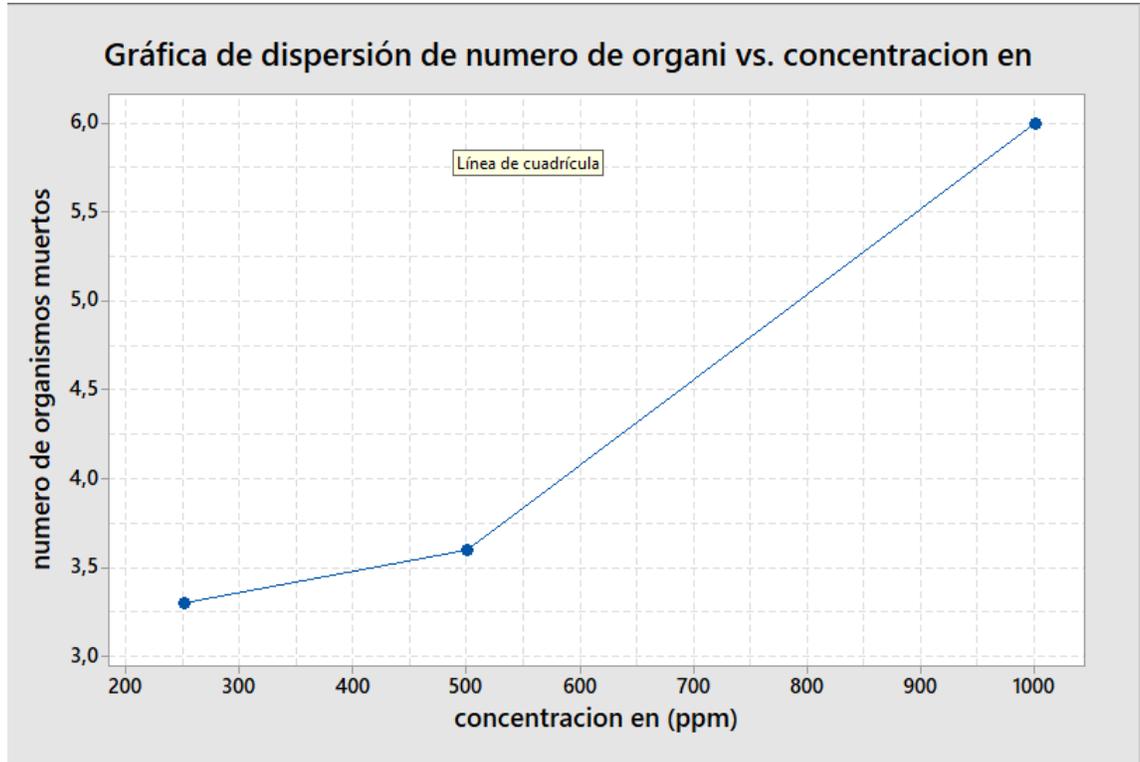


Figura No. 46. Gráfica de dispersión de numero de organismos vs la concentración del extracto clorofórmico.

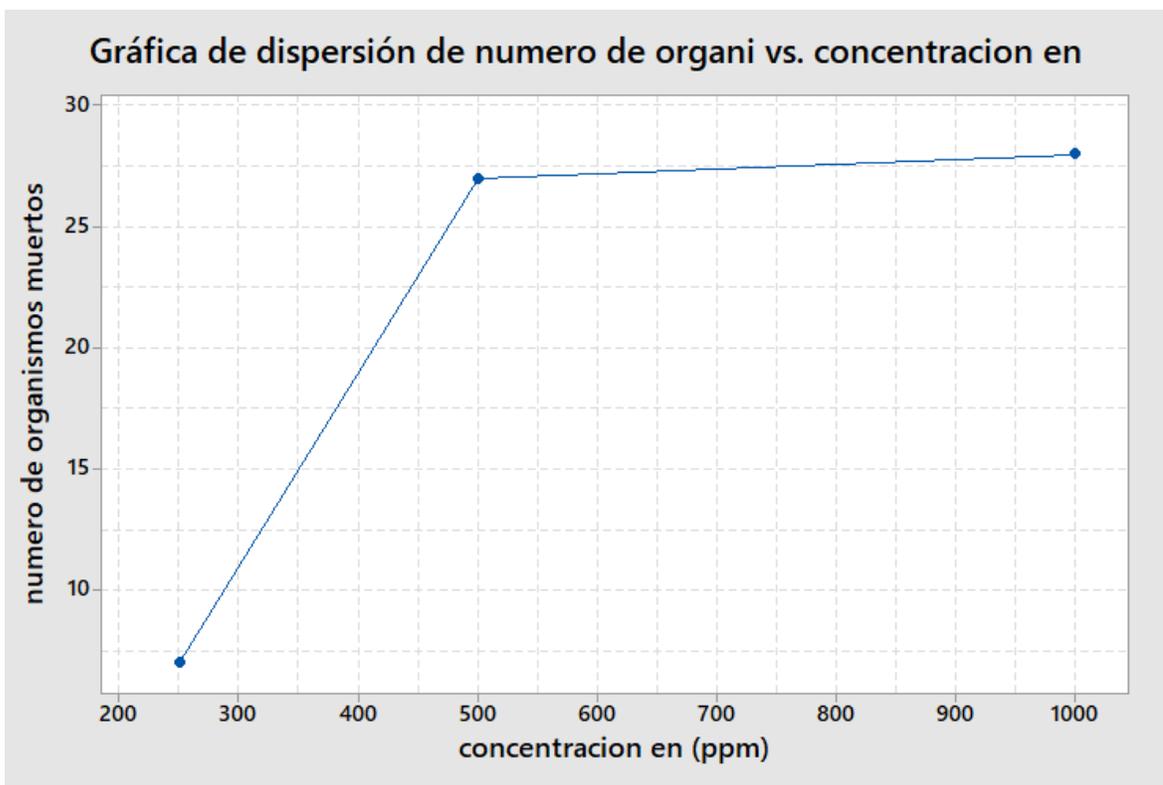


Figura No. 47. Gráfica de dispersión de número de organismos vs la concentración del extracto Metanólico.

Para determinar el CL_{50} en *Artemia salina* y el efecto de los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico de la especie *Ipomoea carnea Jacq*, se es necesario tener o haber calculado la concentración de las sustancias en porcentaje, el logaritmo en base diez de las concentraciones, el número de organismos en cada concentración, el porcentaje de mortalidad, el probit calculado (Tabla No 9) y el probit empírico, el cual está establecido en tablas y se relaciona con el porcentaje de mortalidad en cada uno de los extractos.

Para deducir el probit calculado se hizo necesario hallar el valor de **S**, la cual establece la relación de la tasa de incremento del logaritmo de la concentración por unidad de incremento de probit, para ello se empleó la siguiente formula:

$$S = \frac{(X - x)}{(PE - pe)}$$

Donde **X** hace referencia a la mayor concentración del extracto, **x** pequeña a la menor concentración del extracto, **PE** al probit correspondiente a la mayor concentración y **pe** al probit de la menor concentración, para cada extracto el valor se es:

Para el extracto metanólico:

$$S = \frac{(3 - 2,397)}{(6,48 - 5,0)} = \frac{0,603}{1,48} = 0,407$$

Para el extracto clorofórmico:

$$S = \frac{(3 - 2,397)}{(5,25 - 4,56)} = \frac{0,603}{0,69} = 0,873$$

Para el extracto hexánico:

$$S = \frac{(3 - 2,397)}{(4,16 - 3,45)} = \frac{0,603}{0,71} = 0,849$$

A partir de los cálculos realizados anteriormente se elabora la Tabla No. 11, la cual sintetiza los datos necesarios para la construcción de las figuras No. 48, 49 y 50 que muestran el número probit con relación al logaritmo de la concentración de cada uno de los extractos.

Tabla No. 11. Datos para hallar el CL₅₀ por el método probit.

Extracto	Concentración de la muestra	log de la concentración	Nº de organismos vivos	Nº de organismos muertos	Porcentaje de la mortalidad	Probit empírico	Probit calculado
Hexánico	250 ppm	2,397	10	2	6%	3,45	No existe
	500 ppm	2,698	10	4	13%	3,87	No existe
	1000 ppm	3	10	6	20%	4,16	No existe
Clorofórmico	250 ppm	2,397	10	10	33%	4,56	4,521
	500 ppm	2,698	10	11	36%	4,64	4,864
	1000 ppm	3	10	18	60%	5,25	5,21
Metanólico	250 ppm	2,397	10	7	50%	5	5
	500 ppm	2,698	10	27	90%	6,28	5,739
	1000 ppm	3	10	28	93%	6,48	6,48

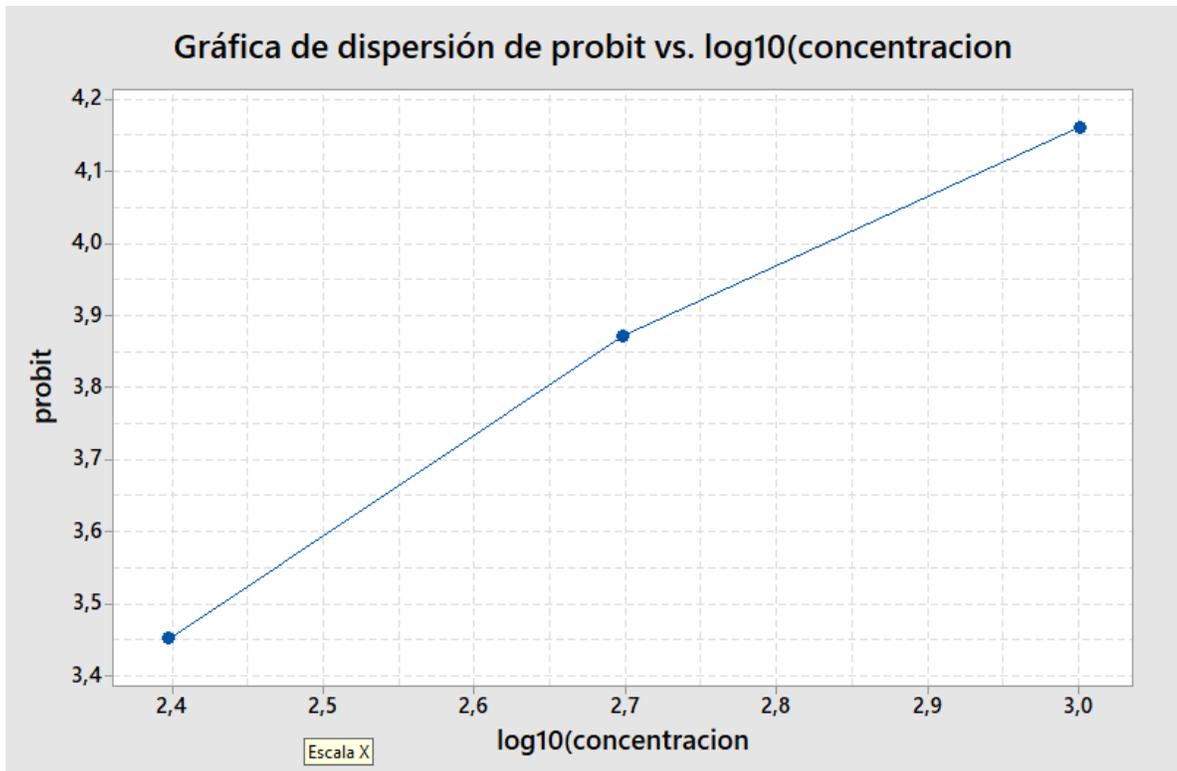


Figura No. 48. Gráfica de la relación dosis respuesta del extracto metanólico.

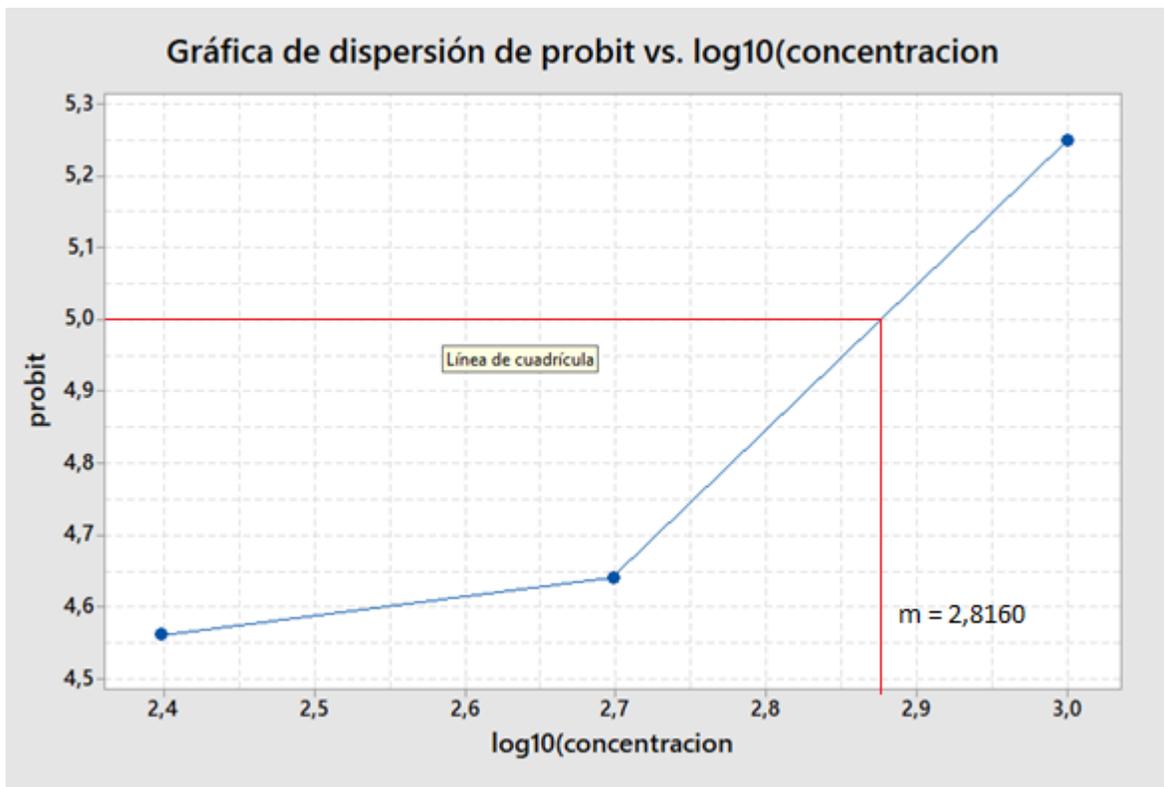


Figura No. 49. Grafica de la relación dosis respuesta del extracto clorofórmico.

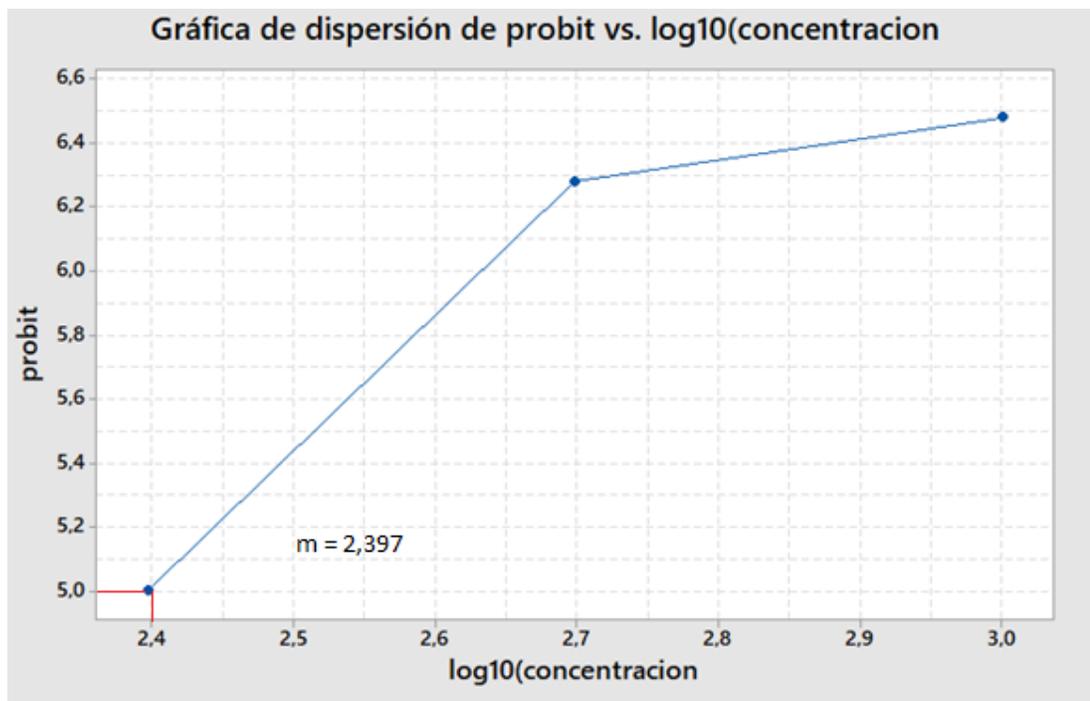


Figura No. 50. Gráfica de la relación dosis respuesta del extracto metanólico

Según lo mostrado en las figuras No. 46 y No.47 y en las Tablas No. 9 y No.10, se puede decir que en los extractos metanólico y clorofórmico se presenta el mayor porcentaje de mortalidad incrementado de forma gradual a medida en que se aumenta la concentración de estos, donde dichas relaciones porcentuales están por encima del 30% llegando hasta el 95%, indicando de esta manera que la toxicidad de la especie *Ipomoea carnea Jacq* se presenta en extractos polares, donde se encuentran sustancias como monosacáridos, disacaridos u oligosacáridos con esterres de cadena corta (Budzikiewicz, Pereda, Rosas, & Castañeda, 2010).

Para calcular el valor probit esperado para cada concentración utilizada en el bioensayo se utilizó la siguiente expresión:

$$Y = 5 + \frac{(x - m)}{S}$$

En donde Y es el valor del probit calculado, x es la concentración, m es la pendiente donde corta la gráfica, según esto y lo mostrado anteriormente en las gráficas

4,5 y 6 se puede deducir que en el extracto hexánico no se puede calcular m, por lo tanto no existen valores para hallar Y generando de esta manera que no exista CL₅₀ para este. Por otro lado los valores de Y para los extractos clorofórmico y metanólico son los siguientes:

Para el extracto clorofórmico

$$Y = 5 + \frac{(3-2,816)}{0,873} = 5,210$$

$$Y = 5 + \frac{(2,698-2,816)}{0,873} = 4,864$$

$$Y = 5 + \frac{(2,397-2,816)}{0,873} = 4,52$$

Para el extracto metanólico

$$Y = 5 + \frac{(3-2,397)}{0,407} = 6,48$$

$$Y = 5 + \frac{(2,698-2,397)}{0,407} = 5,739$$

$$Y = 5 + \frac{(2,397-2,397)}{0,407} = 5$$

Teniendo en cuenta los datos de la tabla No 10, se logra calcular el probit esperado y a partir de las figuras No. 46 y No. 47, en donde en el eje X se encuentra el logaritmo de las concentraciones y en eje Y el probit empírico; en ella se traza una línea horizontal, partiendo del probit 5 hasta cortar la recta. El valor correspondiente en el eje X se denomina “m” y el antilogaritmo de este valor corresponderá al CL₅₀. Para nuestro caso los valores de m para el extracto clorofórmico y metanólico son de 2,816 y 2,397 respectivamente, no se encontró CL₅₀ para el extracto hexánico ya que, si se observa de forma detenida la figura No. 45, se puede evidenciar que el área bajo la curva de esta gráfica está por debajo del corte que se ha trazado sobre 5 probit propuesto por Finney.

El CL₅₀ obtenido para el extracto clorofórmico y metanólico será el siguiente:

Para el extracto clorofórmico

$$CL_{50} = \text{antilog}_{10} (m)$$

$$CL_{50} = \text{antilog}_{10} (2,816)$$

$$CL_{50} = 654,66 \text{ ppm}$$

Para el extracto metanólico

$$CL_{50} = \text{antilog}_{10} (2,3979)$$

$$CL_{50} = 249,9 \text{ ppm}$$

Según la tabla de clasificación de toxicidad de acuerdo a la dosis letal media según CYTED (Tabla No 12), se logra determinar que el extracto clorofórmico posee un grado de toxicidad IV lo que indica que es ligeramente tóxico, mientras que el extracto metanólico posee un grado de toxicidad III lo que indica que es moderadamente tóxico.

Tabla No 12. Clasificación de toxicidad de acuerdo a la dosis letal media según CYTED.

Tipo	Descripción	CL ₅₀ (ppm)
I	Extremadamente Toxico	1-10
II	Altamente Toxico	10-100
III	Moderadamente Toxico	100-500
IV	Ligeramente Toxico	500-1000
V	Prácticamente No Toxico	1000-1500
VI	Relativamente Inocuo	>1500

Con el fin de observar la mortalidad de la *Artemia salina* cuando es sometida a diferentes extractos con concentraciones distintas y con el objetivo de determinar cuál de estos presentaba la concentración ideal para matar la mitad de la población y a su vez si la letalidad radica en compuestos ligados a los azúcares, para esto se realiza un análisis estadístico probit utilizando el programa (minitab 18). Con los cálculos de porcentaje de mortalidad para cada una de las concentraciones más las gráficas que arrojó dicho programa, en donde se representan el valor de efecto de mortalidad respecto a la concentración, se halla el CL50.

9. CONCLUSIONES

A través de esta investigación fitoquímica se logró identificar la presencia de resinas glicosídicas en la especie vegetal *Ipomoea carnea*. En primer lugar, se obtuvieron los extractos de la planta con diferentes disolventes a través de la técnica de extracción por maceración con hexano, cloroformo y metanol. La identificación de los azúcares en los extractos se llevó a cabo a través de las siguientes pruebas cualitativas: Molish, Keller-Killiani y Antrona, permitiendo determinar la presencia de azúcares en el extracto clorofórmico y metanólico.

En la identificación de los residuos de éster en los azúcares, fue necesario la degradación de los oligosacáridos en los extractos mediante la hidrólisis con base y con ácido. Estas reacciones permitieron la liberación de los ésteres en forma de ácidos orgánicos, los cuales fueron identificados mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los ácidos que se identificaron constituyendo a los glucósidos fueron: octanoico, decanoico, 3-fenil-2-propenoico, hexanoico, hexadecanoico y octadecanoico, las cuales han sido encontradas en 34 especies de plantas incluyendo las del género Convolvuláceas.

El ensayo de toxicidad de los extractos de *Ipomoea carnea* sobre *Artemia salina*, permitió determinar que el extracto metanólico presenta mayor grado de toxicidad con respecto al extracto clorofórmico. La concentración letal media CL₅₀ para el extracto clorofórmico fue de 654 ppm, mientras que para el metanólico fue de 249 ppm. La letalidad del extracto metanólico podría estar asociada a la presencia de las resinas glicosídicas como las responsables del efecto tóxico en la planta de *Ipomoea carnea*.

Se recomienda continuar con el estudio de las resinas glicosídicas de la especie vegetal *Ipomoea carnea*, acerca de la purificación de los oligosacáridos por técnicas de cromatografía de columna y HPLC y su elucidación estructural por la técnica de infrarrojo, espectrometría de masas y RMN de ¹H, ¹³C y bidimensional.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Al, H., Sezgin, Y., Dnmez, A., Redi, P. & Tasdemir, D. (2007). *Crypthophilic Acids A, B, and C: Resin Glycosides from Aerial Parts of Scrophularia crythophila*. Ankara, Turquia.: Departamento de Farmacología.
- Alcaldía de Neiva. (2017). *Información del Municipio*. Neiva: Alcaldía de Neiva. Recuperado de <http://www.alcaldianeiva.gov.co/MiMunicipio/Paginas/Informacion-del-Municipio.aspx>
- Bretó, M. (2011). *Cromatografo de gases*. [Figura]. Recuperado de <https://www.flickr.com/photos/67235095@N07/6120651009/in/photostream/>
- Budzikiewicz, H., Pereda, R., Rosas, D., & Castañeda, J. (2010). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Mexico DC: SpringerWienNewYork.
- Castañeda, J., & Pereda, R. (2011). *Resin Glycosides from the Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (Ipomoea purga)*. ciudad de Mexico, Mexico.
- Castañeda, J., Charry, P., & Miranda, R. (2013). Empleo de métodos analíticos modernos para el aislamiento y la identificación de resinas glicosídicas de la familia convolvulaceae.
- Castañeda, J., Figueroa, G., Jacobo, N., & Pereda, R. (2012). *Purgin II, a Resin Glycoside Ester-Type Dimer and Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps from Ipomea purga*. México D.F., México: Universidad Autónoma de México.
- Corona, B., & Pereda, R. (2012). *Morning Glory Resin Glycosides as Modulators of Antibiotic Activity in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria*. Mexico D.F.: Universidad Autónoma de México.
- Corona, B., Rosas, D., Castañeda, J., Aparicio, M., Fragoso, M., Figueroa, G., & Pereda, R. (2016). *Resin glycosides from Ipomoea wolcottiana as modulators of the multidrug resistance phenotype in vitro*. Mexico D.F, Mexico.
- Corredor, F., & Cortéz, J. (2011). *determinacion de la concentracion letal media (CL50 - 48) de Selenio y Cobalto mediante ensayos de toxicidad con organsimos DAHINIA magna*. Bogota, Colombia: Facultad de Ingeniería Universidad de la Salle.
- Cruz, S., Castañeda, J., Figueroa, G., Mendoza, A., Lorence, A., & Pereda, R. (2012). Mammalian Multidrug Resistance Lipopentasaccharide Inhibitors from Ipomoea alba Seeds. Cruz, S., Castañeda, J., Figueroa, G., Mendoza, A., Lorence, A. &

- Pereda, R (2012). *Mammalian Multidrug Resistance LiDepartamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de Mexi.*
- Figuroa, J. (2015). *El Caguán ya tiene placa de Huella. Diario del Huila.* Retrieved from <https://www.diariodelhuila.com/regional/el-caguan-ya-tiene-placa-huella-cdgint20151207114414182>
- Gobernación del Huila. (2017). *Departamento del Huila.* Neiva: Gobernación del Huila. Recuperado de <http://www.huila.gov.co/general/>
- González, Y., & Recalde, L. (2006). PLANTAS TÓXICAS DE ASUNCIÓN Y GRAN ASUNCIÓN. *Rojasiana.*
- Haraguchi, M; Gorniak, S; Ikeda, K; Minami, Y; Kato, A; Watson, A; Nash, R; Molyneux, R; Asano, N. (2005). *Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, Ipomoea carnea.* Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, Ipomoea carnea.
- Herbario Universidad Nacional . (2015). *Colecciones científicas.* Bogotá, Colombia: Universidad Nacional .
- Hernández, S., Fernández, C., & Baptista, L. (2010). *metodologia de la investigacion.* Mexico D.F, Mexico: McGRAW-HILL.
- Khalid, S., Kumar, R., Reddy, N., Jinesh, S., Kumar, S., & Rao, S. (2011). *NTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF IPOMOEACARNEA JACQ.* Karnataka, India.
- Khatiwora, E., Adsul, V., Kulkarni, M., Deshpande, N., & Kashalkar, R. (2010). *Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of Ipomoea carnea.* Pune, India.
- Leu, I. (2001). *La Artemia y su Cultivo en el Perú.* Pirua, Perú.
- Martín, F., & Pelillo, M. (2012). *GC/MS Perkin Elmer Autosystem XL.* [Fotografía]. Recuperado de <https://www.galileoequipos.com/es/lcms-gcms/752-gc-ms-perkin-elmer-autosystem-xl->
- Meira, M., Silva, E., & David, J. (2012). Review of the genus Ipomoea: traditional uses, chemistry and biological activities.
- Miranda, J., & Pereda, R. (2011). *Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (Ipomoea purga).* Mexico D.F.
- Nelson, D., Cox, M., & Lehninger, A. (2006). *Principios de Bioquímica.* Barcelona, España: Omega.

- Olguín, L., & Magadán, H. (2004). *MÉTODOS EN BIOTECNOLOGIA CROMATOGRAFIA DE GASES MASAS*. ciudad de Mexico, Mexico: Instituto de Biotecnología Universidad Autónoma de México.
- Pereda, M., Fragoso, M., Escalante, E., Hernández, B., Linares, E., & Bye, R. (2006). *Profiling of the Resin Glycoside Content of Mexican Jalap Roots with Purgative Activity*. Mexico D.F.
- Pino, P., & Fanny, L. (2010). *Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales*. La Habana, Cuba: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
- Rios, E., Bogado, F., Merlo, W., Mussart, N., Acosta, C., & Acosta, P. (2007). *Hepatotoxicidad inducida por Ipomoea carnea var. Fistulosa (aguapeí, mandiyurá) de Argentina en cabras*. Corrientes, Argentina.
- Ríos, M. (2008). *Así es mi vereda El Triunfo. [Los niños de la vereda El Triunfo]*. Retrieved from <http://veredatriunfo.blogspot.com/>
- Rojas, A. (2013). Estudio químico comparativo del extracto apolar de las hojas de la especie *Elaeis oleífera* (H.B.K) Cortés colectada en dos diferentes hábitats de Colombia y Perú. bogota, Colombia.
- Sistema de Información sobre Biodiversidad para Colombia. (2015). *Biocifras de Diversidad en Colombia*. Bogotá.
- Srivastava, D., & Shukla, k. (2015). *Pharmaceutical efficacy of Ipomoea carnea*. Gorakhpur, India.
- Takigawa, A., Muto, H., Kabata, K., Okawa, M., Kinjo, J., Yoshimitsu, H., . . . Ono, M. (2011). *Calysolins I–IV, Resin Glycosides from Calystegia soldanella*. Tokai, Japon.
- Verde, M., García, S., & Rivas, C. (2016). *Metodología Científica para el estudio de plantas medicinales*. Nuevo León, México: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Villa, G. (2003). *espectrometria de masas*. Cuernavaca Mexico.
- Vivas, L., & Viveros, L. (2017). *Análisis mediante cromatografía de gases, espectroscopía de masas y evaluación de la actividad alelopática de los extractos hidrolizados de la especie Ipomoea purpurea L. Roth*. Neiva Colombia.

Yong, Q., Song, W., & G, Y. (2009). *Novel acylated lipo-oligosaccharides from the tubers of Ipomoea batatas*. Nanjing, China.

11. ANEXOS

ANEXO No 1. Tabla de valores de probit empírico

Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

A Valores entre 99, 0 y 99, 9.

