



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**Aislamiento y caracterización de metabolitos  
secundarios del extracto etanólico de tallos de  
*Cacosmia rugosa* Kunth.**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

**INGENIERO QUÍMICO**

**Autor:** Espinosa Ortega, José Martín

**Director:** Romero Benavides, Juan Carlos

LOJA

2025



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

2025

## Aprobación del director del trabajo de Integración Curricular

Loja, 17 de marzo del 2025

Magister

Natalí Elizabeth Solano Cueva

**Directora de la carrera de Ingeniería química**

Loja. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios del extracto etanólico de tallos de *Cacosmia rugosa* Kunth realizado por José Martín Espinosa Ortega ha sido orientado y revisado durante su ejecución, verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, considera que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, apruebo para continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Juan Carlos Romero Benavides

C.I.:1103018477

Correo electrónico: [jcromerob@utpl.edu.ec](mailto:jcromerob@utpl.edu.ec)

### Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, José Martín Espinosa Ortega declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor del Trabajo de Integración Curricular denominado: Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios del extracto etanólico de tallos de *Cacosmia rugosa* Kunth, de la carrera de Ingeniería Química, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo uno Marco teórico, Capítulo dos Diseño metodológico, Capítulo tres Análisis e interpretación de resultados, siendo Juan Carlos Romero Benavides, director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: .....

Autor: Espinosa Ortega José Martin

C.I.: 1105711285

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo, ante todo, a mi familia, que ha sido mi apoyo incondicional y la fuente de mi mayor fortaleza. En especial a mi madre y a mi padre, cuyo amor infinito y fe en mí, incluso en mis momentos de duda, me enseñaron que los sueños se conquistan con esfuerzo y pasión.

También a mis amados abuelos, cuya sabiduría, cariño y perseverancia me han inspirado profundamente. Sus abrazos y consejos siempre fueron un refugio de paz y una motivación constante para continuar adelante.

## **Agradecimiento**

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al PhD. Juan Carlos Romero, mi tutor de tesis, por su inagotable paciencia, guía y dedicación constante. Gracias por compartir su conocimiento, por responder cada una de mis inquietudes. Su compromiso fue esencial para la consecución de este logro.

También agradezco a Angie Castillo, una persona muy especial para mí y por su invaluable colaboración en la realización de este trabajo. Tu disposición y esfuerzo durante este proceso fue crucial para este trabajo, y siempre estaré profundamente agradecido por tu apoyo.

## Índice de contenido

Carátula .....	I
Aprobación del director del trabajo de titulación .....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos .....	III
Dedicatoria .....	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenido .....	VII
Índice de figuras .....	IX
Índice de tablas .....	XI
Resumen.....	1
Abstract .....	2
Introducción .....	3
Capítulo Uno.....	5
Marco Teórico.....	5
Capítulo Dos.....	9
Metodología.....	9
2.1. Recolección de la planta <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth .....	9
2.2 Lavado, secado, triturado y pesaje de los tallos.....	10
2.3 Maceración, filtración y almacenaje de los tallos .....	10
2.4 Realización del Tamizaje fitoquímico preliminar.....	11
2.5 Caracterización por espectroscopia infrarroja.....	15
2.6 Identificación de compuestos por cromatografía de capa fina:.....	15
2.7 Fraccionamiento de compuestos por cromatografía flash .....	16
2.8 Purificación de fracciones por cromatografía preparativa.....	17
2.9 Caracterización de compuestos por resonancia magnética nuclear.....	18
Capítulo Tres .....	19

<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>19</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>35</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>37</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>38</b>

## Índice de figuras

Figura 1 Posición filogenética del género <i>Cacosmia</i> Kunth en la tribu Liabeae Rydb.	5
Figura 2 Ilustración de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth .....	6
Figura 3 Terpenos acetilénicos conjugados aislados de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth .....	8
Figura 4 Triterpenos de tipo lupano aislados de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth .....	8
Figura 5 Sesquiterpenos lactónicos de tipo guianólidos con grupo hidroperóxido aislados de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth.....	8
Figura 6 Diagrama de flujo de los métodos empleados en el trabajo de integración curricular .....	9
Figura 7 Ensayo de Sudan del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth. ....	20
Figura 8 Ensayo de Biuret del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth.....	21
Figura 9 Ensayo de Fehling del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth. ....	21
Figura 10 Ensayo de formación de espuma del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth.....	22
Figura 11 Ensayo de Shinoda espuma del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth.....	22
Figura 12 Ensayo de Bornträger del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth .....	23
Figura 13 Ensayo de cloruro férrico del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth .....	23
Figura 14 Ensayo de Liebermann-Burchard del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth .....	24
Figura 15 Ensayo de Dragendorff del extracto etanólico de <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth. ....	24
Figura 16 Resultado e identificación de bandas del espectro infrarrojo del extracto etanólico de tallos <i>Cacosmia rugosa</i> Kunth.....	25
Figura 17 Resultados de polaridades en placas de gel de sílice fase directa.....	26

<b>Figura 18 Cromatograma obtenido por cromatografía flash del extracto etanólico de Cacosmia rugosa Kunth.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 19 Placa TLC de las separaciones 20 al 30 .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 20 Placa preparativa de la fracción 3.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 21 Resultado e identificación de bandas del espectro infrarrojo de la fracción 3. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 22 Resultado RMN <sup>1</sup>H de la fracción 3. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 23 Estructuras químicas de las moléculas A y B utilizadas de referencia en el estudio.....</b>	<b>34</b>

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1 Ensayos realizados para el tamizaje fitoquímico.....</b>	<b>11</b>
<b>Tabla 2 Gradientes usados en la cromatografía flash .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabla 3 Gradientes de elución en la cromatografía flash .....</b>	<b>17</b>
<b>Tabla 4 Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 5 Tabla de resultados de las polaridades, el tiempo de elución y la presión en la columna cromatográfica .....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 6 Resultado de las fracciones obtenidas, peso y apariencia.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 7 Señales del espectro de la fracción 3.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 8 Comparación de los desplazamientos .....</b>	<b>33</b>

## Resumen

El presente trabajo de titulación se centra en el estudio de *Cacosmia rugosa* Kunth, una planta de la familia Asteraceae, presente en Ecuador y Perú, tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth. Para este estudio, se recolectaron 2 kg de tallos de *Cacosmia rugosa* Kunth, que fueron lavados, secados y triturados antes de ser macerados en etanol. El rendimiento de extracción obtenido fue de 2.3%. Se realizaron ensayos fitoquímicos para identificar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto, destacando los taninos, esteroides y terpenos por su alta presencia en el extracto y los de menor presencia fueron saponinas, flavonoides, alcaloides y quinonas.

Además, se realizaron ensayos de cromatografía en capa fina utilizando diferentes solventes con diversas polaridades. Con base en estos resultados, se llevó a cabo la cromatografía flash, obteniendo un total de 96 separaciones. Estas fracciones fueron agrupadas tras realizar un análisis de similitudes mediante cromatografía en capa fina, lo que permitió la obtención de tres fracciones principales. De estas, la fracción 3 fue sometida a una placa preparativa para raspar la parte de interés y se realizaron análisis de espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear de protones  $^1\text{H}$ . Los resultados indicaron que el compuesto presente en la fracción 3 mostraba características similares a las de un esteroide.

**Palabras clave:** Fracciones, espectroscopia, fitoquímico, cromatografía.

### **Abstract**

The present thesis focuses on the study of *Cacosmia rugosa* Kunth, a plant of the Asteraceae family, present in Ecuador and Peru, and aimed at the characterization and isolation of secondary metabolites present in the ethanolic extract of *Cacosmia rugosa* Kunth. For this study, 2 kg of *Cacosmia rugosa* Kunth stems were collected, which were washed, dried and crushed before being macerated in ethanol. The extraction yield obtained was 2.3%. Phytochemical tests were carried out to identify and characterize the secondary metabolites present in the extract, highlighting tannins, steroids and terpenes due to their high presence in the extract and those with a lower presence were saponins, flavonoids, alkaloids and quinones.

In addition, thin layer chromatography tests were carried out using different solvents with different polarities. Based on these results, flash chromatography was carried out, obtaining a total of 96 separations. These fractions were grouped after performing a similarity analysis using thin layer chromatography, which allowed obtaining three main fractions. Of these, fraction 3 was subjected to a preparative plate to scrape off the part of interest and infrared spectroscopy and <sup>1</sup>H proton nuclear magnetic resonance analyses were performed. The results indicated that the compound present in fraction 3 showed characteristics like those of a steroid.

**Keywords:** Fractions, spectroscopy, phytochemistry, chromatography.

## Introducción

La especie *Cacosmia rugosa* Kunth es la especie de la familia Asteraceae con mayor distribución. En Ecuador se encuentra en las provincias de Azuay, Cañar, Chimborazo, Imbabura, Loja y Pichincha, también está presente en el norte del Perú (Michael O. Dillon, 2009). La etimología del nombre *Cacosmia* se debe al aroma desagradable que puede percibirse al manipular las flores de este tipo de plantas.

Varios grupos étnicos han demostrado que la planta *Cacosmia rugosa* Kunth tiene propiedades beneficiosas para la salud, contando con evidencia en el tratamiento de la diarrea en animales y humanos (Ríos, 2007) siendo útil como medicamento para aliviar síntomas producidos por la diarrea.

En relación con las partes aéreas como hojas, tallos y flores de la *Cacosmia rugosa* se han aislado una mezcla de triterpenos, pero se desconoce presentes en mayor cantidad (Fernando Bohlmann a, 1980) en el mismo trabajo se menciona que especialmente las raíces poseen Sesquiterpenos lactónicos de tipo guianólidos presentando grupos hidroperóxidos como por ejemplo 8-acetil-1-deoxi-1 $\alpha$ -peroxi- rupicolin  $\beta$  y 1-desoxi-1 $\alpha$ -peroxi- rupicolin  $\beta$  que se encuentra en mayor cantidad, Algunos sesquiterpenos con grupo hidroperóxidos poseen propiedades inhibitoras de la adhesión celular y también demuestran actividad antiulcerosa. Además, los representantes individuales de hidroperóxidos de sesquiterpeno mostraron actividad antineoplásica y anti metastásica (Dembitsky, 2021). Dando a conocer que: las plantas con este tipo de compuestos son útiles en lo farmacológico, sin embargo, en la información encontrada si el tipo de sesquiterpeno se encuentra presente en los tallos de la *Cacosmia rugosa* Kunth es escasa.

Este Trabajo de Integración Curricular tiene como finalidad aportar más información sobre los Metabolitos Secundarios presentes en este género, especialmente sobre los compuestos presentes en los tallos de *Cacosmia rugosa* Kunth. Se establecieron objetivos como obtener el extracto etanólico de los tallos de la *Cacosmia rugosa* Kunth, realizar varios ensayos de tamizaje fitoquímico para la detención de metabolitos secundarios contenido en

el extracto y aislar por métodos cromatográficos y caracterizar mediante métodos espectroscópicos al menos un metabolito presente en el extracto. El trabajo de integración curricular se compone de tres capítulos como el marco teórico, que consta de información de la familia de la especie y investigaciones previas de la especie, la metodología la cual explica el procedimiento experimental para cumplir los objetivos y por último el análisis e interpretación de resultados se enfoca en los resultados de la parte experimental para la detección de los metabolitos primarios y secundarios, grupos funcionales y propuestas de como sería la estructura de la molécula aislada.

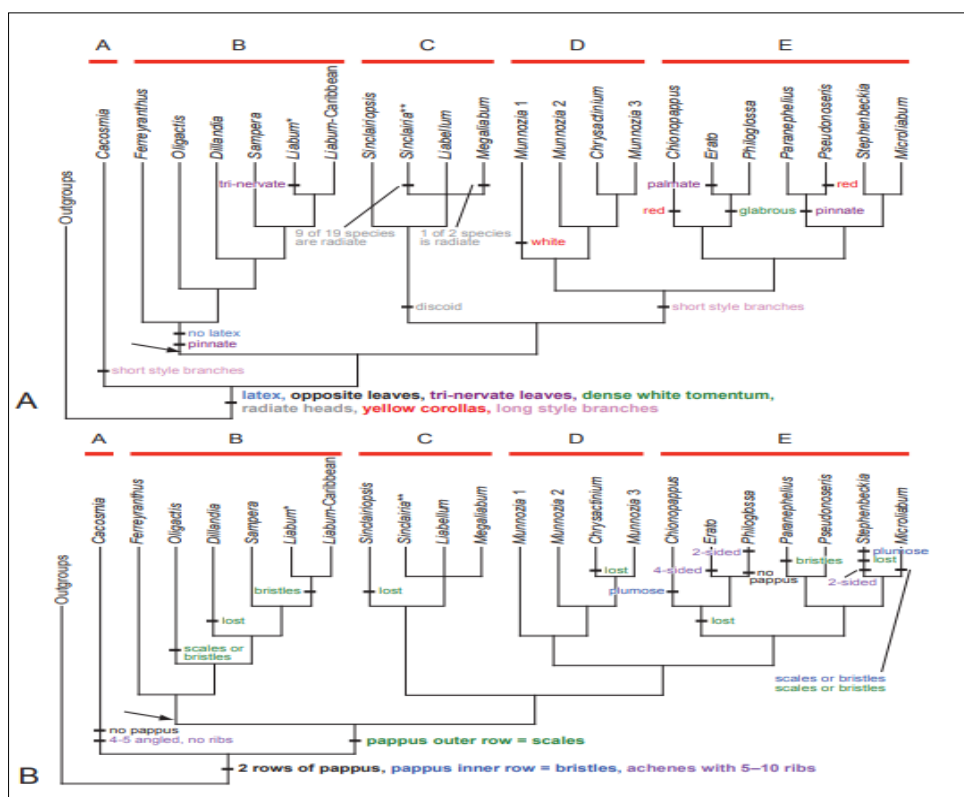
## Capítulo Uno

### Marco Teórico

Dentro de la diversa familia Asteraceae, existe la subfamilia Vernonioideae Lindl, que incluye la tribu Liabeae Rydb. Está compuesta por 4 subtribus (*Robinson T, 1983*) 18 géneros y aproximadamente 163 especies (*Alfonso Susanna, 2020*) como se muestra en la Figura 1.

**Figura 1**

*Posición filogenética del género Cacosmia Kunth en la tribu Liabeae Rydb*



*Nota:* Tomado de *posición filogenética del género Cacosmia Kunth en la tribu Liabeae Rydb* [Diagrama], por Vicki A. Funk, Carol Kelloff, Raymund Chan, 2018, Fuente (<https://doi.org/10.1002/tax.612013>). CC BY 2.0.

*Cacosmia rugosa* Kunth es la especie del género con mayor distribución, encontrándose en Ecuador en provincias como Azuay, Cañar, Chimborazo, Imbabura, Loja y Pichincha, así como en el norte del Perú.

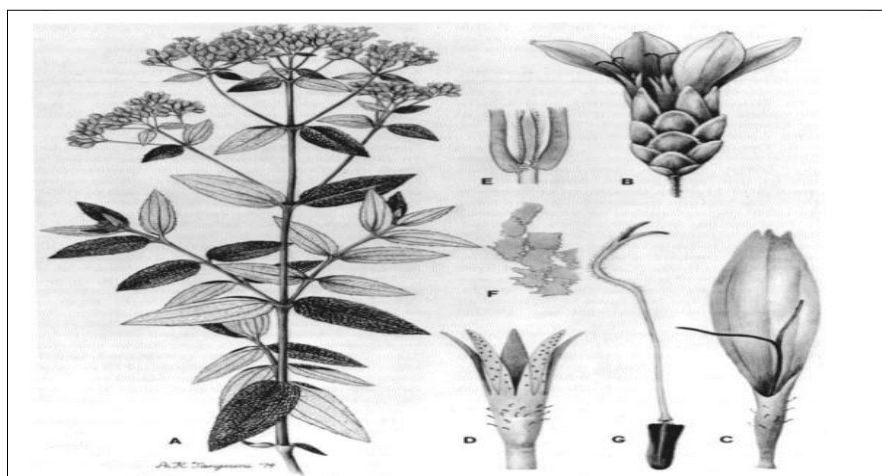
El Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador clasifica a *Cacosmia hieronymi* H. Rob. como una especie vulnerable, dando a conocer su presencia en las provincias de Azuay, Cañar y norte de Loja. De igual forma *Cacosmia harlingii* B. Nord. También se considera vulnerable y se presencia en las provincias como Azuay, Cañar y Loja. La posición filogenética del género *Cacosmia* Kunth dentro de la tribu Liabeae Rydb. es cuestionada y varía según el tipo de análisis de datos. Ubican a este género como el grupo hermano de todos los miembros de la tribu. Sin embargo, el análisis de máxima verosimilitud lo sitúa en la subtribu Liabinae Cass. ex Dumort, como grupo hermano del clado que incluye al resto de géneros (Diego G. Gutiérrez, 2020).

El género *Cacosmia* Kunth fue originalmente descrito por el botánico Karl Sigismund Kunth, en base a un espécimen de *Cacosmia rugosa* Kunth colectado en el páramo de Saraguro, entre Loja y Oña.

En el trabajo realizado por (Robinson T, 1983) se reportan tres especies aceptadas como: *Cacosmia rugosa* Kunth, *Cacosmia hieronymi* H. Rob. y *Cacosmia harlingii* B. Nord. y se proponen algunas claves taxonómicas para distinguirlas como se puede observar en la Figura 2 sobre la taxonomía de la *Cacosmia rugosa* Kunth.

### Figura 1

*Ilustración de Cacosmia rugosa Kunth*



Nota. Tomado de *Ilustración de Cacosmia rugosa Kunth* [Dibujos], por Robinson T, Harold E, 1983, Fuente (<https://bit.ly/43UKSLV>). CC BY 2.0.

En el trabajo realizado por (Fernando Bohlmann a, 1980) se muestra que se empleó una mezcla dietiléter: éter de petróleo 30-65°C a proporción 1:2 para la maceración de compuestos en raíces y partes aéreas.

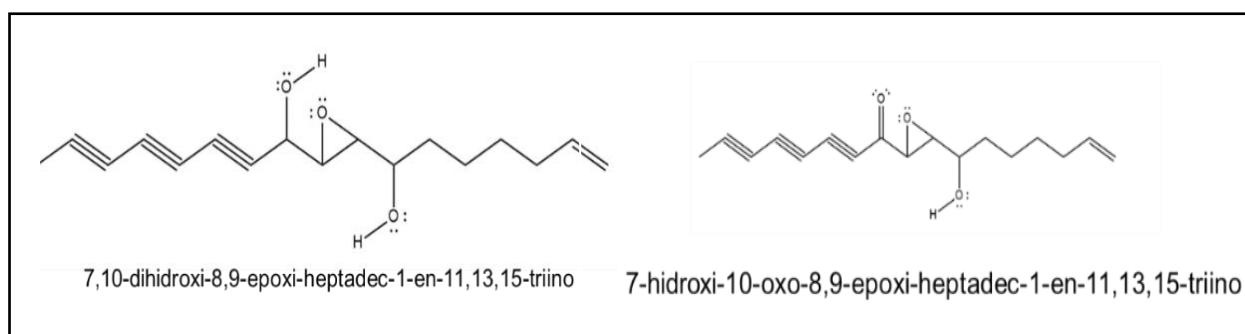
Los extractos de raíces y partes aéreas se separaron empleando Silica gel, Akt. St. 11 y varias veces Silica gel GF 254. La fase móvil estuvo compuesta de proporciones variadas de dietiléter: éter de petróleo 30-65°C y dietiléter: Metanol.

En el mismo orden, las raíces de *Cacosmia rugosa* Kunth se aislaron compuestos como terpenos acetilénicos conjugados como por ejemplo 7,10-dihidroxi-8,9-epoxi-heptadec-1-en-11,13,15-triino y 7-hidroxi-10-oxo-8,9-epoxi-heptadec-1-en-11,13,15-triino, en la figura 3 se muestra las estructuras químicas de los compuestos mencionados.

También se aislaron triterpenos de tipo lupano como por ejemplo lupeol acetato y sesquiterpenos lactónicos de tipo guianólidos como por ejemplo 8-acetil-1-deoxi-1 $\alpha$ -peroxi-rupicolin  $\beta$  y 1-desoxi-1 $\alpha$ -peroxi-rupicolin  $\beta$ , en la figura 4 y 5 se muestra las estructuras químicas de los compuestos mencionados para los triterpenos lupanos y sesquiterpenos lactónicos. De las partes aéreas como hojas, flores y tallos se aislaron una mezcla de triterpenos la cual no se continuó estudiando y se desconoce que tipos de compuestos están presentes (Fernando Bohlmann a, 1980).

## Figura 2

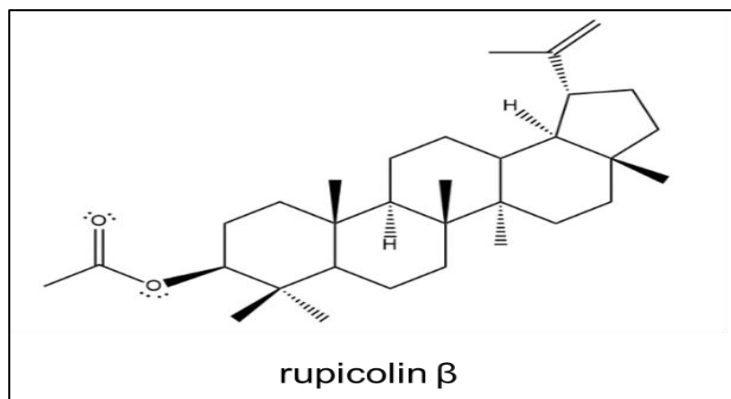
*Terpenos acetilénicos conjugados aislados de Cacosmia rugosa Kunth*



*Nota.* Adaptado de Terpenos acetilénicos conjugados aislados de *Cacosmia rugosa* Kunth [Imagen], por Ferdinand B, Karl H, Harold R, Robert M, 2001, Fuente ([https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87023-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87023-3)). CC BY 2.0.

**Figura 3**

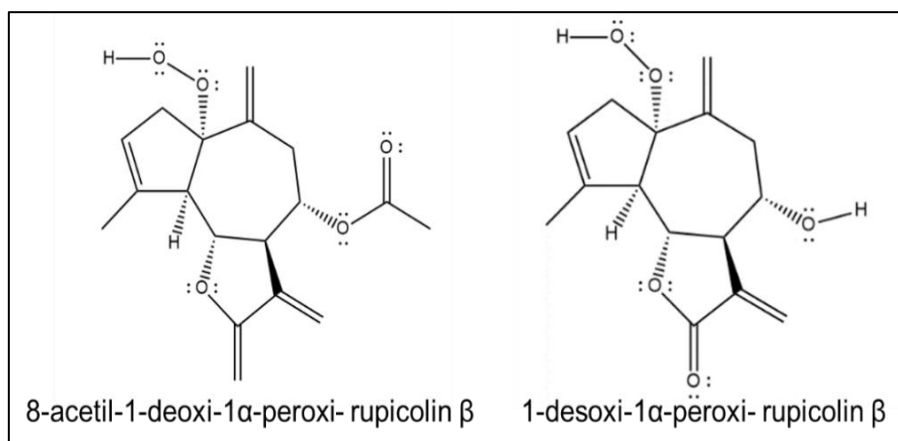
*Triterpenos de tipo lupano aislados de Cacosmia rugosa Kunth*



*Nota.* Adaptado de Triterpenos de tipo lupano aislados de *Cacosmia rugosa* Kunth [Imagen], por Ferdinand B, Karl H, Harold R, Robert M, 2001, Fuente ([https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87023-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87023-3)). CC BY 2.0.

**Figura 4**

*Sesquiterpenos lactónicos de tipo guianólidos con grupo hidropéroxido aislados de Cacosmia rugosa Kunth*



*Nota.* Adaptado de Triterpenos de tipo lupano aislados de *Cacosmia rugosa* Kunth [Imagen], por Ferdinand B, Karl H, Harold R, Robert M, 2001, Fuente ([https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87023-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87023-3)). CC BY 2.0.

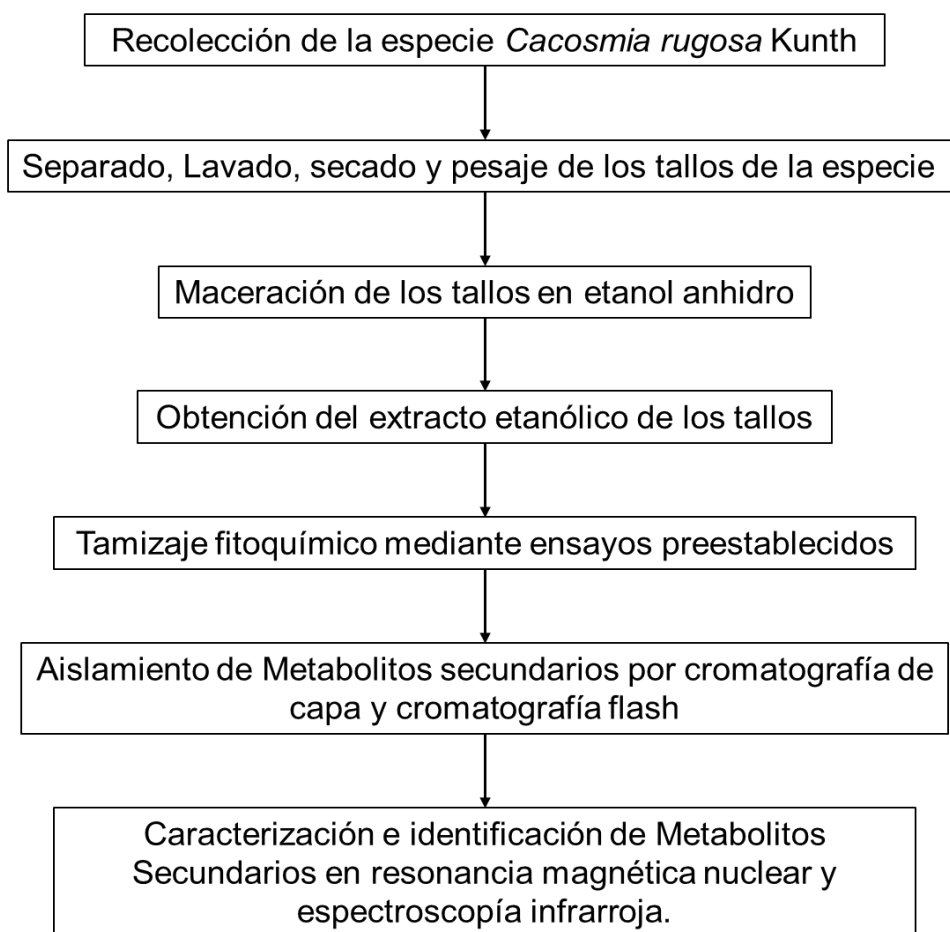
## Capítulo Dos

### Metodología

En la Figura 6 se muestra la metodología realizada en el trabajo de integración curricular.

**Figura 5**

*Diagrama de flujo de los métodos empleados en el TIC.*



El diagrama de flujo muestra un proceso con varios pasos para la parte experimental.

#### 2.1. Recolección de la planta *Cacosmia rugosa* Kunth

Dentro de este marco, cabe señalar que el lugar de recolección fue en el sector Villonaco en el 2 km al este de la ciudad, a 2100 m.s.n.m, con las siguientes coordenadas: 4°0'23.1"S, 79°15'24.8"W, obtenidas con ayuda de un GPS (Garmin, Edge 530, George Town, Inglaterra). Se identificó la ubicación de la planta y se recolectaron 2 kg de la muestra vegetal,

la cual contenía los tallos, hojas y raíces. Para la investigación, se trabajó únicamente con los tallos, los cuales fueron guardados en saquillos y transportados a la planta de Bioproductos ubicada en la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).

## **2.2 Lavado, secado, triturado y pesaje de los tallos**

Después, se transportaron las muestras vegetales al lavabo para limpiarlas, con el fin de eliminar residuos de tierra e insectos. Luego, se procedió a separar los tallos de las demás partes de la planta. Es necesario expresar que, por tratarse de un estudio centrado únicamente en los tallos de las plantas no se examinó a detalle las hojas y las flores. A continuación, se separaron los tallos, los cuales se trocearon con tijeras podadoras para reducir su tamaño a 1-2 cm. Acto seguido, se procedió a una trituración primaria de los tallos. Se distribuyeron en las bandejas del secador de bandejas (Lassele, DY-330H, Shenzhen, China), el tiempo de desecación fue de 48 horas a una temperatura de 40°C, con el fin de eliminar la humedad retenida en los tallos.

Una vez que los tallos se deshidrataron a un porcentaje de humedad del 15%, se procedió a realizar una trituración secundaria con la ayuda de un triturador de martillos Multiuso JK-700G - Motor 7 HP (Perú, Lima), con el objetivo de facilitar la transferencia de masa durante la maceración estática para la lixiviación de los compuestos de interés de los tallos sumergidos en etanol. El tamaño recomendado de partícula debía ser de 1 a 0.5 cm.

## **2.3 Maceración, filtración y almacenaje de los tallos**

Mediante el uso de un solvente polar como el etanol  $C_2H_5OH$  al 96% con un índice de polaridad de aproximadamente 4.3D, se realizó la maceración estática. Para ello, se utilizaron 2 bidones de vidrio con un volumen total de 4L. En cada bidón, se agregó 700 gramos de los tallos triturados y se sumergió etanol al 96% hasta alcanzar los 3L. Una vez que el etanol y los tallos triturados fueron colocados en los bidones, se dejó macerar estaticamente. Cada semana, se filtraba a vacío el etanol con lo extraído de cada bidón, utilizando un embudo Buchner grande, papel filtro y un matraz Kitasato de 4L conectado a una bomba de vacío.

Una vez que el etanol antiguo fue extraído en el matraz Kitasato, se almacenó en botellas de color ámbar de 4L para evitar reacciones con la luz, y se reemplazaba con 3L de etanol nuevo en cada bidón. Se realizaron 4 extracciones en total lo que sería una extracción por semana.

Por otra parte, realizadas las extracciones de los tallos de cada semana en las botellas ámbar, se concentró el extracto mediante la eliminación del solvente por destilación a baja presión, permitiendo que se evaporara más rápidamente. En este caso, se colocó 750 mL de solución en un balón de 1L para evitar desbordes, y se colocó en el rotavapor (Buchi, R-II, Flawil, Suecia). Se trabajó con las siguientes variables operacionales: presión de 0.7 atm, temperatura de 35°C y una velocidad de rotación de 7 rpm.

Así mismo, una vez eliminado el etanol de la solución, se obtuvieron los extractos secos. Con una espátula larga, se retiraron y se colocaron en un frasco Boeco de 500 mL para ser almacenados en la refrigeradora del laboratorio de fitoquímica UTPL a una temperatura de -9°C, con el fin de evitar el crecimiento de microorganismos.

## 2.4 Realización del Tamizaje fitoquímico preliminar

El tamizaje fitoquímico es un conjunto de pruebas cualitativas utilizadas para identificar la presencia de metabolitos secundarios en extractos vegetales. En la tabla 1 se muestran los 8 ensayos que se realizaron siguiendo la metodología de (De Subhash C. Mandal, 2015), los cuales sirvieron para determinar los metabolitos primarios y secundarios presentes en los tallos del extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth.

**Tabla 1**

*Ensayos realizados para el tamizaje fitoquímico*

Tipo de metabolito	Metabolito analizado	Ensayo
Primarios	Carbohidratos	Fehling
	Proteínas	Biuret
	Grasas	Sudan III

<b>Secundarios</b>	Alcaloides	Dragendorff
	Fenoles	Cloruro férrico
	Saponinas	Formación de espuma
	Flavonoides	Shinoda
	Quinonas	Bornträger
	Triterpenos y esteroides	Liebermann Burchard

*Nota.* Adaptado de Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications (p. 82), por De Subhash C. Mandal, Vivekananda Mandal, Anup Kumar Das, 2015, Editorial Academic press.

(<https://bit.ly/4kXp9ZO>)

Para los ensayos que requerían la muestra diluida, se realizó de la siguiente manera: diluyendo 20 mg de extracto etanólico seco en 5 ml de metanol en un vial de laboratorio.

#### **2.4.1 Determinación de carbohidratos**

Con respecto a la determinación de carbohidratos, Se extrajo 1 mL de la muestra diluida en un tubo de ensayo de 5mL y se agregaron alrededor de 3 gotas del reactivo de Fehling (que es la mezcla de Fehling A y Fehling B) con una pipeta Pasteur, luego se calentó la solución en baño María a 50°C durante 10 minutos, la aparición de un precipitado color rojo marrón que es indicativo de un resultado positivo y la presencia de azúcares reductores. El control positivo se usó glucosa 2mg en 5mL de agua para azucares reductores con una aparición de color de azul a rojo.

#### **2.4.2 Determinación de proteínas**

En cuanto a la determinación de proteínas, se tomó 1 mL de la muestra diluida en un tubo de ensayo, luego se agregó 1 mL del reactivo de Biuret en el tubo de ensayo, se agitó vigorosamente y se dejó reposar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente, la reacción se interpreta como positiva cuando la solución cambia su coloración de azul a violeta. Se utilizó como control positivo albumina de huevo de 2mg en 5mL en agua destilada.

### **2.4.3 Determinación de grasas**

Cabe expresar que, en la determinación de grasas se agregó 1ml de la muestra diluida en un tubo de ensayo para luego añadir 3 gotas del reactivo Sudan III, esta solución se calentó en baño maría hasta la evaporación total del disolvente, la presencia de compuestos grasos se considera positiva con la presencia de gotas de color rojo en el líquido o pegada en las paredes del tubo de ensayo. El control utilizado fue aceite vegetal.

### **2.4.4 Determinación de alcaloides**

Ahora, acerca de la determinación de alcaloides, se añadió 1 ml de la muestra diluida y 1 ml de solución de Dragendorff. La aparición de manchas de color café anaranjado indicaría un resultado positivo, utilizando *Huperzia Crassa* como control positivo.

### **2.4.5 Determinación de taninos**

Así mismo, en la determinación de taninos se agregó 1ml de la muestra diluida en un tubo de ensayo y se adicionó 3-4 gotas de la solución de hidróxido férrico al 5% en solución salina fisiológica. La aparición de un precipitado rojo-vino, azul-negro, verde o azul-verde indica la presencia de taninos. Se utilizo como control vainillina 1% en 2 mL.

Teniendo se tiene como referencia los siguientes resultados para determinar el tipo de tanino que se obtiene:

- Coloración rojo-vino compuestos fenólicos en general.
- Coloración verde intenso, tanino del tipo pirocatecólidos o condensados.
- Coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

### **2.4.6 Determinación de saponinas**

En cuanto a, determinación de saponinas, se sometió a ebullición 1ml de la muestra diluida a 40 °C luego en un tubo de ensayo, posteriormente se agregó 3 mL de agua destilada y se agito vigorosamente durante aproximadamente 10 minutos, la aparición de espuma en la superficie del líquido fue de más de 2 milímetros que persiste con el calentamiento por más

de alrededor de 2 minutos, se toma como evidencia de la presencia de saponinas. Se uso como control 20 mg de papa rallada en 5 ml de agua destilada se hirvió a 40 °C, luego se filtró, al filtrado, se añadió agua destilada y se agitó vigorosamente durante aproximadamente 10 minutos, hasta la aparición de espuma en la superficie del tubo de ensayo.

#### **2.4.7 Determinación de flavonoides**

De igual manera se tomó 1ml de la solución y agregó una porción de magnesio metálico y 1 ml de ácido clorhídrico de alta concentración en un tubo de ensayo, después de la reacción y transcurrir 5 minutos y luego 1ml de alcohol amílico, se dejó mezclar las fases hasta la separación de estas.

La aparición de una coloración roja o naranja indica la presencia de flavonoides, flavononas y xantonas. El control utilizado fue 2mg de Hesperidina en este caso como medicamento de la marca Daflon 1000 mg.

#### **2.4.8 Determinación de quinonas**

Se agregaron 1 ml de cloroformo y 1 ml de una solución al 5% de hidróxido de sodio en agua a 10 mg de extracto seco. Después de agitar y dejar reposar hasta que se separaron las fases, un cambio de color a rosado o rojo en la fase superior indicó la presencia de quinonas. Se utilizó hidroquinona como control positivo.

#### **2.4.9 Determinación de flavonoides**

De igual manera se tomó 1ml de la solución y agregó una porción de magnesio metálico y 1 ml de ácido clorhídrico de alta concentración en un tubo de ensayo, después de la reacción y transcurrir 5 minutos y luego 1ml de alcohol amílico, se dejó mezclar las fases hasta la separación de estas.

La aparición de una coloración roja o naranja indica la presencia de flavonoides, flavononas y xantonas. El control utilizado fue 2mg de Hesperidina en este caso como medicamento de la marca Daflon 1000 mg.

#### **2.4.10 Determinación de terpenos-esteroides.**

En relación con, la determinación de terpenos-esteroides se disolvió 10 mg del extracto seco etanólico con 1 ml de cloroformo en un tubo de ensayo, luego se adiciono 1ml de anhídrido acético y se agito hasta mezclar bien, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y por la pared del tubo de ensayo se dejó caer 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

El ensayo es positivo cuando hay formación de colores, rosa, verde, azul, naranja, etc. Es importante mencionar que para este ensayo se debe evitar el agua en el medio de reacción para que no interrumpa en la aparición de los colores. Se utilizo como control 2 mg de Argentatina B diluida en cloroformo.

#### **2.5 Caracterización por espectroscopia infrarroja.**

Para leer las señales de los compuestos presentes en la muestra de *Cacosmia rugosa* Kunth, se utilizó el espectrómetro de marca Nicolet™ iS™ 10 FT-IR (Massachusetts, USA), realizando previamente una prueba en blanco para evitar interferencias y que el análisis se a más preciso.

Se tomó aproximadamente 1 mg del extracto etanólico seco y se colocó en la lente del espectrómetro, teniendo cuidado de cubrir toda la superficie. Luego se tapó hasta completar la lectura, se retiró el extracto y se descargaron los datos. Se analizaron utilizando el software de espectroscopia Spectragryph 1.2. Se aplicó el mismo procedimiento al metabolito aislado, utilizando también 1 mg.

#### **2.6 Identificación de compuestos por cromatografía de capa fina:**

Se siguieron los procedimientos propuestos por (H.Wagner, 1984), en los cuales se recomendaba realizar ensayos preliminares con cromatografía de capa fina para identificar los solventes que permitieran la separación adecuada de la mezcla a estudiar.

Para los ensayos, se disolvieron 20 mg del extracto seco etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth en un vaso de precipitación con 5 mL de metanol. Se prepararon placas de 5cm

de largo y de 1cm de ancho. La combinación que permitió obtener un buen perfil cromatográfico de los diferentes compuestos fue de 3 mL de hexano grado reactivo y 1 mL de acetato de etilo grado reactivo.

## 2.7 Fraccionamiento de compuestos por cromatografía flash

Para, el fraccionamiento se pesaron 15 g del extracto etanólico de tallos, los cuales se disolvieron en 10 ml de metanol y se mezclaron con 15 g de sílica gel 60 de fase directa marca Merck KGaA, (Darmstadt, Germany) con un tamaño de partícula de 0,015-0,40 mm. Se preparó una columna de 1.2 m de altura tipo plastic+glass marca Büchi (Flawil, Suiza) para mejorar la elución de los compuestos, se relleno la columna con 285 g de sílica gel 60 de fase directa marca Merck KGaA, (Darmstadt, Germany) y en la parte superior de la columna se puso la mezcla de sílice con el extracto, una vez establecida las condiciones en el equipo Reveleris Automated Prep Büchi (Flawil, Suiza) la cual se muestra en la tabla 2 y puestos los solventes usados en la fase móvil que fueron hexano (A), acetato de etilo (B) y metanol (C) se procedió a hacer la corrida por 422.1 min, los gradientes de elución se muestran en la tabla 3.

**Tabla 2**

*Gradientes usados en la cromatografía flash*

<b>VARIABLE</b>	<b>CONDICIÓN</b>
Contenido de la columna	Silica gel genérica 300 g
Caudal	9 mL/min
Tiempo de calibración	15 min
Tiempo de corrida	422.1 min
Modo	Flash líquido
Umbral UV	0.1 AU
Sensibilidad UV	Alta
Longitud de onda UV 1	254 nm
Longitud de onda UV 2	365 nm
Longitud de onda UV 2	300 nm
Umbral ELSD	20 mV
Sensibilidad ELSD	Alta
Detección de pendiente	Alto

Estos datos fueron sometidos en el interfaz de métodos del equipo.

**Tabla 3***Gradientes de elución en la cromatografía flash*

Tiempo [min]	Solventes	% 2nd solvente
0.0	AB	0
3.2	AB	2
67.9	AB	2
0.1	AB	2
0.0	AB	2
66.0	AB	25
25.0	AB	50
60.0	AB	86
0.0	BC	0
60.0	BC	29
55.0	BC	42
75.0	BC	100
10.0	BC	100

Las letras indican el solvente, A) Hexano, B) Acetato de etilo, C) Metanol.

Se recolectaron las muestras separadas en tubos de ensayo, posteriormente cada separación se le realizó un análisis de cromatografía en capa fina para identificar el perfil cromatográfico. Las separaciones con características similares, observadas visualmente en la TLC, se combinaron para asegurar hacer fracciones con una composición uniforme. Finalmente, se almacenaron las fracciones para su análisis posterior.

## **2.8 Purificación de fracciones por cromatografía preparativa**

Se preparó una placa de cromatografía preparativa utilizando la fracción 3 que fue obtenida tras unir las separaciones 20-30. Se aplicó la fracción en la placa TLC Silica gel 60G F<sub>254</sub> de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) de 20 cm por 20 cm y la fase móvil usada fue de hexano: acetato de etilo 8:2. Para separar los compuestos se eluyó 2 veces utilizando la misma fase móvil. Los compuestos separados se observaron bajo luz ultravioleta a 254 nm lo que permitió raspar el compuesto con R<sub>f</sub> de 0.538 para así aislarlo, mediante lavado con cloroformo a la sílice raspada se pudo separar el metabolito para posteriormente filtrar y secar para almacenarlo en un vial.

## **2.9 Caracterización de compuestos por resonancia magnética nuclear.**

En cuanto al apartado enunciado, se usó el equipo Magnet System 500'54 Ascend ULH, serie MSC 10201 de BRUKER (Faellanden, Suiza), para la lectura de las señales de los protones presentes en el metabolito aislado de *Cacosmia rugosa* Kunth. La muestra fue disuelta en un disolvente adecuado, en este caso se utilizó  $\text{CDCl}_3$ , empleando el volumen mínimo necesario para asegurar una disolución completa, generalmente entre 1 mL de disolvente. El análisis de los espectros se realizó utilizando el software Topspin 4.4.1 de Bruker BioSpin (Rheinstetten, Alemania).

## Capítulo Tres

### Resultados y discusión

A partir de los 1.4 Kg de tallos secos se obtuvo 31.3 g de extracto etanólico, el rendimiento de obtención fue del 2.24% lo que evidencia un rendimiento menor a comparación con el rendimiento de 5.32% de la especie *Liabum hastifolium* (Ángela J. San Martín, Esther Villanueva, Arnold Tito Cruz, Desiderio Flores, Ruben D. Gomez, Giovanna R, Yonny R. Flores, 2012), esta especie pertenece a la misma tribu que *Cacosmia rugosa* Kunth que es la tribu Liabeae, en el estudio de la especie *Liabum hastifolium* utilizó la misma cantidad de material vegetal y el mismo solvente para la maceración, sin agitar el medio. A pesar de esto, las diferencias en los rendimientos que podrían deberse a la variabilidad entre las especies, aunque sean de la misma tribu. La razón que se usó esta referencia es debido a que no hubo investigaciones específicamente del rendimiento del extracto de *Cacosmia rugosa* Kunth.

De los 31.3 g obtenidos se tomó una cantidad de 20 mg para posteriormente diluirlo en 5 ml de metanol, de esta disolución se realizó el tamizaje fitoquímico la cual se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4**

*Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico*

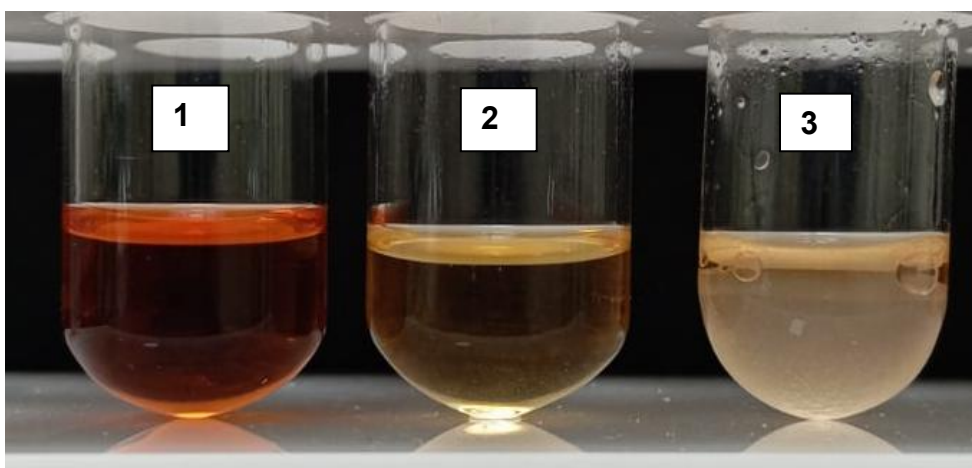
Metabolito	Tipo	Presencia
Grasas	Primario	-
Proteínas	Primario	-
Carbohidratos	Primario	++
Saponinas	Secundario	-
Flavonoides	Secundario	+
Quinonas	Secundario	+
Taninos condensados	Secundario	+++
Triterpenos y esteroides	Secundario	++
Alcaloides	Secundario	+

Se empleó un sistema de cruces la cual (+++) alta presencia, (++) media presencia, (+) baja presencia, (-) nula presencia.

El tamizaje fitoquímico mostró una leve presencia de carbohidratos y ausencia de grasas y proteínas. En los metabolitos secundarios se detectaron saponinas, flavonoides, quinonas y alcaloides en baja cantidad; triterpenos y esteroides en cantidad moderada; y taninos condensados en abundancia. Las figuras ilustran estos resultados según la metodología. En la Figura 7 se presentan los resultados del ensayo de Sudán, donde se evaluó la presencia de lípidos en las muestras analizadas. El orden de los tubos es el siguiente: (1) blanco, (2) aceite vegetal como control positivo y (3) extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth. En este último, no se observaron gotas rojas pegadas a las paredes del tubo, lo que indica un resultado negativo para la presencia de grasas.

**Figura 6**

*Ensayo de Sudan del extracto etanólico de Cacosmia rugosa Kunth*

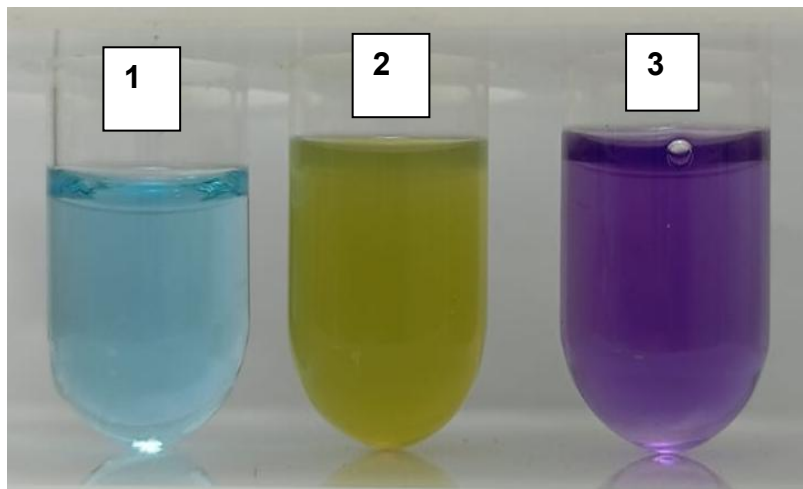


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Reactivo de Sudan III, (2) aceite vegetal, (3) extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth.

Para el extracto etanólico en el ensayo de Biuret dio resultado nulo de proteínas debido a la coloración amarillo verdoso indicando un resultado negativo, en los tubos se dio el siguiente orden para las muestras: (1) es el blanco, (2) contiene el extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth. (3) albúmina de huevo para el control positivo.

**Figura 7**

*Ensayo de Biuret del extracto etanólico de Cacoscia rugosa Kunth*

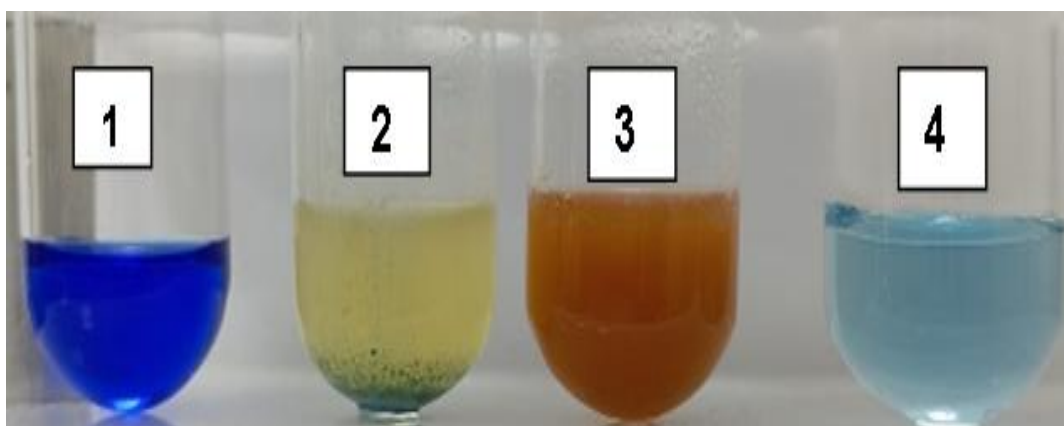


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Reactivo de Biuret (2) extracto etanólico *Cacoscia rugosa* Kunth, (3) albúmina de huevo.

La figura 9 presenta el ensayo de Fehling. Los tubos son: (1) blanco; (2) extracto etanólico de *Cacoscia rugosa*; (3) glucosa (control de azúcares reductores); y (4) sacarosa (control de azúcares no reductores). Se observó una leve presencia de azúcares no reductores, evidenciada por un precipitado azul verdoso.

**Figura 8**

*Ensayo de Fehling del extracto etanólico de Cacoscia rugosa Kunth*

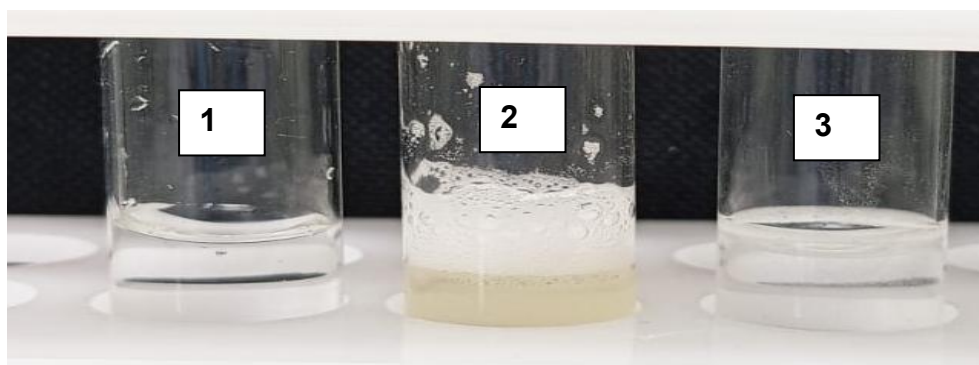


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Reactivo de Fehling, (2) extracto etanólico *Cacoscia rugosa* Kunth, (3) glucosa, (4) sacarosa.

La figura 10 muestra tres tubos: (1) blanco, (2) papa rallada como control positivo y (3) extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth. En el extracto se observa una leve presencia de saponinas, ya que no se formó tanta espuma como en el control.

### Figura 9

*Ensayo de formación de espuma del extracto etanólico de Cacosmia rugosa Kunth*

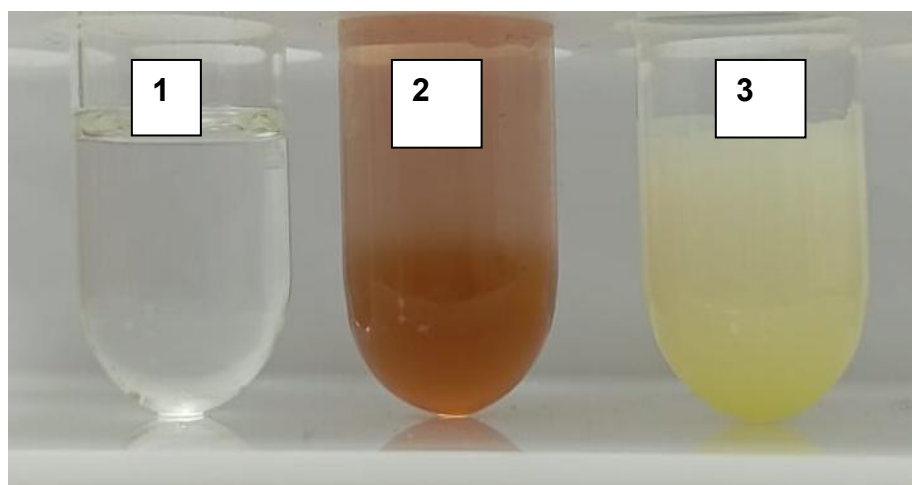


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Agua destilada, (2) papa rallada (3) extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth.

La figura 11 muestra los tubos de ensayo correspondientes a: (1) blanco; (2) extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth, (3) hesperidina como control positivo. El extracto presentó una coloración rojiza pálida a la prueba de Shinoda lo que muestra una leve presencia de flavonoides.

### Figura 10

*Ensayo de Shinoda espuma del extracto etanólico de Cacosmia rugosa Kunth*

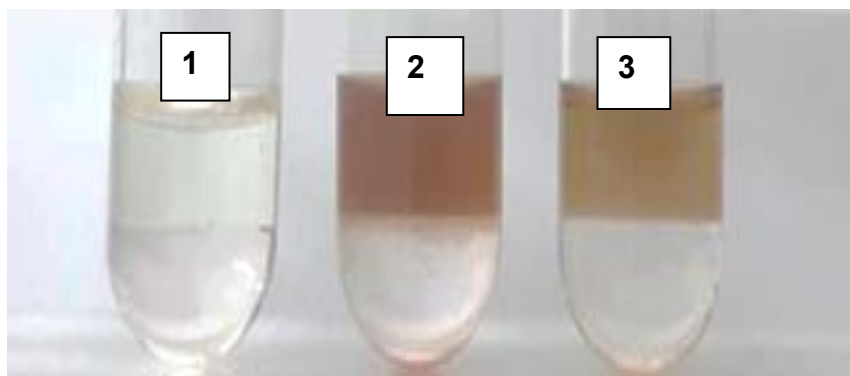


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Metanol, destilada, (2) extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth (3) hesperidina.

En el caso del extracto se observó una leve concentración de quinonas por el color marrón en el ensayo de Borntträgen. La Figura 12 muestra que el tubo 1, posee el blanco, el tubo 2 correspondiente al extracto etanólico y el tubo 3 contiene el control positivo hidroquinona.

**Figura 11**

*Ensayo de Borntträgen del extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth*

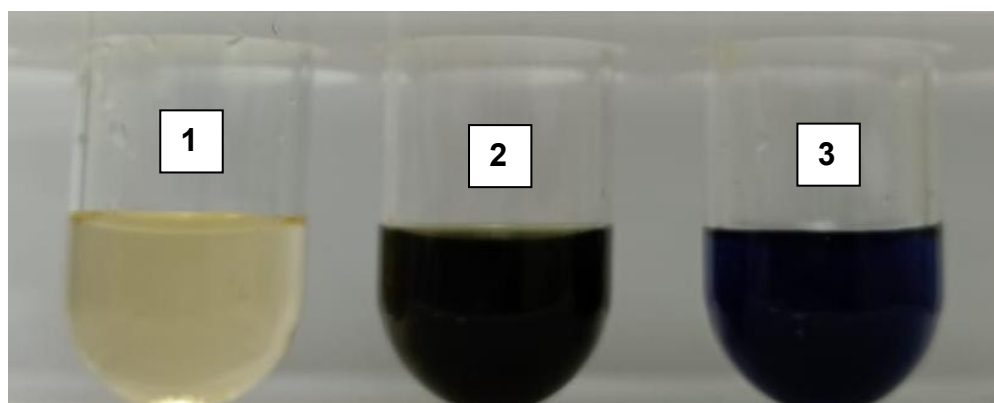


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Cloroformo, (2) extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth (3) hidroquinona.

En la figura 13 se muestra el ensayo de cloruro férrico la cual el siguiente orden se da así: (1) blanco; (2) extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth, (3) solución vainillina al 1% para el control positivo, se evidencio que posee alta presencia de taninos condensados.

**Figura 12**

*Ensayo de cloruro férrico del extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth*

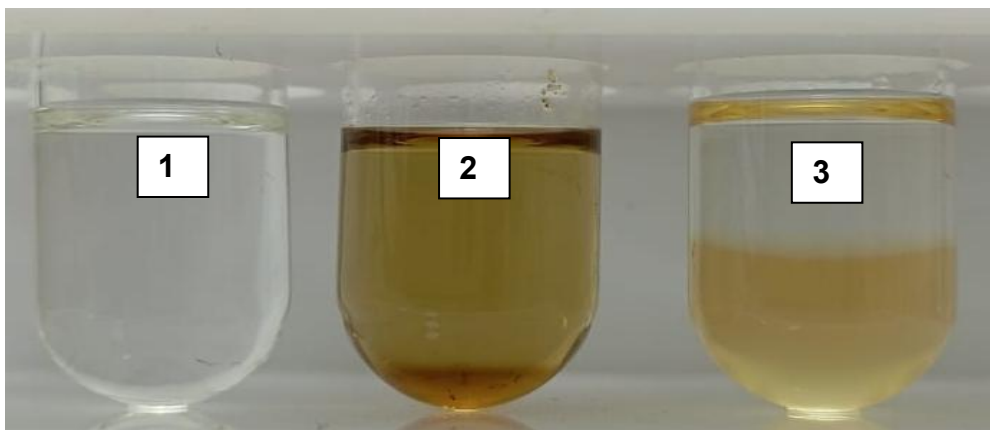


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Agua destilada (2) extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth (3) vainillina.

En la figura 14 se observa lo siguiente: (1) blanco; (2) extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth, (3) Argentatina B para control positivo. El extracto etanólico mostró una alta presencia de terpenos y esteroides, lo cual se evidenció por el cambio de color a marrón-rojo.

**Figura 13**

*Ensayo de Liebermann-Burchard del extracto etanólico de Cacosmia rugosa Kunth*



Muestras en los tubos de ensayo: (1) Cloroformo y anhídrido acético, (2) extracto etanólico *Cacosmia rugosa* Kunth (3) Argentatina B.

En la figura 15, el ensayo de Dragendorff mostró la leve presencia de alcaloides en el extracto etanólico debido a que se presentó una turbidez color amarillo marrón. Se observa lo siguiente: (1) blanco; (2) extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth, (3) alcaloide *H. crassa* para control positivo

**Figura 14**

*Ensayo de Dragendorff del extracto etanólico de Cacosmia rugosa Kunth*

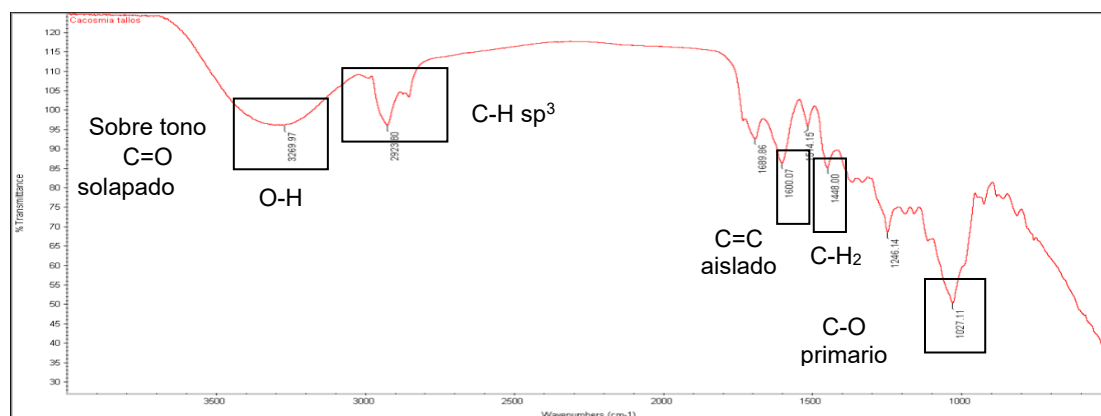


Muestras en los tubos de ensayo: (1) Cloroformo y anhídrido acético, (2) extracto etanolico *Cacosmia rugosa* Kunth (3) alcaloide *H. crassa*.

El extracto fue analizado mediante espectroscopía infrarroja IR para identificar los grupos funcionales principales y así compararlos con los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, el espectro IR de extracto se muestra en la figura 16.

**Figura 15**

*Resultado e identificación de bandas del espectro infrarrojo del extracto etanólico de tallos *Cacosmia rugosa* Kunth*



Es posible reconocer diversos grupos funcionales, lo cual está en concordancia con los resultados del tamizaje fitoquímico.

Los resultados obtenidos mediante espectroscopía infrarroja al extracto etanólico, se compararon con el tamizaje fitoquímico para identificar la relación entre el metabolito primario y los metabolitos secundarios entre los grupos funcionales detectados. Se observó una banda de la tensión de enlaces O-H a un número de onda de 3269.97  $\text{cm}^{-1}$  y una banda de tensión C-O a un número de onda de 1027.11  $\text{cm}^{-1}$ , la cual son características de alcoholes tipo primarios. Estas bandas son típicas de alcoholes terpénicos y esteroides con grupos hidroxilo, taninos condensados con grupos fenólicos, saponinas, enlaces glucosídicos, grupos hidroxilo O-H de los carbohidratos. Es posible que haya alquenos aislados debido a la tensión C=C a 1600.07  $\text{cm}^{-1}$ , sin presencia de tensión H-C=C, lo cual es característico de esteroides y taninos condensados. La intensidad de la banda C=O es baja, pero se detecta una banda de flexión de los carbonos vecinos con el carbono carbonílico C-C=O-C y también se observa un sobre tono C=O que se solapa con la banda OH, sugiriendo la presencia de un grupo cetona. La banda del enlace

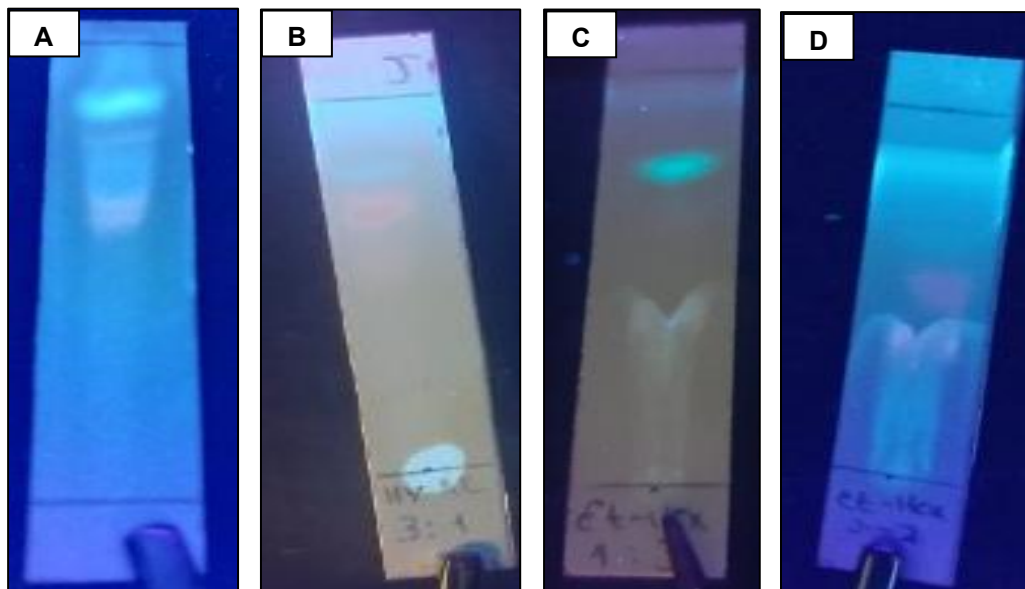
C=O se encuentra a un número de onda de  $1689.86\text{ cm}^{-1}$ , comparado con el número estándar para cetonas de  $1715\text{ cm}^{-1}$ , indicando una cetona con influencia de conjugación. La banda de flexión C-C=O-C se da a  $1246.14\text{ cm}^{-1}$ , características de esteroides y saponinas con grupos cetona y conjugación, quinonas, alcaloides y flavonoides

También se detectó la presencia de la banda de tensión H-C de carbonos  $\text{sp}^3$  para cicloalcanos, con una banda ancha a  $2923.80\text{ cm}^{-1}$  y también se dio una señal de flexión en tijera de metilenos  $\text{CH}_2$  a  $1448\text{ cm}^{-1}$ . Estos enlaces son característicos de terpenos, esteroides y saponinas.

Las pruebas hechas mediante cromatografía en capa fina preliminar se observó la separación de los compuestos en el extracto etanólico utilizando diferentes solventes, como hexano, acetato de etilo y metanol. Estas separaciones posibilitaron la obtención de perfiles cromatográficos con diferentes polaridades. En la figura 17 se muestran las polaridades adecuadas que se usaron para la elución de los compuestos en la cromatografía flash.

**Figura 16**

*Resultados de polaridades en placas de gel de sílice fase directa*



a) Hexano: Etanol 2:1, b) Hexano: Acetato de etilo 3:1, c) Etanol: Hexano 1:3, d) Etanol: Hexano 2:2.

Para separar los compuestos del extracto etanólico, se utilizó el equipo Reveleris Automated Prep Büchi (Flawil, Suiza), empleando los mismos solventes seleccionados de los ensayos en cromatografía en capa fina preliminar. Se realizaron gradientes de concentraciones para facilitar la elución de los compuestos a través de la fase estacionaria en la columna. El etanol fue reemplazado por metanol, que es ligeramente más polar.

La tabla 5 se presentan los resultados obtenidos, incluyendo los porcentajes promedio de cada solvente utilizado en las 94 separaciones, la presión promedio aplicada durante el proceso, los intervalos de tiempo empleados para recolectar los picos, y los colores visibles en la columna que fueron tomados al momento de la recolección.

**Tabla 5**

*Tabla de resultados de las polaridades, el tiempo de elución y la presión en la columna cromatográfica*

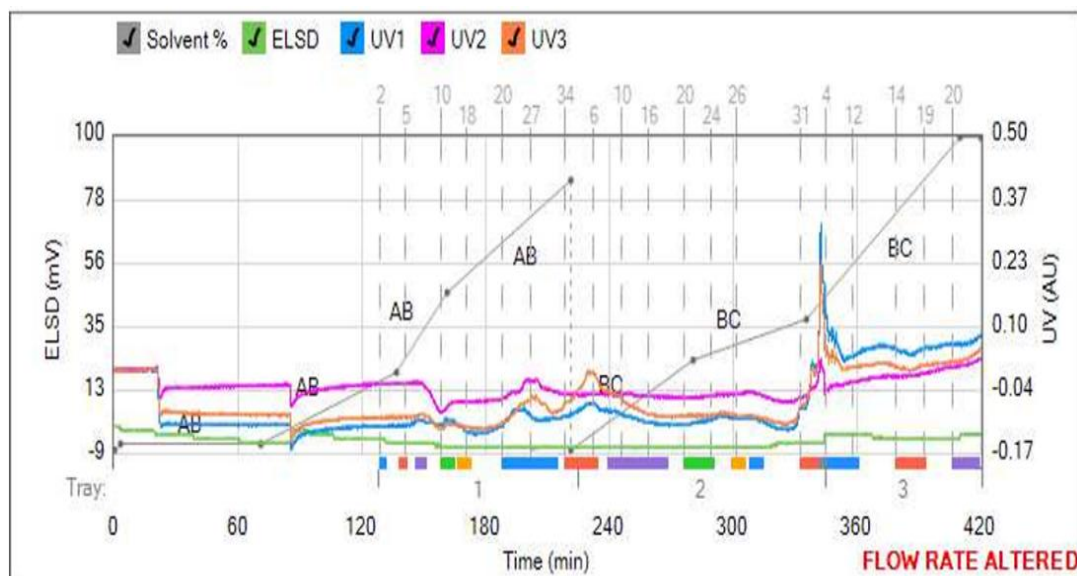
Grupos de tubos	Presiones promedio [psi]	Tiempo de elución [min]	Hexano promedio [%]	Acetato promedio [%]	Metanol promedio [%]
2 - 12	67.6	128.998 - 161.879	63.3	36.7	0.0
13 - 24	68.0	163.227 - 198.804	37.0	63.0	0.0
25 - 36	69.3	198.821 - 225.262	17.8	82.1	0.1
37 - 48	71.0	225.345 - 253.251	0.0	91.1	8.9
49 - 60	59.5	253.284 - 303.271	0.0	75.0	25.0
61 - 72	67.3	303.304 - 345.93	0.0	58.1	41.9
73 - 84	63.87	345.963 - 383.636	0.0	42.5	57.5
85 - 94	70.88	383.67 - 422.142	0.0	7.3	92.7

Desde el minuto 0 al 128,997 no se recolecto nada debido a que no se presenciaba picos ni colores visibles en la columna, los datos fueron extraídos del archivo Excel que nos fue proporcionado del mismo Reveleris.

De las 94 separaciones que fueron recolectadas según el tiempo de retención, las señales detectadas y los colores visibles que se podían ver en la columna, en la figura 18 se muestra el resultado de las señales detectadas y en la tabla 6 se presentan las separaciones que fueron combinadas debido a sus similitudes observadas en los ensayos de cromatografía en capa fina TLC, junto con sus respectivas apariencias visuales de las fracciones formadas.

Figura 17

Cromatograma del extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth



Longitudes de onda: UV1= 254 nm, UV2 =365 nm, UV3=30 nm. Señal de detección del ELSd= 20 mV.

Tabla 6

Resultado de las fracciones obtenidas, peso y apariencia

Unión de separaciones	Fracciones	Peso [mg]	Apariencia
2 -10	1	60.5	Goma suave amarillo-café
11 - 19	2	20.7	Solido suave oscuro
20 - 30	3	30.2	Solido seco blanco
31 - 39	4	83.1	Goma viscosa verde oscuro
40 - 58	5	150.7	Goma muy viscosa verde
59 - 69	6	305.6	Goma granulada viscosa café oscuro
70 - 81	7	567.8	Goma viscosa café amarillento
82 - 94	8	668.6	Goma muy viscosa café amarillento

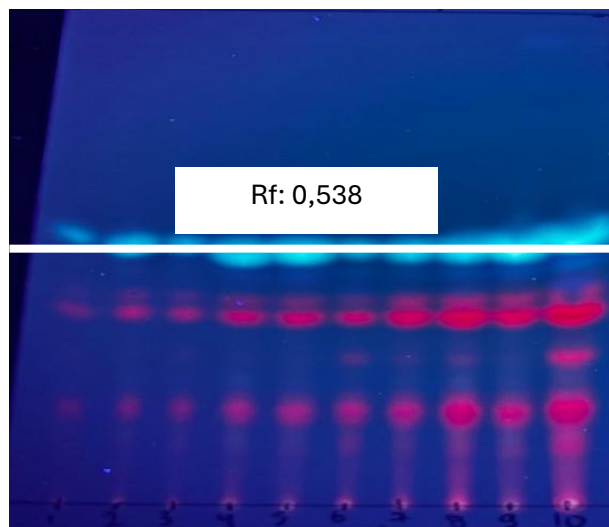
Las separaciones se agruparon al identificar similitudes visuales en los resultados obtenidos a través de la cromatografía en capa fina.

Las separaciones del 20 al 30 fueron seleccionadas para su estudio debido a la formación de polvo blanco en el fondo de los tubos de ensayo. Se realizó un ensayo de cromatografía en capa fina con las separaciones 20 a 30, como se muestra en la figura 19, y

se identificó un compuesto de color celeste con un factor de retención de 0.538. Por este motivo, las separaciones 20 a 30 fueron combinadas en una sola fracción llamada fracción 3.

**Figura 18**

*Placa TLC de las separaciones 20 al 30*

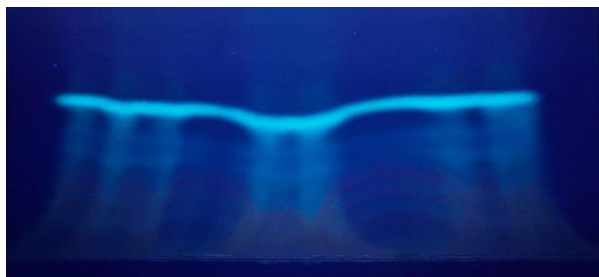


La polaridad usada fue hexano-acetato de etilo en proporción 8:2.

A partir de la fracción 3, que correspondió a la unión de las separaciones 20 y 30, se realizó 2 veces cromatografía preparativa para la extracción del compuesto con un Rf de 0.5838 con una fase móvil de hexano-acetato de etilo en proporción 8:2. En la figura 20 se muestra cómo apareció la cromatografía preparativa.

**Figura 19**

*Placa preparativa de la fracción 3*

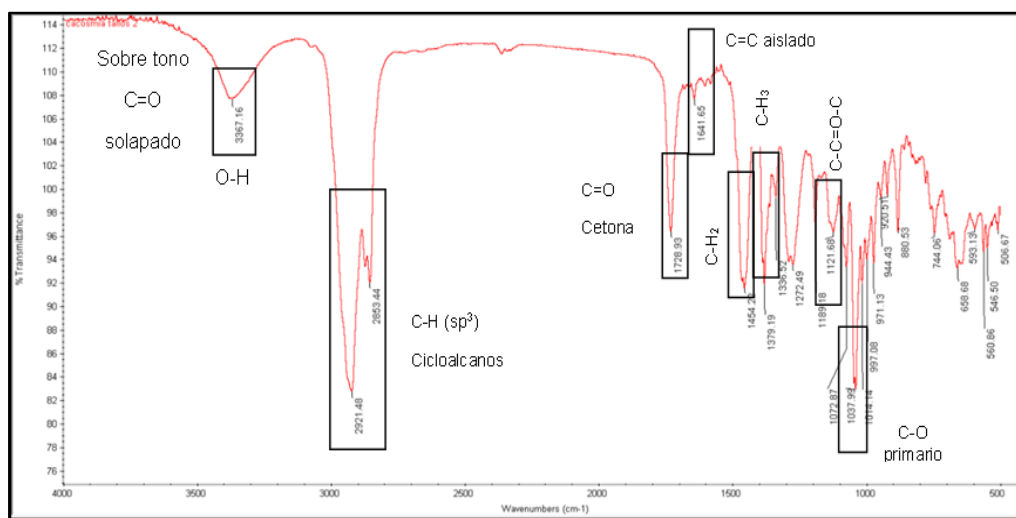


La polaridad usada fue hexano-acetato de etilo en proporción 8:2.

Una vez separado y purificado el compuesto con un factor de retención de 0.538, se disolvió fácilmente en cloroformo. Se obtuvieron 2.6 mg de la fracción 3, la cual fue analizada mediante RMN  $^1\text{H}$ . En la figura 21 se muestra el espectro IR de la muestra enviada, y en la figura 22 se presenta el espectro RMN  $^1\text{H}$ .

**Figura 20**

*Resultado e identificación de bandas del espectro infrarrojo de la fracción 3*



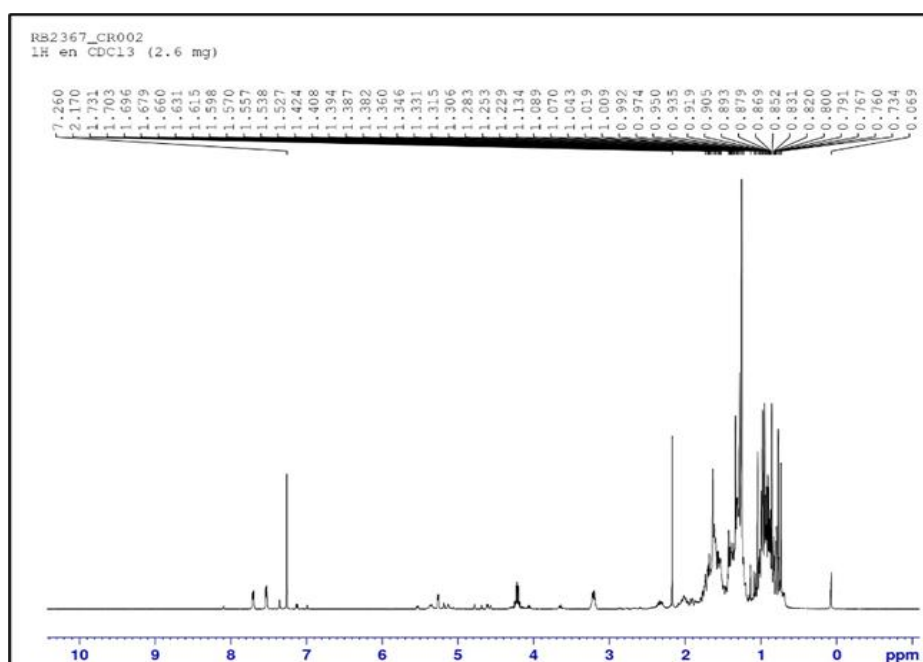
El análisis se realizó con la fracción 3 en fase sólida.

El análisis por espectroscopia por infrarrojos IR de la muestra reveló la presencia de grupo hidroxilo, fue identificado por una banda característica de estiramiento O-H a 3367.16 cm<sup>-1</sup>. La banda de estiramiento de C-O se dio a los 1037.99 cm<sup>-1</sup> que confirmó que se trata de un alcohol primario.

Las bandas de tensión de enlaces C-H correspondientes a carbonos sp<sup>3</sup> presentes en cicloalcanos fueron detectados a 2924.48 cm<sup>-1</sup>, mientras que la banda de flexión de los enlaces C-H<sub>2</sub> metilenos aparecieron a 1454.22 cm<sup>-1</sup> y las de los metilos C-H<sub>3</sub> a 1379.19 cm<sup>-1</sup>. Además, el grupo cetona C=O se mostró en 1728.93 cm<sup>-1</sup> lo que es una cetona que no está conjugada y el sobre tono C=O se solapa con la señal del O-H por lo que no se puede diferenciar y el enlace de flexión C-C=O-C se da a un numero de onda de 1121.68 cm<sup>-1</sup>. Finalmente, un dieno aislado C=C y tetra sustituido se manifestó con una banda de estiramiento característica en 1641.65 cm<sup>-1</sup> y no hubo la presencia de tensión de H-C=C.

Figura 21

Resultado RMN  $^1\text{H}$  de la fracción 3



La fracción 3 fue disuelto en  $\text{CDCl}_3$ .

El análisis del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  reveló los siguientes resultados: en el rango de desplazamientos químicos de 8.1 a 7 ppm se identificaron señales asociadas a impurezas presentes en la muestra, mientras que la señal en 7.26 ppm corresponde al residuo del solvente  $\text{CDCl}_3$ . Las señales se encuentran en campo alto del espectro lo que nos da entender que son protones blindados, la cual los efectos inductivos y efectos de Anisotropía Magnética no afectan mucho a des blindar el protón Las señales 4.22 ppm y 3.21 ppm se detectaron señales atribuibles a protones pertenecientes a grupos hidroxilos, lo cual concuerda con los datos obtenidos del espectro IR, que confirman la presencia de alcoholes en lugar de ésteres.

En el desplazamiento 1.67 se presenta protones de metilo en posición beta al grupo cetona, la señal 1.61 ppm y 1.58 ppm se identificaron hidrógenos alílicos relacionados a un doble enlace de tipo tetra sustituido. En los desplazamientos de 1.53 ppm y 1.42 ppm se registraron señales de protones que se encuentran enlazados a carbonos de tipo terciarios, mientras que en el intervalo de 1.37 a 1.22 ppm se da protones enlazados a carbonos de tipo

secundarios. Finalmente, en el rango de 0.92 a 0.72 ppm se detectaron señales correspondientes a hidrógenos enlazados a carbonos de tipo primarios o en un ambiente de metilo. En la tabla 7 se muestra los desplazamientos químicos, integral, multiplicidad, constantes de acoplamiento y en el entorno químico de cada piso obtenido en el RMN  $^1\text{H}$ .

**Tabla 7**

*Señales del espectro de la fracción 3*

$\delta$ [ppm]	$\int$	Multiplicidad	J [Hz]	Entorno químico
4.22	0.89	m	5.93, 10.95, 10.90, 10.90	Protones de OH
3.21	0.84	dd	5.18, 11.22	Protones de OH
1.67	4.21	m	-	Protones de metilo $\beta$ a C=O
1.61	1.93	m	-	Protones alílicos C=C
1.68	1.87	m	-	Protones alílicos C=C
1.53	0.88	s	-	Protones de -CH
1.42	1.16	m	-	Protones de -CH
1.37	1.24	t	-	Protones de -CH <sub>2</sub>
1.33	1.13	s	-	Protones de -CH <sub>2</sub>
1.3	2.97	d	16.46	Protones de -CH <sub>2</sub>
1.28	8.14	s	-	Protones de -CH <sub>2</sub>
1.25	4.54	s	-	Protones de -CH <sub>2</sub>
1.22	0.7	m	-	Protones de -CH <sub>2</sub>
0.92	21.08	m	-	Protones de -CH <sub>3</sub>
0.76	1.97	d	4.14	Protones de -CH <sub>3</sub>
0.72	2.02	m	-	Protones de -CH <sub>3</sub>

singlete: s; doblete: d; triplete: t; multiplete: m.

La Tabla 8 muestra los resultados correspondientes a los desplazamientos químicos y las multiplicidades de las señales observadas, comparándolos con los valores de desplazamiento y multiplicidad de moléculas como  $\beta$ -Stigmasterol de la planta *Lychnophora markgravii* (Fabiana Terezinha Sartori, Ana Claudia Barrachi, Costa Sacilotto, Joao Luis Callegari Lopes, Norberto, Walter Vichnewski, 2002) y la molécula (3S,5R,8R,9S,10S,13S,14S,16S,17S)-3,16-dihidroxi-17-((S)-3-hidroxi-3-((2R,3R)-2-

isopropil-3-metil oxiran-2-il)propil)-10,13-dimetilhex decahidro-7H-ciclopenta[a]fenantren-7-ona de la especie *Vernonia kotschyana* (Nadine Tseme Wandji, Gabin Thierry M. Bitchagno, Isabelle Mawabo Kamga, Joseph Tchamgoue, Celine Nguéfeu Nkenfou, Bruno Ndjakou Lenta, Norbert Sewald, Fogue Kouam., 2023), estas dos especies pertenecen a la familia de la Asteraceae, la misma familia de *la Cacosmia rugosa* Kunth. No se dispuso de suficiente cantidad para realizar el ensayo de RMN <sup>13</sup>C para poder también comparar con estos datos, sin embargo, se hipotetizó que la estructura podría corresponder a un tipo de esteroide debido al grupo alquilo de cicloalcanos que fue identificados en el análisis RMN e IR y que el compuesto presente grupos hidroxilos de alcoholes primarios y cetonas.

**Tabla 8**

*Comparación de los desplazamientos*

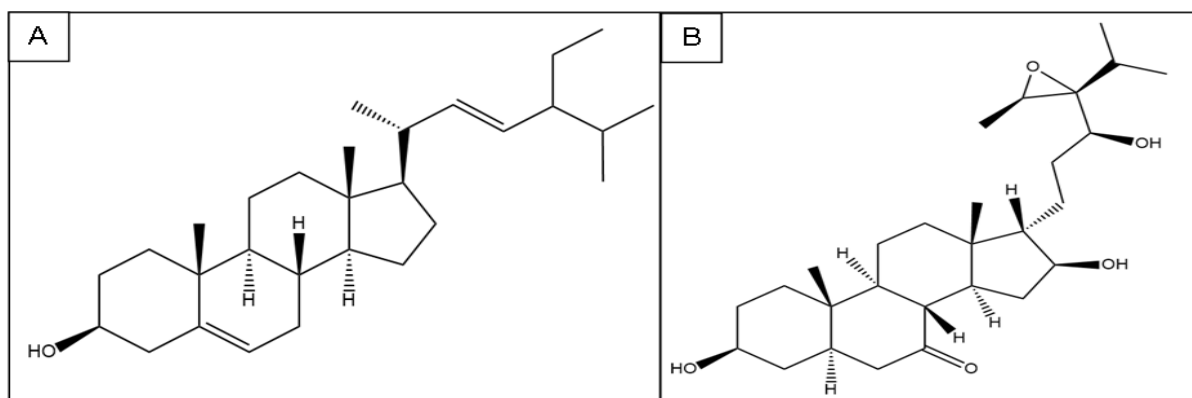
$\delta$ [ppm] Fracción 3	Multiplicidad Fracción 3	$\delta$ [ppm] y m Referencia 1	Multiplicidad Referencia 1	$\delta$ [ppm] y m Referencia 2	Multiplicidad Referencia 2
4.22	qd	4.96	m	4.28	dd
3.21	dd	3.51	t	3.51	q
1.67	m	-	m	1.69	m
1.61	m	1.85	m	1.76	m
1.68	m	1.69	t	1.70	m
1.53	s	1.65	s	1.50	m
1.42	m	1.62	td	1.45	m
1.37	t	1.61	d	1.37	d
1.33	s	1.58	s	1.27	d
1.3	d	-	-	-	-
1.28	s	-	-	-	-
1.25	s	1.33	s	-	-
1.22	m	1.28	m	1.14	d
0.72	m	-	-	-	-

Se analizo los desplazamientos químicos más parecidos a la molécula  $\beta$ -Stigmasterol y al (3S,5R,8R,9S,10S,13S,14S,16S,17S)-3,16-dihidroxi-17-((S)-3-hidroxi-3-((2R,3R)-2-isopropil-3-metiloxiran-2-il)propil)-10,13-dimetilhex decahidro-7H-ciclopenta[a]fenantren-7-ona.

Las moléculas de referencia,  $\beta$ -Stigmasterol y la otra, podrían compartir estructuras con la molécula obtenida. Sin embargo,  $\beta$ -Stigmasterol carece de grupo carbonilo y la otra posee un grupo epóxido, lo que puede afectar los desplazamientos químicos observados. La Figura 23 muestra la estructura de la molécula de referencia.

**Figura 22**

*Estructuras químicas de las moléculas A y B utilizadas de referencia en el estudio*



*Nota.* Molécula A:  $\beta$ -Stigmasterol, Molécula B: (3S,5R,8R,9S,10S,13S,14S,16S,17S)-3,16-dihidroxi-17-((S)-3-hidroxi-3-((2R,3R)-2-isopropil-3-metiloxiran-2-il)propil)-10,13-dimetilhexdecahidro-7H-ciclopenta [a] fenantren-7-ona. Adaptado de *Phytochemical study of Lychnophora markgravii (Asteraceae)* [Imágenes], por Fabiana Sartori, Ana Barrachi, Costa Sacilotto, Joao Callegari Lopes, Norberto, Walter Vichnewski, 2002, Fuente ([https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00127-2)) .CC BY 2.0.

## Conclusiones

El rendimiento del extracto etanólico obtenido a partir de los tallos secos de *Cacosmia rugosa* Kunth fue del 2.24%, menor que el 5.32% obtenido de *Liabum hastifolium*, a pesar de pertenecer a la misma tribu y utilizar métodos similares. Esta diferencia en los rendimientos puede atribuirse a la variabilidad entre las especies.

En el tamizaje fitoquímico realizado sobre el extracto etanólico de los tallos de *Cacosmia rugosa* Kunth reveló mayor abundancia de metabolitos secundarios, incluyendo taninos condensados, terpenos, esteroides, flavonoides y quinonas, mientras que las saponinas y alcaloides se detectaron en menor presencia. Estos hallazgos aportan información sobre la composición química que posee la especie.

La separación mediante cromatografía flash resultó en 94 separaciones de las cuales se unieron en 8 fracciones del extracto etanólico de *Cacosmia rugosa* Kunth. Estas fracciones se analizaron posteriormente utilizando cromatografía en capa fina. De la fracción 3 se logró separar y purificar mediante cromatografía preparativa un compuesto con un factor de retención de 0.538 con una fase móvil de hexano-acetato de etilo en proporción 8:2 obteniendo 2.6 mg de muestra en total, la cual fue analizada mediante espectroscopía IR y RMN <sup>1</sup>H. Los resultados del análisis IR confirmaron la presencia de un grupo hidroxilo asociado al alcohol primario y así mismo como la detección de grupo carbonilo C=O y un doble enlace tetra sustituido C=C. El análisis de RMN <sup>1</sup>H confirmó la presencia de alcoholes lo cual se descartó la presencia de ésteres, se identificó señales características de hidrógenos en diversas posiciones, incluyendo hidrógenos  $\alpha$  respecto al carbonilo y alílicos asociados al doble enlace.

Al comparar los resultados de los desplazamientos químicos y las multiplicidades de las señales observadas con los valores de las moléculas  $\beta$ -stigmasterol y (3S,5R,8R,9S,10S,13S,14S,16S,17S)-3,16-dihidroxi-17-((S)-3-hidroxi-3-((2R,3R)-2-isopropil-3-metiloxiran-2-il)propil)-10,13-dimetilhexadecahidro-7H-ciclopenta [a] fenantren-7-ona, se puede concluir que la molécula estudiada podría compartir varias características

estructurales con estas referencias. Sin embargo, la falta de un grupo carbonilo en el  $\beta$ -stigmasterol y la presencia de un grupo epóxido en la otra molécula de referencia son diferencias significativas que podrían influir en los desplazamientos químicos observados. A pesar de no tener suficiente cantidad para realizar el ensayo de RMN  $^{13}\text{C}$ , se hipotetiza que la estructura de la molécula estudiada podría corresponder a un tipo de esteroide con grupos OH y cetonas. Estas diferencias estructurales deben considerarse al interpretar los resultados y formular hipótesis sobre la estructura de la molécula en estudio.

### **Recomendaciones**

Se aconseja aumentar la cantidad de tallos para mejorar el rendimiento del extracto. Esto garantiza que haya suficiente muestra para la separación de compuestos y así realizar el análisis de resonancia magnética de  $^{13}\text{C}$  y utilizar el espectrómetro de masas para determinar el peso molecular de la muestra, facilitando así la elucidación de la estructura del compuesto.

## Referencias

- Alfonso Susanna, B. G.-J. (16 de Julio de 2020). The classification of the Compositae: A tribute to Vicki Ann Funk (1947–2019). (D. C. Albach, Ed.) *Taxon*, 69(4), 807-814. doi:<https://doi.org/10.1002/tax.12235>
- Ángela J. San Martín, Esther Villanueva, Arnold Tito Cruz, Desiderio Flores, Ruben D. Gomez, Giovanna R, Yonny R. Flores. (2012). *Estudio Fitoquímico Y Espectroscópico Preliminar De Cinco Plantas Medicinales De Carmen Pampa (Coroico) Bolivia*. San Andres: Revista Boliviana De Química. doi:<https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339678001.pdf>
- De Aimé Bonpland, A. v. (1815). *Nova genera et species plantarum, Volúmenes 1-2*. (J. C. Weinheim, Ed.) J. Cramer Weinheim. Recuperado el 12 de Abril de 2024, de <https://bit.ly/3XVr0V8>
- De Subhash C. Mandal, V. M. (2015). *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications* (3 ed., Vol. 3). London: Academic press. Recuperado el 12 de abril de 2024, de <https://bit.ly/4kXp9ZO>
- Dembitsky, V. M. (20 de enero de 2021). Antiprotozoal and Antitumor Activity of Natural Polycyclic Endoperoxides: Origin, Structures and Biological Activity. *Molecules*, 26(3), 686. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26030686>
- Desai, S. (2014). *Isolation of quercetin-3-O-β-D-glucoside from Azadirachta indica*. ResearchGate. doi:[https://www.researchgate.net/figure/Mass-spectrum-of-isolated-quercetin-3-O-b-D-glucoside\\_fig4\\_304238275](https://www.researchgate.net/figure/Mass-spectrum-of-isolated-quercetin-3-O-b-D-glucoside_fig4_304238275)
- Diego G. Gutiérrez, N. G.-J. (17 de Febrero de 2020). Morphological and molecular analyses of South American *Microliabum* (Compositae, Liabaeae, Paranepheliinae) and reinstatement of *Austroliabum*. (M. v. Balthazar, Ed.) *Taxon*, 68(6), 1219-1257. doi:<https://doi.org/10.1002/tax.12182>

Eduarda Vieira Silva, Mariane Bosenbecker, Taís Polleti, André Luis Missio, Amanda Dantas Oliveira. (2022). *Caracterização de taninos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a potencial aplicação em materiais*. Pelotas: UFPEL. Obtenido de <https://bit.ly/41qFwVW>

Fabiana Terezinha Sartori, Ana Claudia Barrachi, Costa Sacilotto, Joao Luis Callegari Lopes, Norberto, Walter Vichnewski. (2002). Phytochemical study of *Lychnophora markgravi* (Asteraceae). *Pergamon*, 609-612. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00127-2)

Ferdinand Bohlmann a, K.-H. K. (11 de Mayo de 2001). Neue guaianolide aus *Cacosmia rugosa*. (K.-H. K. Ferdinand Bohlmann a, Ed.) *Phytochemistry*, 19(4), 599-602. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87023-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87023-3)

Ferdinand Bohlmann, M. G. (28 de Julio de 1976). Inhaltsstoffe der Liabum-gruppe. *Phytochemistry*, 16(2), 285-286. doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86808-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86808-9)

Fernando Bohlmann a, K.-H. K. (10 de Junio de 1980). Neue guaianolide aus *Cacosmia rugosa*. *Phytochemistry*, 19(4), 599-602. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)87023-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)87023-3)

H.Wagner, S. B. (1984). *Plant Drug Analysis*. Berlin: Institut für Pharmazeutische Biologie. Obtenido de <https://bit.ly/4bAUyx1>

Igor Iván Villalta Sorto , Martha Alicia Argueta Castro. (2018). *Estudio De Plantas Alimenticias, Consumidas Por La Población De El Salvador (Fase Iv)*. Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer Facultad Química y Farmacia, Departamento del Jardín Botánico. San Salvador: Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer Facultad Química y Farmacia. doi:<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/02/1359038/masferrer-investiga-diciembre-2018-ano-8-vol-4-paginas-2-15.pdf>

Jakupovic, J., Schuster, A., Bohlmann, F., & Dillon, M. O. (1988). Lumiyomogin, ferreyrantholide, fruticolide and other sesquiterpene lactones from *Ferreyranthus*

fruticosus. *Phytochemistry*, 1113-1120. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80285-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80285-1)

Mayren de la Cruz Frías, Eugenio Torres Rodríguez, José Ángel Morales, Robinson Hermosilla Espinosa, René Hernández González. (2016). Identificación de metabolitos secundarios de Anredera vesicaria (Yuca hiedra). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, :215-222 . Obtenido de <https://bit.ly/4kXKRwG>

Michael O. Dillon, V. A. (2009). *Liabeae. [version pdf]* (1 ed., Vol. 1). Barcelona: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Recuperado el 12 de abril de 2024, de [https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/12929/bot\\_2009\\_pr\\_Dillon\\_etal\\_Liabeae.pdf](https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/12929/bot_2009_pr_Dillon_etal_Liabeae.pdf)

Nadine Tseme Wandji, Gabin Thierry M. Bitchagno , Isabelle Mawabo Kamga , Joseph Tchamgoue, Celine Nguéfeu Nkenfou, Bruno Ndjakou Lenta , Norbert Sewald, Simeon Fogue Kouam. (2023). Polyoxygenated Stigmastane-Type Steroids from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. and Their Chemophenetic Significance. *Molecules*, 77. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules28135278>

Petacci, F, Tavares, W.S, Freitas, S.S, Teles, A.M., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. (2012). Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the Asteraceae weeds from Diamantina,. *Planta Daninha*, 30(1), 9-15. doi:<https://www.scielo.br/ij/pd/a/G5cP63twbJpxCdSFVkrNMWg/?lang=en&format=pdf>

Ríos, M. K. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas/Useful plants of Ecuador: Applications, challenges, and perspectives. [version pdf]* (1 ed., Vol. 1). (M. J. Monserrat Rios, Ed.) Quito: Abya-Yala. Recuperado el 12 de abril de 2024, de <https://www.plantasutilesdeltropico.com/wp-content/uploads/2015/09/USEFUL-PLANTS-OF-ECUADOR1.pdf>

Robinson T, H. E. (1983). *A 1CBA2VW generic review of the tribe Liabeae (Asteraceae) [version pdf]* (1 ed., Vol. 1). Washington: Smithsonian Contributions to Botany.

Recuperado el 12 de abril de 2024, de <https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/7007/scb-0054.pdf>.

Valencia, R. N.-Y. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador [version pdf]* (2 ed., Vol. 2). (R. V. Susana León-Yáñez, Ed.) Quito: Missouri Botanical Garden. Recuperado el 12 de abril de 2024, de [https://dspace.itsjapon.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/289/1/Gesneriaceae\\_%20Libro%20Rojo%20Ecuador%202011.pdf](https://dspace.itsjapon.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/289/1/Gesneriaceae_%20Libro%20Rojo%20Ecuador%202011.pdf)

Vicki A. Funk, C. K. (27 de Diciembre de 2018). Phylogeny and biogeography of the tribe Liabeae (Compositae subfamily Cichorioideae). *Taxon*, 61(2), 437-455. doi:<https://doi.org/10.1002/tax.612013>

Yinusa Isah , IlogbulemG. (2012). Isolation of Stigmasterol from Aerial Plant Part of Spillanthes Acmella Murr. *World J Life Sci. and Medical Research*, 77. doi:[https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/77561993/en\\_wjlsmr\\_vol\\_2\\_iss\\_2\\_pg\\_77\\_80-libre.pdf?1640825114=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DIsolation\\_of\\_Stigmasterol\\_from\\_Aerial\\_Pl.pdf&Expires=1736185792&Signature=OU8esCqEtdOTgUP1P9q-jfuJIQ2834Z](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/77561993/en_wjlsmr_vol_2_iss_2_pg_77_80-libre.pdf?1640825114=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DIsolation_of_Stigmasterol_from_Aerial_Pl.pdf&Expires=1736185792&Signature=OU8esCqEtdOTgUP1P9q-jfuJIQ2834Z)