



UNAP



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

TESIS

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y CROMATOGRÁFICA DE TASPINA DE
Croton cuneatus Klotzch (pumasacha)**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

**SAID RAFAEL SÁNCHEZ GUERRA
LUIS ANTONIO ARCE PACAYA**

ASESOR:

Ing. CLETO JARA HERRERA, Mtro.

IQUITOS, PERÚ

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN



Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°074-PCGT-FFyB-UNAP-2022/CONSTANCIA DE ANTIPLAGIO N°951-DGINV-UNAP-2022

En el caserío de Nina Rumi, distrito de San Juan Bautista, departamento de Loreto, a los 06 días del mes de diciembre de 2022, a horas 10:05, se dio inicio a la sustentación pública de Tesis titulada "CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y CROMATOGRÁFICA DE TASPINA DE *Croton cuneatus* klotzch (pumasacha)", aprobada con Resolución Decanal N°258-2022-FFyB-UNAP presentada por los bachilleres: **Said Rafael Sánchez Guerra** y **Luis Antonio Arce Pacaya**, para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico que otorga la Universidad de acuerdo con Ley y Estatuto.

El jurado calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N°196-2022-FFyB-UNAP, está integrada por:

Q.F. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA, Dr.	Presidente
Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUÍZ, Mtra.	Miembro
Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO, Mtro.	Miembro

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: adecuadamente

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública de la tesis ha sido aprobada con la calificación muy buena

Estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Siendo las 11:45 se dio por terminado el acto académico


Q.F. JOSÉ DANIEL TORRES TEJADA, Dr.
Presidente


Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUÍZ, Mtra.
Miembro


Q.F. WILFREDO OSWALDO GUTIÉRREZ ALVARADO, Mtro.
Miembro


Ing. CLETO JARA HERRERA, Mtro.
Asesor

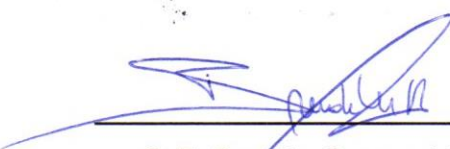
JURADO Y ASESOR



Q.F. José Daniel Torres Tejada, Dr.

Presidente de Jurado calificador y dictaminador

CQFP: 05857



Q.F. Brenda Soraya Urday Ruiz, Mtro.

Miembro de Jurado calificador y dictaminador

CQFP: 09575



Q.F. Wilfredo Oswaldo Gutiérrez Alvarado, Mtro.

Miembro de Jurado calificador y dictaminador

CQFP: 01399



Ing. CLETO JARA HERRERA, Mtro.

Asesor

CIP:63042

DEDICATORIA

Esta tesis se lo dedico a mi madre Gina Yolanda G. M. y a mi padre Juan José T. H. con todo mi amor, respeto y admiración, porque gracias a su cariño, dedicación, mucho esfuerzo y por haber estado siempre conmigo apoyándome e influenciando positivamente en mí, con sus consejos, guiándome e inculcándome los valores necesarios para salir adelante y ser una persona de bien, llegué a este momento memorable de mi vida

Said Rafael

A mis padres Marvela P. y Antonio A., a mis amigos, Isabel F. A., Pedro del Castillo L., Luis I. P., Antony U. M. A la familia Tenorio Guerra, por haberme apoyado moral y materialmente, a todos ellos dedico este trabajo de trascendencia para mi vida.

Luis Antonio

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Cleto Jara Herrera y al Ing. Julio Arce Hidalgo por sus apoyo y orientación necesaria durante el desarrollo de esta tesis; a nuestros docentes por brindarnos los conocimientos necesarios durante los años de nuestra formación profesional, por último, a nuestras familias y amigos que estuvieron presente brindándonos sus entusiasmo y buenos deseos para poder dar este gran paso y lograr este sueño ansiado de llegar a ser dignos profesionales.

INDICE DE CONTENIDO

PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADO Y ASESOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas	6
1.2.1. Especie en estudio <i>Croton cuneatus</i> Klotzch	6
1.2.2. Taspina	7
1.2.3. Aislamiento de Alcaloides	10
1.2.4. Métodos fisicoquímicos utilizados en la caracterización de Taspina	13
1.2.5. Caracterización por espectrometría ultravioleta visible	16
1.2.6. Análisis por cromatografía de capa fina (TLC)	16
1.3. Definición de términos	18
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	19
2.1. Formulación de la hipótesis	19
2.2. Variables de estudio y su operacionalización	19
2.2.1. Variables de estudio	19
2.2.2. Operacionalización de variables	20
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	21
3.1. Diseño metodológico	21
3.2. Diseño muestral	21
3.3. Procedimiento de recolección de datos	22
3.4. Procedimiento y análisis de datos	27
3.5. Aspectos éticos	28
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	29
	vi

4.1 Rendimiento de Taspina	29
4.2 Valores de los parámetros fisicoquímicos	29
4.3. Mediciones de longitud de onda	29
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	30
CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN	33
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	34
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
Anexos	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de Formación de la Taspina a partir de Magnoflorina (7)	9
Figura 2. Diagrama de Extracción Ácida (14)	12
Figura 3. Diagrama de Extracción con Disolventes Orgánicos (14).	12
Figura 4. Diagrama de bloques de la obtención de taspina y su caracterización	27

RESUMEN

El género *Croton*, perteneciente a la familia Euphorbiaceae, ha sido materia de estudios fisicoquímicos y biológicos, por sus aplicaciones etnobotánicas. El alcaloide taspina contenida en este género tiene un amplio abanico de propiedades como cicatrizante, antihemorrágico, contra quemaduras, antiangiógeno, anti leucémico y antibacteriana. El objetivo del trabajo fue caracterizar el alcaloide taspina, aislar del extracto acuoso de la corteza de *Croton cuneatus* recolectado en la comunidad de Manacamiri, provincia de Maynas, Loreto, Perú. Para extraer el alcaloide se usó etanol y cloroformo y la caracterización por métodos fisicoquímicos y espectrofotométricos. Se extrajo 2,432 g de taspina, cuyo rendimiento fue de 0,23%; el punto de fusión fue de 252,88°C, rotación óptica +7,6; el peso molecular fue de 369,71 g/mol. Los valores de Rf en diclorometano-metanol (20:1) fue 0,7; en cloroformo-dietilamina (18:2) 0,5 y en cloroformo-acetona (18:9) 0,15. Las longitudes de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) fueron los siguientes: 246, 285, 297, 330, 346 respectivamente. El resultado obtenido de la especie en estudio coincide plenamente con los valores de la taspina patrón aislada de *Croton lechlerii* (sangre de grado). En conclusión, los datos obtenidos son prometedores y que la especie botánica *C. cuneatus* sería una fuente importante para aislar taspina con propósitos medicinales.

Palabras claves. Caracterización Fisicoquímica, Cromatográfica capa fina, taspina, *Croton cuneatus*, alcaloide, espectrómetro.

ABSTRACT

The *Croton* genus, belonging to the Euphorbiaceae family, has been the subject of physicochemical and biological studies, due to its ethnobotanical applications. The taspine alkaloid contained in this genus has a wide range of properties such as healing, antihemorrhagic, burns, antiangiogenic, antileukemic and antibacterial. The objective of the work was to characterize the taspine alkaloid isolate from the aqueous extract of the bark of *Croton cuneatus* collected in the community of Manacamiri, province of Maynas, Loreto, Peru. To extract the alkaloid, ethanol and chloroform and characterization by physicochemical and spectrophotometric methods were used. 2.432 g of tapin were extracted, whose yield was 0.23%; melting point was 252.88°C, optical rotation +7.6; the molecular weight was 369.71 g/mol. Rf values in dichloromethane-methanol (20:1) was 0.7; in chloroform-diethylamine (18:2) 0.5 and in chloroform-acetone (18:9) 0.15. The maximum wavelengths (λ_{max}) were the following: 246, 285, 297, 330, 346 respectively. The result obtained from the species under study fully coincides with the values of the standard Taspina isolated from *Croton lechlerii* (sangre de grado). In conclusion, the data obtained are promising and that the botanical species *C. cuneatus* would be an important source to isolate taspine for medicinal purposes.

Keywords. Physicochemical characterization, thin layer chromatography, taspin, *Croton cuneatus*, alkaloid, spectrometer.

INTRODUCCIÓN

La gama de especies vegetales de la familia Euforbiaceae en la Amazonía de notoria importancia, van desde plantas alimenticias como *Manihot utilissima* (yuca) hasta tóxicas como *Hurta crepitans* (catahua), además está presente el género *Croton*, algunos con contenido de aceites esenciales como *Croton cajucara* y otras que poseen un alcaloide dilactónico conocido como Taspina de gran actividad biológica por su propiedad antiinflamatoria, anticancerígena (antileucémicas), antiangiogénica, antifúngica, antibacteriana y antiulcerosa (Úlcera gástrica)(1–3).

Taspina, se ha encontrado en la resina exudada de sangre de grado de solo tres especies del género *Croton*: en *Croton lechlerii*, *Croton draconoides* y en *Croton palanostigma* (1,4), a pesar que veinte especies de este género reconocidos en la Amazonía son fuente de sangre de grado o sangre de drago (5). Sin embargo, la especie *C. cuneatus* no está considerado como fuente de látex exudado de sangre de grado y mucho menos con contenido de taspina.

C. cuneatus klotzch es una especie de *Croton* existente en la amazonía peruana que posee hojas que cuando caducan se tornan rojizos y caen, tiene (laticíferas) que producen zumo y granos de polen con muchas aberturas poliporate semejantes a *C. lechlerii* y *C. palanostigma*, basado a estas características morfológicas similares se afirma que estas especies se relacionan filogenéticamente y guardan un vínculo común de parentesco (5). En la actualidad a *C. cuneatus* no se le concede ninguna utilidad desde el punto de vista químico, por lo que es necesario abordar su estudio.

Primero se realizó un análisis preliminar de la existencia de la molécula Taspina un alcaloide dilactónico, para lo cual se tomó el exudado de la planta y se hizo una prueba para alcaloides utilizando los reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner, cuyas pruebas dio reacción positiva (6).

En base a las pruebas preliminares realizadas, en el presente estudio se procedió a su aislamiento, purificación y se caracterizó mediante la determinación de sus parámetros fisicoquímicos y por cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC).

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Pona et al. (2019), en el artículo de revisión “Review of future insights of Dragon's Blood in dermatology” resalta los aspectos importantes de los estudios realizados hasta la actualidad de la sangre de grado de *C. lechlerii*, para lo cual usó la búsqueda de base de datos en PubMed con la palabra clave "Sangre de dragón" y "*Croton lechlerii*". Esta investigación resalta que la sangre de grado es una planta medicinal amazónica cuyos estudios clínicos incluyen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas y antineoplásicas. Además, refleja actividad cicatrizante de heridas y propiedad antiviral. Por otro lado, los análisis fitoquímicos identificaron proantocianidinas, fenoles, flavonoles, diterpenos, aceites esenciales, alcaloide, esteroides, catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina que constituyen el 90% del peso seco de sangre de grado. Los autores concluyen que el aumento de la investigación en plantas medicinales ofrece información para futuras opciones terapéuticas en dermatología (7).

Obando Barrera et al. (2015), en la tesis “Estudio de los alcaloides de *Croton draconoides* “sangre de grado”, su actividad cicatrizante y el diseño de una forma farmacéutica” trabajó con el látex de *C. draconoides*, de muestra recolectada en la localidad de Dos de Mayo distrito de Yarinacocha, Ucayali. El experimento lo realizó en tres etapas: obtención del látex, caracterización y liofilización e incorporación y evaluación de la actividad cicatrizante de la forma farmacéutica. Determinó que la actividad cicatrizante fue después de 96 horas de iniciado el tratamiento con una crema formulada al 1,5%. El autor concluye que el látex de *C. draconoides*, incorporado en una forma farmacéutica (crema), posee actividad cicatrizante (8).

Montopoli et al. (2012), en su artículo “*Croton lechlerii* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines” señala que investigaron los efectos de la savia de *C. lechlerii* y la taspina en comparación con el taxol y la vinblastina en el crecimiento de líneas celulares de

cáncer humano de SK23 (melanoma), LoVo y HT29 (cáncer colorrectal), con muestras que fue recolectado en la provincia de Napo, Ecuador. Para las pruebas usaron los ensayos de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de bromuro (MTT) y azul de tripano. Además, la taspina fue identificado por Cromatografía líquida de alta presión con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y por resonancia magnética nuclear de hidrógeno ($^1\text{H-NMR}$). El resultado de los ensayos mostró que la savia y la taspina inhibieron la proliferación de células cancerosas, pero la taspina mostró mayor actividad en las células SK23. Los autores concluyen que los datos que obtuvieron respaldan el uso de la savia como anticancerígeno en la etnomedicina y la taspina como posible agente anticancerígeno (9).

Tamariz et al. (2003), en su artículo “Actividad antibacteriana de la sangre de grado (*Croton lechlerii*) frente al *Helicobacter pylori*”, señala que realizaron ensayos de actividad antibacterial con sangre de grado frente a *Helicobacter pylori*. Encontraron que la sangre de grado inhibió el crecimiento de *H. pylori* a concentraciones altas, también determinaron el efecto bactericida y la capacidad curativa frente a úlceras gástricas (10).

Ross et al. (1998), en su artículo “Total synthesis of Taspine”, señala el proceso de síntesis de Taspina a partir de magnoflorina siguiendo los procedimientos realizados por Shamma Maurice et al, a través de este proceso de síntesis se obtuvo 9,6% de rendimiento general (11).

Pieters et al. (1998), en su libro “La sangre de grado una droga tradicional de Sudamérica constituyentes biológicamente activos”, señala que la Taspina fue aislado a partir de sangre de grado por fraccionamiento usando varios solventes, en cada fracción la Taspina fue aislada parcialmente e identificado, luego fueron reunidos en una sola fracción (12).

Marcano et al. (1991), en su libro “Fitoquímica Orgánica”; menciona que usando anhídrido acético seguido de ozonólisis y la reacción con óxido de plata y ácido

clorhídrico mas una base, la magnoflorina se convierte en Taspina por apertura del anillo piperidínico de la isoquinoleína (13).

Vaisberg et al. (1989), en el artículo “Taspine in the cicatrizant principle in sangre of grado extracted from *Croton lechlerii*”, realizó un ensayo para comprobar la actividad cicatrizante de taspina empleando ratas. Procedieron a rasurar el cuerpo de las ratas luego hicieron incisiones y aplicaron sangre de grado sobre los cortes, observaron que la taspina tuvo una actividad fibroblástica en la formación de la sustancia intercelular del tejido conjuntivo, además observaron que la actividad es mayor cuando se halla como clorhidrato (1).

Mustiga et al. (1982), en su tesis “Aislamiento y caracterización del alcaloide Taspina del látex de *Croton lechlerii* (sangre de grado)”, trabajó con exudado de sangre de grado, para aislar usó solventes de diferentes polaridades y caracterizó mediante la elucidación de su estructura química por espectrometría ultravioleta visible (UV), Espectroscopía infrarroja (IR), Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (HRMN), Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono (CRMN) y Espectrometría de masas (EM). Obtuvo un rendimiento de 0,67% sobre el peso de la muestra utilizada (14).

Shamma y Moniot et al. (1971), en su artículo “A biogenetically patterned conversion of magnoflorina in taspina”, señala el proceso de síntesis para obtener la Taspina mediante la apertura del anillo piperidínico de la sustancia aporfínica magnoflorina (15).

Soukup et al. (1970), señala en su libro “Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y Catálogo de los géneros”, que en el Perú el género *Croton* posee 20 especies y son las siguientes: *C. adipatus* (callushina) de selva alta, *C. baillonanus* M. Arg (cabra-cabra), *C. calliacarphaelolius* Vahl (palo blanco), *C. colinus* HBK (quimsa callapa), *C. draconoides* M. Arg (sangre de grado), *C. erythrochilus* M. Arg (sangre de grado), *C. flavispicatus* Rusby (chivo mashan), *C. huitotorum* Croizat

(bagovo-eq), *C. heliotropiifolium* (tango chia), *C. lechlerii* M. Arg (sangre de grado), *C. nitidifolius* Croizat (cabra-cabra), *C. perlongiflorus* Croizat (Jaratu), *C. pilgeriule* (supayerivequiro), *C. rehderianus* Croizat (moco moco), *C. ruizianus* M. Arg (upalu), *C. sampatik* M. Arg (sampatik), *C. trinitatis* M. Arg (sinchi pichana), *C. sp.* (lino callo), *C. palanostigma* Klotzch (shamboquiro), *C. cuneatus* Klotzch (pumasacha) (5).

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Especie en estudio *Croton cuneatus* Klotzch

A. Identificación taxonómica

La planta fue identificada por el especialista del Herbarium Amazonense CIRNA–UNAP.

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Subclase	: Magnoliopsida
Orden	: Malpighales
Familia	: Euphorbiaceae
Subfamilia	: Crotonoideae
Tribu	: Crotoneae
Género	: Croton
Especie	: <i>Croton cuneatus</i> Klotzch
Nombre vulgar	: pumasacha, pumacspi

B. Descripción Botánica

C. cuneatus es un árbol monoico no mayor a 18 m de alto; hojas alternas elípticas con ápice acuminado, margen generalmente entero con coléteres; estípulas subuladas con indumento lepidoto; glándulas acropeciolas subsésiles en lado abaxial; indumento esparcido con tricomas dentados-lepidotos en lado adaxial;

indumento abundante con tricomas lepidotos–subenteros en lado abaxial; sépalos valvados; sépalos de flores estaminadas lanceolados-ovados; 12–16 estambres; sépalos de flores pistiladas ovados con ápice redondeado; estilos libres bífidos; carúncula ausente, modificación en arilo cubriendo todo el lado ventral de semilla. Tricomas lepidotos en cara abaxial, tricomas lepidotos en cara adaxial, presencia de nectarios en el margen de la rodeados por círculos, flores estaminadas, estípulas señaladas por flecha, glándulas acropeciolas señaladas por flechas, flores pistiladas, infrutescencia, semillas eucarunculadas con arilos cubriendo toda la cara ventral (16).

C. Distribución geográfica

En bosques primarios o secundarios estacionalmente inundados (bajjal o tahuampas), bosque húmedo tropical en llanura aluvial inundable. Distribuida a lo largo de la selva tropical de Perú, entre los 90–300 msm. También distribuida en los países de Bolivia, Brasil, Ecuador, Guyana Francesa, Surinam y Venezuela (16).

D. Usos

Se usa como madera redonda para la construcción de viviendas rústicas, rara vez se recoge el látex como sustituto de sangre de grado. Corteza usada para disentería, látex usado para llagas (16).

1.2.2. Taspina

Taspina ocupa una posición única en la línea de la química de los alcaloides encontrado en *Leontice eversmanii* Bunge (Berberidaceae), es una base terciaria dilactónica de alto punto de fusión (15). La biosíntesis de este alcaloide es interesante, probablemente porque procede de la formación de un núcleo aporfínico a partir de la bencilisoquinolina, a través de un camino de acoplamiento carbono-carbono (C-C) el cual tiene lugar por intermediarios espiro-quinoides, para ello los átomos de oxígeno son donados por grupos OH y metoxilo, en posiciones

conjugadas al sitio de unión mediante la vía de acoplamiento C-orto-C-orto o C-orto-C-para, a través del cual la bencilisoquinolina pasa directamente a aporfina, esta reacción metabólica es denominada tercera vía en la biotransformación de la magnoflorina en Taspina utilizado por Shamma para sintetizar Taspina (15).

Como alcaloide dilactónico derivado de la benciltetrahidroisoquinoleína de estructura aporfínica, tiene un esqueleto sencillo formada por grupos fenólicos y lactónicos que posee 2 grupos metoxilos en posiciones 2 y 8 (13).

Entre los alcaloides la Taspina se caracteriza como un pseudoalcaloide porque posee un nitrógeno fuera de las estructuras cíclicas dilactónicas. Además, posee un sustituyente etilamina dimetilo en posición 4 en el anillo dilactónico, pero no ha sido biosintetizado mediante el anabolismo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina o tirosina como suele ser la vía metabólica para formar todos los alcaloides (15).

Se ha postulado que la biogénesis de este alcaloide probablemente procede a través de la eliminación de Hofmann, catalizada por enzimas de la aporfina cuaternaria, donde la magnoflorina pasa a magnoflorina metino por oxidación del doble enlace en posición 9, 10, seguido por lactonización hasta llegar a Taspina (15).

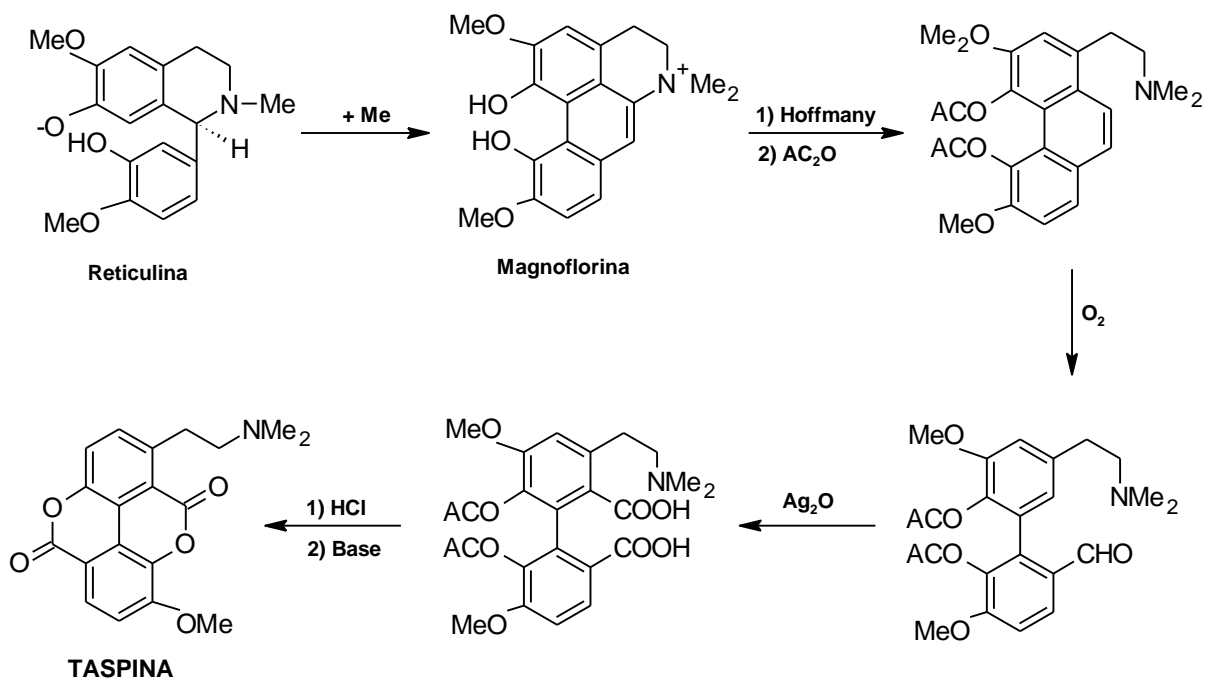


Figura 1. Mecanismo de Formación de la Taspina a partir de Magnoflorina (7)

A. Actividad biológica de la Taspina

La sangre de grado es una de las renombradas medicinas tradicionales usados en diferentes culturas del mundo, tiene muchos usos terapéuticos. Cicatrizante de heridas, hemostático, antidiarreico, antiúlceras, antimicrobial, antiviral, antitumoral, antiinflamatorio y antioxidante (2,3).

Actividad antioxidante

A dosis de 100 microgramos/ml el látex de sangre de grado tiene actividad antioxidante por la presencia de flavonoides y proantocianinas (10).

Actividad antiinflamatoria.

Risco determinó que el látex y el clorhidrato de Taspina tiene actividad antiinflamatoria (17). Además, el tratamiento a una inflamación aguda inducida por

carragenina con sangre de grado administrado intraperitonealmente a ratas a una dosis de 5 mg/kg equivalente a 20 mg/kg de Naproxeno mostró buena actividad antiinflamatoria (1).

Actividad cicatrizante

El clorhidrato de Taspina tiene mayor actividad cicatrizante que el látex de sangre de grado, la actividad cicatrizante se debe al mecanismo de acción que estimula la migración de fibroblastos (1), formando sustancias intracelulares del tejido conjuntivo que cumple el papel de sustancia comutante.

Actividad anticancerígena

La sangre de grado extraído de *C. lechlerii* probada contra cepas de carcinoma de células de colon humano y carcinoma hepatocelular humano (HepG2) mostró eficacia anticancerígena. Además, las especies del género *Croton* pueden ser fuente importante de compuestos con efectos antitumorales y demostraron toxicidad aguda moderada en células del cáncer del cuello uterino (HeLa), también es genotóxicamente segura con interesantes propiedades protectoras frente a la mutagenicidad (18,19).

1.2.3. Aislamiento de Alcaloides

La extracción de Taspina varía según la magnitud y finalidad de la operación, así como de la materia prima utilizada (20).

Medio Alcalino

Al extracto obtenido de un órgano vegetal se agrega una solución alcalina que puede ser de bicarbonato de sodio, hidróxido de amonio que desplaza los alcaloides de sus combinaciones salinas, de esta mezcla las bases son extraídas con un solvente orgánico de baja polaridad, cloroformo, diclorometano, éter dietílico. Cuando se tiene

que extraer alcaloides que poseen una función éster muy lábil, en vez de amoniaco es preferible usar bicarbonato de sodio.

Medio ácido

La droga puede extraerse con una solución acuosa ácida. Además, se puede utilizar soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas ácidas (ejemplo: ácido tartárico), en este caso se concentra el extracto líquido por destilación al vacío en rotavapor para eliminar el alcohol, pero en ambos casos se obtienen soluciones acuosas de sales de alcaloides y estas soluciones se alcalinizan luego las bases se extrae con un disolvente orgánico no miscible. También existe la posibilidad de fijar los alcaloides sobre resinas de intercambio iónico después eluir con ácidos fuertes, además el alcaloide se puede precipitar bajo la forma de Yodo-Mercuriatos, luego usando reactivo de Mayer separar del mercurio.

Medio ácido y solvente orgánico

Los alcaloides pueden extraerse usando soluciones ácidas y disolventes orgánicos como se muestra en la figura 2 y 3 (21).

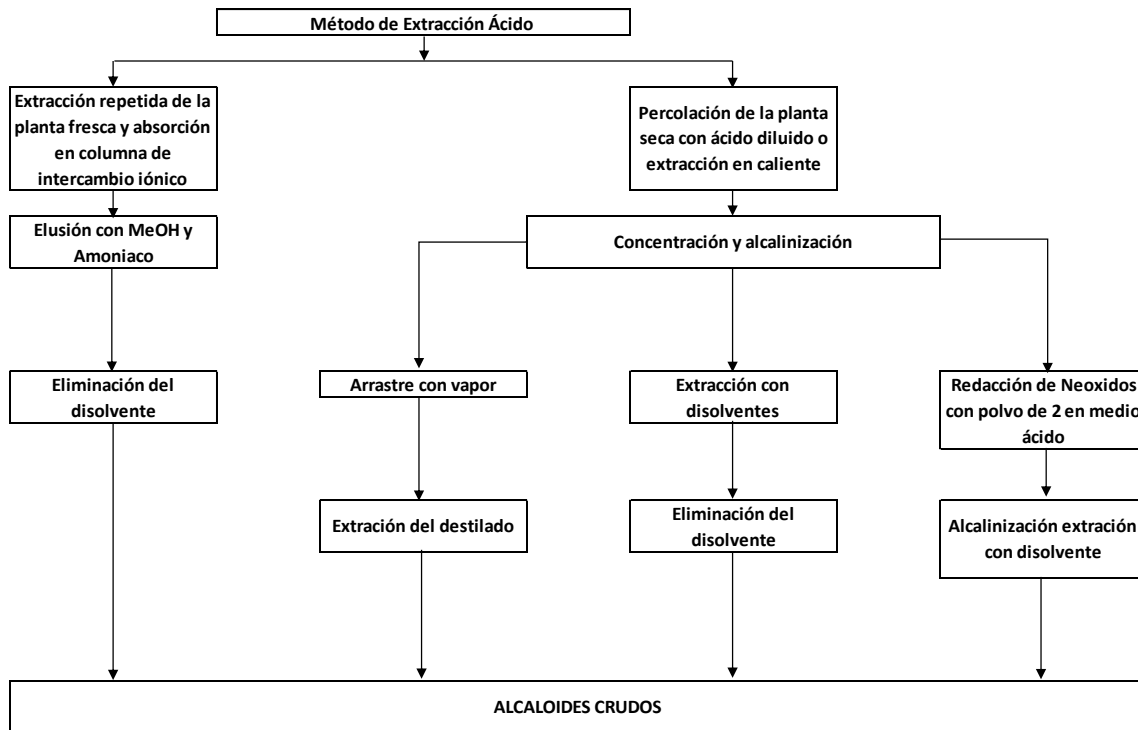


Figura 2. Diagrama de Extracción Ácida (14)

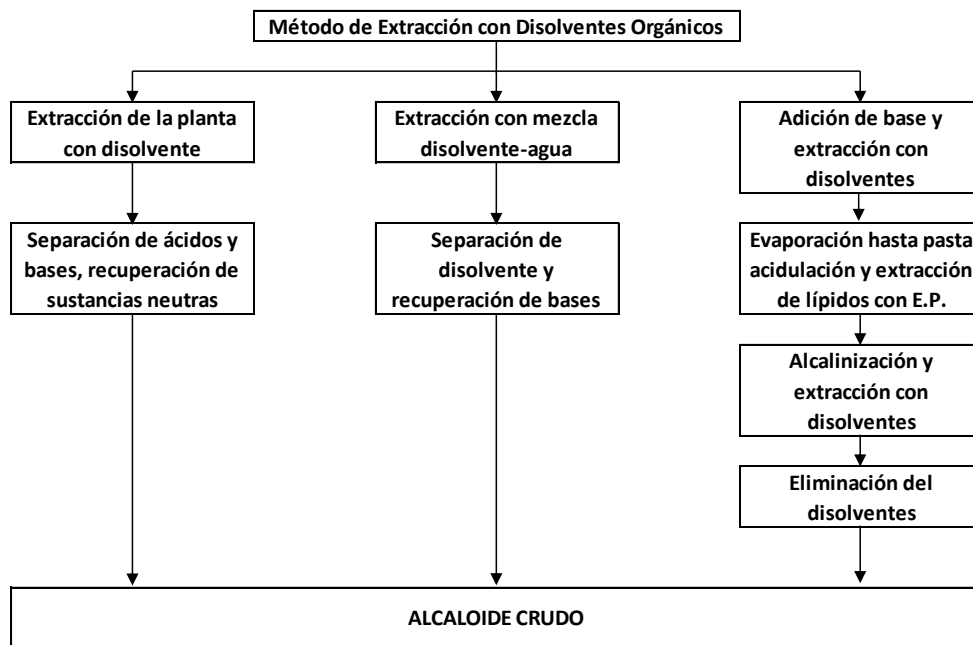


Figura 3. Diagrama de Extracción con Disolventes Orgánicos (14).

Otro método de aislamiento es usando TLC para alcaloides apomórficos y proapomórficos. Taspina es un alcaloide derivado de las aporfina en los que se utiliza sílice gel GF₂₅₄ y como solventes de resolución benceno-tetrahidrofurano (80:20) corriendo GOMIN; benceno-n-propanol (80:20) corriendo 30 minutos (22).

1.2.4. Métodos fisicoquímicos utilizados en la caracterización de Taspina

Son los métodos que se emplearon para la identificación de la Taspina de acuerdo con su estructura, presencia de grupos funcionales y especificaciones propias de la molécula. La identificación consiste en lograr la información necesaria en base a las propiedades fisicoquímicas de taspina pura, tales como: punto de fusión, rotación óptica, determinación del peso molecular por el método de Rast basado en la depresión del punto de fusión del D-camphor ocasionado por la presencia de la muestra problema con la que se trabaja.

El valor R_f en TLC con un solvente o mezclas de solventes corridas sobre una placa cromatográfica cuya fase estacionaria es sílice gel puede ser utilizado para asignar la identidad del compuesto frente a otro que se tiene como patrón o marcador auténtico o con los valores que señala la literatura, si corre a un mismo valor de R_f es que se trata de dos sustancias idénticas.

Punto de fusión

En un analito sólido el punto de fusión señala el intervalo de temperatura en que la sustancia pasa del estado sólido al estado líquido, propiedad que es singular en cada sustancia, por eso se utiliza como método de identificación de un compuesto aislado en estado de alta pureza, se usa el aparato de Thiele, Fisher Johns o FISATOM 431D (6).

Rotación óptica

La rotación óptica es característica de moléculas ópticamente activas con un ángulo de giro hacia la derecha (dextrógira), según la teoría ondulatoria, la luz se propaga a través de ondas caracterizados por su longitud en un plano de vibración y conseguir que las ondas de luz vibren en planos paralelos, a esto se llama luz polarizada, uno de los métodos para producir luz polarizada es mediante el prisma de Nicol, que se prepara cortando en dos trozos un cristal de calcita (mineral formado por carbonato de calcio clase 05 según la clasificación de Strunz), luego se une de nuevo por su superficie plana para que la luz pueda pasar a través de los planos de vibración paralelos; con este dispositivo se mide la actividad óptica de las moléculas en las que es imposible una orientación completamente al azar. Cuando se hace pasar la luz polarizada a moléculas que poseen uno o más átomos de carbono asimétricos, el plano de vibración experimentará una rotación global bien en el sentido de las agujas del reloj (hacia la derecha) o en el sentido contrario (hacia la izquierda), si la rotación es en el sentido de las agujas del reloj se dice que la sustancia es dextrógira y si es contrario a ello se dice que es levógira.

La actividad óptica de una sustancia en disolución se expresa como rotación específica y se define como:

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{100 \cdot \alpha}{\lambda \cdot c}$$

Donde:

α = ángulo de rotación observado

λ = longitud de la columna en decímetros

C = concentración del soluto ópticamente activo en gramos/100 ml de disolución.

El superíndice "t" indica la temperatura y el subíndice "λ" la longitud de onda de la luz utilizada.

Determinación del peso molecular por el método de Rast

El método de Rast, se utiliza para calcular el peso molecular de una sustancia desconocida, pero también en análisis comparativo para ver si una molécula es semejante al que se halló en una especie del mismo género dado a su relación filogenética en las que pueden estar presentes los mismos analitos. La sustancia a identificar se pulveriza, se añade D-Camphor y se determina su punto de fusión de la mezcla por el método de Thiele, para medir la temperatura se usa un termómetro graduado con un rango hasta 400°C, se toma el valor del punto de fusión del D-Camphor original. La diferencia entre estos dos puntos de fusión es la depresión del punto de fusión del D-Camphor por la sustancia desconocida y se representa por ΔT (6).

El peso molecular se calcula con la siguiente fórmula: $M = \frac{K \times p \times 1000}{\Delta T \times P}$

Donde:

p = peso del compuesto desconocido

P = peso del D-Camphor

ΔT = depresión en el punto de fusión del D-Camphor

K = 39,7 depresión molar del D-Camphor

Densidad

Se utiliza un picnómetro, se pesa el picnómetro vacío, luego se llena de agua y se pesa nuevamente, la diferencia de estos pesos es el peso del agua, se utiliza la densidad del agua a la temperatura de trabajo con el que se halla el volumen del agua que a su vez es el volumen del picnómetro. Se realiza el mismo procedimiento para hallar la densidad de la sustancia desconocida, pero en este caso solo se procede a sacar el peso de la sustancia, porque ya se tiene el volumen del picnómetro, luego se calcula la densidad correspondiente utilizando la siguiente fórmula.

$$\rho = \frac{\text{peso}}{\text{volumen}}$$

La densidad determinada es un parámetro útil para calcular el rendimiento del componente obtenido en base al peso de la materia prima, donde se halla en su estado natural.

1.2.5. Caracterización por espectrometría ultravioleta visible

En una molécula el espectro ultravioleta se determina si se produce una excitación electrónica de ésta con luz radiante. Desde el punto de vista químico los espectros en la región ultravioleta de una molécula disuelta en un solvente señalan la presencia de insaturaciones que posee la molécula que absorbe la energía, los denominados dienos conjugados que contienen electrones π que tienen respuestas cromórficas en la región del UV lejano, debido a las transiciones π - π (6,23).

La molécula de Taspina tiene insaturaciones conjugadas de dobles enlaces de los grupos bencénicos que equivalen a 3 pares de cromóforos etilénicos que interactúan con los grupos ceto de las pironas y éstas con los electrones de la dilactona. El espectro de Taspina en solución de cloroformo produce un pico de alta intensidad a 255 nm y otros de menor intensidad a longitudes de onda de 292, 303, 339 y 357 nm respectivamente, cuando el disolvente es etanol los picos serán de 246, 285, 297sh, 330 y 346 nm (14,23).

1.2.6. Análisis por cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina es una técnica que utiliza una placa recubierta con un absorbente conocido como soporte (silicagel) que se sumerge verticalmente en solvente fase móvil (eluyente) que se halla en la cromatocabina. La fase estacionaria es la capa uniforme del adsorbente donde se coloca la muestra que se halla adherido sobre la placa de vidrio, aluminio o plástico conocido como soporte.

Los adsorbentes más usados en la cromatografía de capa fina son: Silca gel utilizado en el 80% de separaciones, óxido de aluminio o alúmina (ácida, neutra o básica), tierra silíceo o Kieselguhr, celulosa (nativa o cristalina) y poliaminas.

El cromatofolio o placa cromatográfica preparada con la aplicación del soluto que se quiere separar, se introduce a la cámara en posición vertical o inclinada próxima a la pared de la cámara, el movimiento del solvente arrastrando el soluto se produce por capilaridad. La cromatografía TLC puede separar muestras de iones inorgánicas, moléculas orgánicas y compuestos biorgánicos: lípidos, aminoácidos, nucleótidos, alcaloides, azúcares, flavonoides, etc.

TLC es uno de los métodos más ampliamente usados para el análisis químico cualitativo, a través del cual es posible identificar sustancias o compuestos de un conjunto de ellos que se encuentran en una solución, separándolos usando un solvente que se desplaza a lo largo de la fase estacionaria. Después que se ha corrido una placa se usa el revelador UV, la presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz de la zona en la que se encuentra el producto y el resultado es la visualización de unas manchas en la placa que indica la presencia de un compuesto. Generalmente se usa yodo como reactivo revelador el cual forma complejos coloreados con los componentes orgánicos con manchas de tonos amarillo a marrón que hay que señalar para que no desaparezca con el tiempo.

El R_f o factor de retención mide la distancia recorrida por cada analito impulsado por el solvente o mezclas de solventes. Las distancias se miden desde la línea de siembra de la muestra hasta el lugar donde llegó cada analito que se ha separado de la muestra y en el caso de la fase móvil, desde la línea de siembra o aplicación hasta el frente donde llegó la fase móvil, se calcula mediante la relación siguiente:

$$R_f = \frac{\text{Distancia de recorrida del analito (cm)}}{\text{distancia recorrida por el solvente (cm)}}$$

En base a valores conocidas de R_f de los analitos corridas con diferentes solventes y en silicagel GF₂₅₄ es posible determinar el valor del factor de retención que corresponde a la muestra de estudio corrido en varios reactivos.

1.3. Definición de términos

Aislamiento: Método que se aplica para separar un compuesto del material vegetal que permitirá su purificación e identificación. Existen muchas técnicas de aislamientos dependiendo de la materia prima con que se trabaja, se utilizan fluidos supercríticos, cromatografía de columna, TLC, partición de fases, sublimación, destilación, centrifugación, etc.

Alcaloide. Son metabolitos secundarios sintetizado por las plantas, generalmente, a partir de aminoácidos denominados alcaloides verdaderos, pero también son sintetizados por otros precursores que no son aminoácidos las que se denominan pseudoalcaloides. Todos ellos de carácter básico excepto colchicina. Poseen acción fisiológica intensa en los animales y humanos aun a bajas dosis con efectos psicoactivos, por lo que son muy usados en medicina para tratar problemas en la mente y calmar el dolor.

Sangre de grado. También denominado sangre de drago o sangre de dragón; proviene de un árbol de la Amazonia peruana que al hacer incisiones en la corteza desprende un líquido rojo, se usa como cicatrizante, aplicándolo directamente sobre la herida en la piel, en mordeduras de arañas, en abrasiones y ampollas.

Caracterización: Consiste en identificar al componente o los componentes puros aislados, usando técnicas de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, resonancia magnética nuclear de protones y de carbono-13, espectrometría ultravioleta visible, infrarrojo, rayos X, dicroísmo circular y espectrometría de masas.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la hipótesis

No aplica por ser un estudio descriptivo.

2.2. Variables de estudio y su operacionalización

2.2.1. Variables de estudio

Variable independiente

Taspina, sustancia aislado y purificado, producto del proceso de tratamiento de la muestra vegetal con solventes de diferente polaridad.

Variable dependiente.

Características fisicoquímicas explica aspectos físicos y químicos simultáneamente y que depende de condiciones externas como son las variables temperatura, presión, volumen y de las modificaciones químicas que se producen. Estas propiedades son punto de fusión, peso molecular y valor del Rf.

Espectrometría UV-visible es la medición de las longitudes de onda máxima de los compuestos que tienen una estructura con dienos conjugados y que tienen la tendencia de absorber radiación de los electrones que se excitan a una determinada longitud de onda (entre 180 a 650 nm) y que pueden verse afectados por el solvente.

2.2.2. Operacionalización de variables

Variable Independiente	Definición operacional	Tipo de investigación por naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Medios de verificación
Taspina	Alcaloide dilactónico. Para extraer, la corteza es reducida a serrín, se maceró en alcohol al 80%, se basificó con NH ₄ OH y se extrajo con cloroformo, se purificó con Dioxano, se obtuvo cristales para su caracterización.	Cuantitativa	Rendimiento	Valor porcentual (%)	Cristales aislados

Variable dependiente	Definición operacional	Tipo de investigación por naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Medios de verificación
Características fisicoquímicas de taspina	Se identificó mediante la determinación de sus características fisicoquímicas sobresalientes punto de fusión, valores R _f x 100 en TCL y peso molecular por el método de Rast.	Cuantitativa	Punto de fusión Rotación óptica Peso molecular Densidad Valores TLC	°C Adimensional g/mol g/cm ³ R _f	Valores de las propiedades fisicoquímicas
Espectrometría UV-Visible de taspina	Se identificó por espectrometría ultravioleta visible, el valor de longitud de onda máxima.	Cuantitativa	Espectrometría UV-Visible (longitud de onda)	Nanómetro (nm)	Espectro UV-Visible

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico

El estudio fue de tipo cuantitativo de diseño descriptivo; porque se caracterizó al compuesto taspina aislada de la especie botánica *Croton cuneatus*, (24). El diseño es descriptivo y transversal ya que la muestra se recolectó por una sola vez y no se manipuló variable alguna.

Se elaboró un algoritmo, es decir un conjunto de procedimientos, fases, etapas para la realización de operaciones, procesos químicos, mediciones, cálculos matemáticos, sistemas de control. Los procedimientos en la obtención de taspina: Recolección de la muestra, identificación botánica, rallado (reducir la corteza a serrín), maceración con alcohol, filtración, determinar la densidad de la solución, basificación, extracción con cloroformo, secado con sulfato de sodio anhidro, filtración, purificación con dioxano. Realizar pruebas fisicoquímicas y espectrometría UV-visible del producto puro.

3.2. Diseño muestral

Población de estudio. Conjunto de árboles de *Croton cuneatus* que crece a orillas del río Nanay en la zona de Manacamiri, distrito de Iquitos, provincia de Maynas, región Loreto.

Muestra de estudio. Es por conveniencia, se recolectó dos ramas de un árbol cuyo diámetro oscilaba entre 20 cm de diámetro y 10 m de alto con un serrucho, de las cuales se obtuvo 6 kilogramos de corteza y reducido a serrín.

3.3. Procedimiento de recolección de datos

A. Colección de muestra vegetal

La muestra vegetal se recolectó en la localidad de Manacamiri, distrito de Iquitos, provincia de Maynas, región Loreto, cuyas coordenadas georreferenciales son las siguientes 3°34'02''S; 73°15'52''O; altitud 105 msnm.

Se tomaron fotografías para documentar el estudio se cortó con una sierra dos ramas de 10 cm de diámetro, la muestra luego fue trasladada hasta el Laboratorio de Productos Naturales y Fitoquímica de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).

B. Certificación de la muestra vegetal

Para la identificación se cortó una rama de la planta que tenía hojas, flores y frutos que fue llevada al Herbarium Amazonense CIRNA-UNAP de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), donde fue evaluada por un taxónomo botánico por sus características morfológicas y los criterios filogenéticos que cada especie vegetal posee de acuerdo con la clasificación establecida por Arthur Cronquist. La certificación de la especie vegetal, permitió la emisión de una constancia cuyo código de identificación permanente es 023326 (ver anexo 1).

C. Obtención de la taspina

La corteza fresca fue rallada con escofina produciendo 6 kg de serrín, se maceró con 12 litros de una mezcla alcohol-agua (80:20), se filtró y se obtuvo 8 litros, se concentró en rotavapor a 35°C hasta obtener 1,2 litros de exudado (21).

Se tomó un litro de exudado, se basificó con hidróxido de amonio al 25% hasta alcanzar un pH 11, los flóculos formados fueron separados por filtración, luego se añadió cloroformo para extraer el alcaloide con agitación intermitente por 2 horas, para separar la humedad se añadió sulfato de sodio anhidro y se filtró, el cloroformo

fue separado en rotavapor a presión reducida, el residuo con contenido de taspina impuro fue purificado con 1,4 – dioxano lavando sucesivas veces hasta obtener un producto amarillo blanquecino, cuyo peso fue de 2,432 g.

Obtención de clorhidrato de taspina. Para lograr este derivado se partió de la siguiente relación estequiométrica denominada ley de las proporciones definidas que dice: Un compuesto siempre está constituido por los mismos elementos y en la misma proporción en masa, cuando estos compuestos se combinan para formar otro diferente siempre es necesario la misma proporción de masas de los constituyentes para formar un compuesto (21).

Para transformar taspina a clorhidrato de taspina se usó 26 ml de HCl, se calculó el peso de ácido resultando 0,0949g, luego por estequiometría química se obtuvo el peso de taspina 0,96g, se pesó en una balanza y se disolvió con 50 ml de cloroformo luego se trasvasó a una pera de decantación de 500 ml, se agregó 26 ml de HCl se agitó vigorosamente la mezcla para que se produzca la reacción química estequiométrica, se deja en reposo luego se separa la fase acuosa donde se halla disuelto el clorhidrato de Taspina, se concentra en rotavapor y se obtiene una sustancia blanca amarillosa, se sacó del balón colector de rotavapor agregando éter de petróleo y se filtró quedando retenido en el papel de filtro el clorhidrato de Taspina, cuando estuvo completamente seco se pesó y se obtuvo 1.0482 g. cuyo rendimiento es 0,23%. Los cálculos se encuentran en el anexo 6 (20,21).

D. Determinación de los parámetros fisicoquímicos

Densidad se aplicó el método picnométrico, se tomó un picnómetro de Weld de 5 ml de volumen, con calibración de fábrica a 20°C, para realizar la medición de la densidad se debe operar a la temperatura del laboratorio, el primer paso que se siguió fue realizar su calibrado a 30°C para lo cual se lavó el picnómetro con agua destilada y se secó a 110°C en una estufa, luego se pesó en la Balanza Analítica OHAUSS obteniendo el peso del picnómetro vacío, se llenó con agua destilada libre de gas y se pesó nuevamente, obteniéndose el peso del picnómetro más el peso del

agua, por diferencia de estos pesos se halla el peso del agua, seguidamente se buscó la densidad del agua a esa temperatura en “Handbook of Chemistry and Physics de Weast Robert Editors”, en la página F-10 y se encontró un valor de 0,99567 g/cm³ (25), luego se procedió a secar el picnómetro y se introdujo el extracto acuoso de *C. cuneatus*, se pesó y se obtuvo el peso del picnómetro más el del extracto, por diferencia de peso con el del picnómetro vacío se halla el peso del extracto y por último, aplicando la fórmula de la densidad se halla la densidad del extracto (los cálculos se encuentran en el anexo 4) (21).

Punto de fusión se determinó usando el aparato FISATOM 43LD de USV 60Hz rango 50 a 300°C que posee un ocular con un aumento que permitió agrandar la imagen, se encendió el equipo, la temperatura que indicó el equipo en el momento en el que se fundió el cristal fue de 252,88°C, es la temperatura del punto fusión de la sustancia analizada (26).

Rotación óptica se realizó en un polarímetro automático digital 412, un aparato de lectura digital cuya escala de medida se inscribe en un ángulo de rotación de $\pm 45^\circ$ y tiene una precisión de 0,01, mide a una longitud de onda media de 589,4 nm, consta de tubo de 100 mm, alimentación eléctrica 220 VAC/ 50 Hz.

Previamente se llenó un tubo de 10 cm³ con agua para determinar en el polarímetro la lectura cero de este tubo, se ajustó la temperatura del equipo a 20 °C, luego se disolvió 1g de Taspina en 100 ml de piridina y se llenó el tubo con Taspina-piridina, la muestra se introdujo en el compartimento de muestra, se movió el polarizador y luego el analizador, se observó en la pantalla el ángulo de giro o rotación (α), finalmente se dio lectura al valor de rotación óptica específica $[\alpha]_{D20} = + 7.6$ en piridina (21).

Peso molecular se usó el método de Rast, de acuerdo a las indicaciones por Shriner *et.al* (20), para lo cual se procede del modo siguiente.

Se utilizó un tubo cilíndrico de 8x50 mm limpio y seco, se pesó, luego se colocó 50 mg del compuesto y se pesó nuevamente, después se añadió 0,5g de D-camphor y se volvió a pesar nuevamente el tubo, esta muestra se fundió con una llama baja del mechero de Bunsen hasta que apareció un líquido transparente. Después que se enfrió el contenido se secó y se colocó sobre una luna de reloj limpia. Este material se pulverizó y se determinó su punto de fusión, por el método de Thiele, aunque resulto más rápido y sencillo realizarlo en el aparato de FISATOM 431 D. cuando se volvió completamente limpio, transparente esta mezcla, se tomó el valor del punto de fusión de la mezcla (169,252°C), luego se determinó el punto de fusión del D-camphor (180°C) la sustracción del punto de fusión del D-camphor menos el punto de fusión de la mezcla D-camphor más la muestra de estudio da el punto de depresión ΔT del D-camphor. Con estos datos se determinó el peso molecular de taspina que es igual a $M = 369,371$ g/mol con error de ± 0.10 con respecto al valor de la literatura de 369 g/mol (ver anexo 7).

Valor del factor de retención R_f por cromatografía en capa fina – TLC, se utilizó la técnica señalada por Stahl-Egon en su libro “Thin Layer Chromotography (1969, pag.670). Se procedió del modo siguiente, se preparó de un cromatofolio 20 x 20 cm cuyo soporte es sílica gel, 5 tiras cromatográficas de 20 cm de longitud y 4 cm de ancho.

Se prepara la muestra diluyendo la muestra en diclorometano se aplicó a 2 cm por encima del margen inferior (origen) a una distancia 2 cm entre el borde lateral derecho y el borde lateral izquierdo. La longitud de corrida de la mezcla de solvente se hizo con una regla milimétrica. Antes de medir se reveló la tira en la cámara de UV a 254 nm. Los valores de R_f calculados utilizando diferentes mezclas de solventes de corrida para taspina (ver anexo 8).

Primera mezcla de solventes: Se preparó la solución de corrida que consistió en una mezcla de [diclorometano: metanol] (20 + 1) que se vertió en la cámara de vidrio que se tapó para saturar el ambiente, se introdujo la tira cromatográfica dentro de la

cámara y se corrió, se detuvo la corrida cuando el solvente se hallaba cerca del borde superior de la tira (frente del solvente) (23).

Segunda mezcla de solventes: Se preparó la solución de corrida que consistió en una mezcla de [cloroformo: dietilamina] (18+2).

Tercera mezcla de solventes: Se preparó la solución de corrida que consistió en una mezcla de [cloroformo: acetona] (18+9).

E. Análisis por espectrometría UV-visible

Las mediciones de longitud de onda máxima de Taspina se realizó en el equipo 2800 UV/Vis Spectrophotometer UNICO.

Se preparó una muestra de 5 mg luego se diluyó en 100 ml de cloroformo, se llevó a la celda de cuarzo de 1 cm³ y en la otra celda se llenó solo cloroformo para el blanco, ambas cubetas se depositaron en la cavidad denominada área de muestra del equipo donde los haces de radiación pasa al área del detector donde funcionan tubos fotomultiplicadores separados que generan un voltaje proporcional a la energía incidente en los detectores. El balance de voltaje producido de la absorción de energía en el haz de la muestra, se balancea por medio de un voltaje equivalente que se deriva de una porción de alambre deslizante, es cuando la plumilla del registrador se desplaza y aparecen los valores de longitud de onda. En nuestro estudio programamos un barrido en rango de longitudes de onda de 200 – 500 nm en medio clorofórmico y se pudo observar los picos siguientes:

λ_{\max} Cloroformo 256, 292, 303, 339 y 357 nm. Estos valores de λ_{\max} son semejantes a los reportado por Mustiga (14).

Después se preparó una muestra usando como solvente de desplazamiento etanol. Se observan los valores siguientes de longitudes de onda máxima λ_{\max} 246, 285, 297sh, 330, 346 nm, que son valores semejantes a los reportados por Ross Kelly T (11); lo que prueba que el compuesto aislado de *C. cuneatus* corresponde a Taspina.

3.4. Procedimiento y análisis de datos

Las etapas del procesamiento de la muestra para la obtención de Taspina se muestra en el siguiente diagrama de bloque. (Ver figura 4)

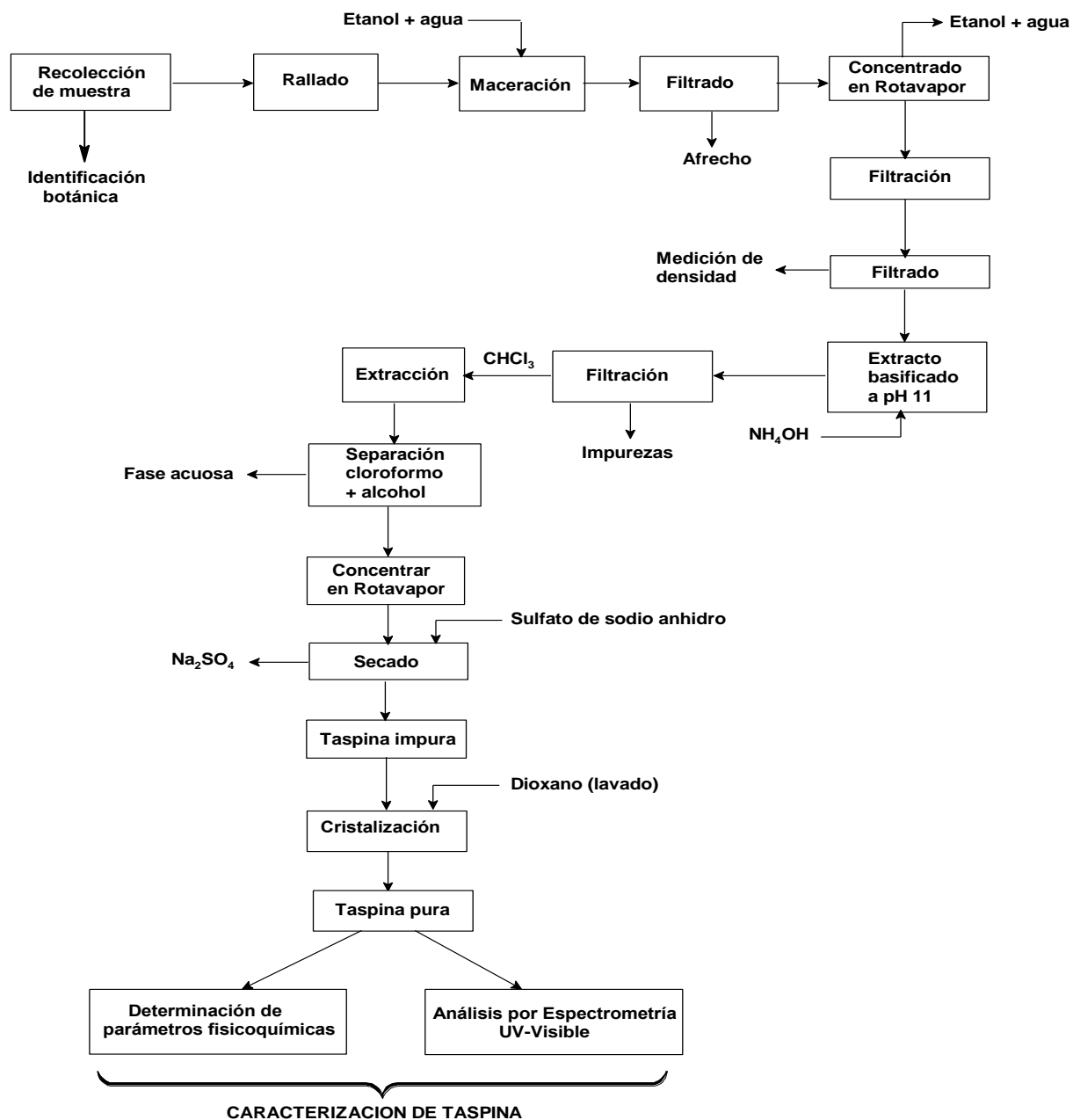


Figura 4. Diagrama de bloques de la obtención de taspina y su caracterización

Las etapas del proceso son los siguientes: Recolección e identificación de la muestra botánica, reducción a serrín, maceración, filtración, concentración, filtración, basificación, extracción con cloroformo, concentración, secado, cristalización, determinación de las pruebas fisicoquímicas y medición por espectrometría UV-visible.

3.5. Aspectos éticos

Al aislar Taspina de la corteza de una rama de la especie *C. cuneatus* no fue amenazada en su dinámica de crecimiento y propagación, porque la muestra que se extrajo corresponde al órgano de una rama del árbol que se renuevan permanentemente en su desarrollo normal.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Rendimiento de Taspina

El rendimiento de taspina de *C. cuneatus* es la relación proporcional entre el peso del producto sobre el peso de la materia prima expresado en valor porcentual, de 1074 g de muestra se obtuvo 2,432 g de taspina, dando un rendimiento de 0,23% (ver anexo 5).

4.2 Valores de los parámetros fisicoquímicos

Punto de fusión de Taspina es de 252,88°C, la rotación óptica +7,6, el peso molecular dio 369,371 g/mol. Los valores Rf se muestran en la tabla 1, los cálculos (ver anexo 8).

Tabla 1. Valores Rf de la Taspina con diferentes solventes de corrida.

Solvente de corrida	Frente de solvente (cm)	Corrida del soluto (cm)	Valores Rf
Diclorometano: metanol (20:1)	16	11,2	0,7
Cloroformo: dietilamina (18:2)	16	8,25	0,52
Cloroformo: acetona (18:9).	16	2,4	0,15

4.3. Mediciones de longitud de onda

El barrido de las longitudes de onda en cloroformo para taspina mostró las siguientes longitudes de onda λ_{\max} Cloroformo 256, 292, 303, 339 y 357 nm, en etanol λ_{\max} EtOH 246, 285, 297sh, 330, 346 nm.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Mustiga *et al* (14) aisló taspina del látex de *C. lechlerii* (sangre de grado), obtuvo un rendimiento de 0,67%. Mientras que en *C. cuneatus* se obtuvo un rendimiento de 0,23%, ambos resultados difieren a pesar que son del mismo género, esto implica que cada especie produce diferentes cantidades de metabolitos. Por otra parte, Vanessa (27) reporta que el contenido de taspina en el látex de *C. lechlerii* (sangre de grado) varía en un rango del 1,3% al 20,4% respecto a peso seco, con una media de un 9%, estos valores difieren ampliamente reportados por Mustiga para *C. lechlerii*, en cuanto a contenido de taspina en la especie de *C. cuneatus* no hace mención alguna. Pero en nuestro estudio se logró aislar taspina de *C. cuneatus* con un rendimiento por debajo de lo que reportó Vanesa (27).

Vaisberg *et al.* (1), aisló taspina del látex de *C. lechlerii* (sangre de grado), obtuvo un rendimiento de 0,09%, de igual forma Pieters reporta un rendimiento de 0,085% de taspina del látex de sangre de grado. Estos resultados son coincidentes, sin embargo, el rendimiento obtenido en *C. cuneatus* es de 0,23% mayor a los reportados por Vaisberg y Pieters.

Lock y Rojas en su estudio de la sangre de grado señala que el porcentaje de rendimiento de taspina varía entre 1,2 a 20,4 %, asimismo en las hojas de *C. lechlerii* varía de 0,1 a 1,4%, estos valores es producto del análisis de 500 muestras de látex y de hojas de 260 árboles, mientras que de *C. cuneatus* se obtuvo un rendimiento de 0,23%, estos resultados difieren un poco quizás porque son de diferentes especies, además se puede señalar que *C. palanostigma* es una de las tres especies del que se ha aislado la taspina. Por otro lado, Arbildo y Pérez (28) aislaron taspina de dos muestras del látex de sangre de grado de *C. lechlerii*, el rendimiento fue de 7,2% y 6,45% respectivamente, estos resultados están dentro de los valores reportados por Vanessa para taspina de *C. lechlerii*. Además, esta especie es una de las más estudiadas como fuente alcaloide taspina. Mientras que la especie *C. cuneatus* no ha sido considerado como fuente de taspina.

Montopoli *et al* (9) en el año 2012 aisló taspina de la savia de *C. lechlerii*, una de las características fisicoquímicas que determinó fue la densidad de la savia cuyo valor fue 1,08 g/ml. Asimismo, en nuestro estudio se determinó la densidad del exudado de *C. cuneatus* que fue de 1,074 g/ml. En ambos estudios los valores obtenidos son coincidentes, esto muestra que la naturaleza de la savia de *C. lechlerii* y el exudado de *C. cuneatus* son similares, además permite establecer con mayor precisión el rendimiento de la sustancia aislada en soluciones (30).

Obando *et al* (8) en el año 2015 estudió el alcaloide de *C. draconoides* y determinó por cromatografía de capa fina el valor de Rf del alcaloide representativo taspina de 0,452. El valor de Rf que se determinó del alcaloide taspina aislado de *C. cuneatus* fue de 0,52. Los valores de Rf obtenidos en ambos estudios son diferentes porque los solventes de la fase móvil utilizado son diferentes, además, el valor de Rf que obtuvo Obando es referencial para alcaloides de la savia no fue de taspina aislada, mientras que en nuestro estudio el valor de Rf es del compuesto puro aislado de *C. cuneatus*.

Vaisberg *et al* (1) en su estudio de sangre de grado identificó taspina por RMN, IR y UV, pero no mostró los valores de los análisis, Asimismo, Altieri (29) identificó a la taspina por análisis espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) después de haber realizado la síntesis a partir de ácido ferúlico. En cambio, en nuestro estudio se identificó por TLC los valores de Rf con diferentes solventes de corrida. La identificación realizado por Vaisberg y Altieri de la taspina fue de su estructura molecular, ambos estudios determinaron el 1-[2-(Dimethylamino)ethyl]-3,8-dimethoxychromeno[5,4,3-cde]-chromene-5,10-dione (taspina). Mientras que la identificación realizada de taspina aislada de *C. cuneatus* fue sus características físicas de esta molécula como el Rf, peso molecular y las longitudes de onda de absorción máxima que ésta tiene, las mismas que fueron coincidentes con los valores de la literatura.

Ross y Xie *et al* (11) realizaron un análisis retro sintético de taspina y determinaron la estructura molecular de la taspina que fue exactamente igual al determinado por Vaisberg y Altieri (1,29), además por análisis TLC determinó el valor de Rf de 0,7, el peso molecular por análisis de HRMN fue de 370,1291 g/mol. En el estudio que se realizó de *C. cuneatus* del que se aisló taspina, el valor de Rf que se determinó fue de 0,7, también se determinó el peso molecular por método de Rast, cuyo valor fue de 369,371 g/mol. En ambos estudios los valores de Rf son iguales porque se usaron los mismos solventes de corrida, en cuanto al peso molecular los valores son coincidentes con una pequeña diferencia, esto se debe a que el análisis usado por Ross y Xie (11) fue directo por HRMN, mientras que el análisis que se usó fue indirecto.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN

Usando un litro del extracto acuoso de la corteza de *C. cuneatus* se ha aislado y purificado la taspina obteniendo 2,343 g que representa un rendimiento de 0,23%.

Los métodos de caracterización fisicoquímicos, utilizando como patrón de referencia la Taspina y el aislado de *C. cuneatus* dieron valores similares, punto de fusión 252,88°C, rotación óptica +7,6, peso molecular por el método de Rast 369,371 g/mol.

Los valores R_f en cromatografía de capa fina (TLC) utilizando Sigel F₂₅₄ y una mezcla de solventes empleados para la corrida cromatográfica dio el valor de 0,7; 0,52 y 0,15 respectivamente, los valores obtenidos confirman que *C. cuneatus* posee taspina.

El porcentaje de alcaloide obtenido de *C. cuneatus* no es desdeñable siendo que la Taspina tiene una gran importancia como molécula biológica, por lo que la especie *C. cuneatus* sería una fuente prometedora de taspina.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Al Ministerio del Medio Ambiente y al Ministerio de Agricultura incorporar en los programas de reforestación la siembra de *C. cuneatus* y de las otras especies de Croton como *C. lechlerii* y *C. palanostigma* que contienen Taspina de gran importancia medicinal que pueda trascender su uso en la industria farmacológica y de productos Fitoterapéuticos.
- Realizar proyectos para la elaboración de cremas dérmicas de uso tópico de Taspina porque tiene actividad cicatrizante, antihemorrágica dado que tiene potente actividad fibroblástica.
- A la Facultad de Agronomía realizar almácigos de este género, para su repoblamiento mediante una adecuada reforestación, para que se constituya en un recurso natural que sería fuente segura para la obtención de este alcaloide bioquímicamente activo.

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vaisberg A, Milla M, Planas M del C, Cordova J, Rosas de Agusti E, Ferreyra R, et al. Taspine is the Cicatriz ant Principle in Sangre de Grado Extracted from Croton lechleri. *Planta Med.* 1989;55(2):140-3.
2. Ayala S, Jurupe H, Díaz D, Lock O, Vega M, Luque J, et al. Efecto protector de látex desecado y fracción alcaloidea de Croton palanostigma frente a injuria de mucosa gástrica inducida por etanol en ratas. *An la Fac Med.* 2001;62(4):317-24.
3. Gupta D, Bleakley B, Gupta RK. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *J Ethnopharmacol.* 2007;115(3):361-80.
4. Lopes TV, Félix SR, Schons S de V, Nobre M de O. Dragon's blood (Croton lechleri Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review . *Rev Bras Hig e Sanidade Anim.* 2013;7(2):167-91.
5. Soukup J. vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. Catálogo de plantas. Primera Ed. Lima-Peru: Editorial Salesiana; 1970.
6. Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY. Systematic Identification of Organic Compounds. Quinta Edi. New York: Editorial Wiley N.Y; 1965.
7. Pona A, Cline A, Kolli SS, Taylor SL, Feldman SR. Review of future insights of Dragon's Blood in dermatology. *Dermatol Ther.* 2019;32(2):1-21.
8. Obando Barrera LH. Estudio de los alcaloides de Croton draconoides "sangre de grado", su actividad cicatrizante y el diseño de una forma farmacéutica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
9. Montopoli M, Bertin R, Chen Z, Bolcato J, Caparrotta L, Frolidi G. Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *J Ethnopharmacol [Internet].* 2012;144(3):747-53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.032>
10. TAMARIZ ORTIZ JH, CAPCHA MENDOZA R, PALOMINO CADENAS EJ, AGUILAR OLANO J. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (Croton lechleri) frente al Helicobacter pylori. *Rev Medica Hered.* 2003;14(2):81-103.
11. Ross KT, Xie RL. Total Synthesis of Taspine. *J Org Chem.* 1998;63:8045-8.
12. Pieters L. La Sangre de Grado" una droga Tradicional de Sudamérica constituyentes biológicamente activos. Ecuador: Editorial Abya – yela; 1998.
13. De Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Venezuela: Editorial Universidad Cenral de Venuezuela; 1991. 320 p.
14. Mustiga M del C. Aislamiento y caracterización del alcaloide Taspina del látex de Croton lechlerii (sangre de grado). Pontificia UNiversidad Católica del Perú;

1982.

15. Shamma M, Moniot JL. A biogenetically patterned conversion of palmatine into Taspine. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*. New York; 1971.
16. Oré Rengifo MI, Arakaki Makishi MDA, Riina RDCD. Caracterización morfológica y molecular de las especies del género *Croton* L. (Euphorbiaceae) denominadas “sangre de grado” en la Amazonía peruana [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019. Disponible en: Ore_rm.pdf
17. Risco E, Ghia F, Iglesias J, Álvares E, Cañagueral S. La actividad inmunomoduladora y caracterización química de sangre grado de *Croton lechlerii*. *Planta Med*. 2003;69(9):785-94.
18. Vaz Lopes T, Rodrigues Félix S, de Vargas Schons S, de Oliveira Nobre M. Dragon's blood (*Croton lechleri* Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. *Rev Bras Hig e Sanidade Anim*. 2013;7(2):167-91.
19. Alonso-Castro AJ, Ortiz-Sánchez E, Domínguez F, López-Toledo G, Chávez M, Ortiz-Tello ADJ, et al. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012;140(2):438-42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.009>
20. Bruneton J. *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. Primera Ed. España: Editorial Acribia S.A; 1991.
21. Dominguez X. *Métodos de investigación Fitoquímico*. Primera Ed. México: Editorial. Limusa; 1979. 212, 226 p.
22. Stahl E. *Thin Layer Chromatography* Spring Verlag. Berlin: Heidelberg. N.Y; 1969.
23. Silverstain RM, Bessler GC, Morrill TC. *Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos*. México: Editorial Diana; 1980. 243, 267 p.
24. Hernandez Sampieri R, Fernandez Collado C, Baptista Lucio M del P. *Metodología de la investigación*. Quinta Edi. INTERAMERICANA EDITORES SADC., editor. México: McGraw Hill; 2010. 656 p.
25. West RCJ, Beyer W. *Handbook of Chemistry and Physics*. USA: Editorial CRC-Press; 1988. F-10.
26. Stecher PG. *The Merck Index*. Merck, editor. New York: Merck y CO, Inc, Rahway N.Y USA; 1968.
27. Vanessa C, Sandoval M. Bases químicas y farmacológica de la utilización de la sangre de drago. *Rev Fitoter*. 2005;5(2):101-14.
28. Arbildo Tello L, Pérez Macedo JE. RENDIMIENTO DE TASPINA AISLADA DE 2 MUESTRAS DE *Croton lechlerii* (SANGRE DE GRADO) DE LAS CUENCAS DEL BAJO NANAY Y ALTO NAPO RESPECTIVAMENTE. Universidad

Nacional de la Amazonía Peruna; 2014.

29. Altieri A, Franceschin M, Nocioni D, Alvino A, Casagrande V, Scarpati ML, et al. Total synthesis of taspine and a symmetrical analogue: Study of binding to G-quadruplex DNA by ESI-MS. *European J Org Chem.* 2013;(1):191-6.
30. Frolidi G, Zagotto G, Filippini R, Montopoli M, Dorigo P, Caparrotta L. Activity of sap from *Croton lechleri* on rat vascular and gastric smooth muscles. *Phytomedicine* [Internet]. 2009;16(8):768-75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.003>

Anexos

Anexo 1. Constancia de la identificación botánica de *C. Cuneatus*



Centro de Investigación de
Recursos Naturales
Herbarium Amazonense - AMAZ

INSTITUCION CIENTIFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO
CODIGO DE AUTORIZACION AUT-ICND-2017-005

CONSTANCIA

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por SAID RAFAEL SÁNCHEZ GUERRA Y LUIS ANTONIO ARCE PACAYA, Bachiller de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, pertenece a la tesis titulada: "CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y CROMATOGRÁFICA DE TASPINA DE *Croton cuneatus* Klotzch (puma sachá)"; han sido DETERMINADAS en este centro de Investigación y Enseñanza, Herbarium Amazonense-AMAZ, del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la UNAP-CIRNA-UNAP, como se indica a continuación:

Código AMAZ	Familia	Nombre Científico	Nombre Común
023326	EUPHORBIACEAE	<i>Croton cuneatus</i> Klotzsch	"purma caspi"

Se expide la presente constancia a los interesados, para los fines que estime conveniente,

Purma caspi
Atentamente,

Iquitos, 15 de junio del 2021


Richard J. Huasancá Acostupa
Coordinador Herbarium Amazonense



Anexo 2. Recoleccion de muestra y procesamiento.



Recolección e identificación botánica de la materia prima

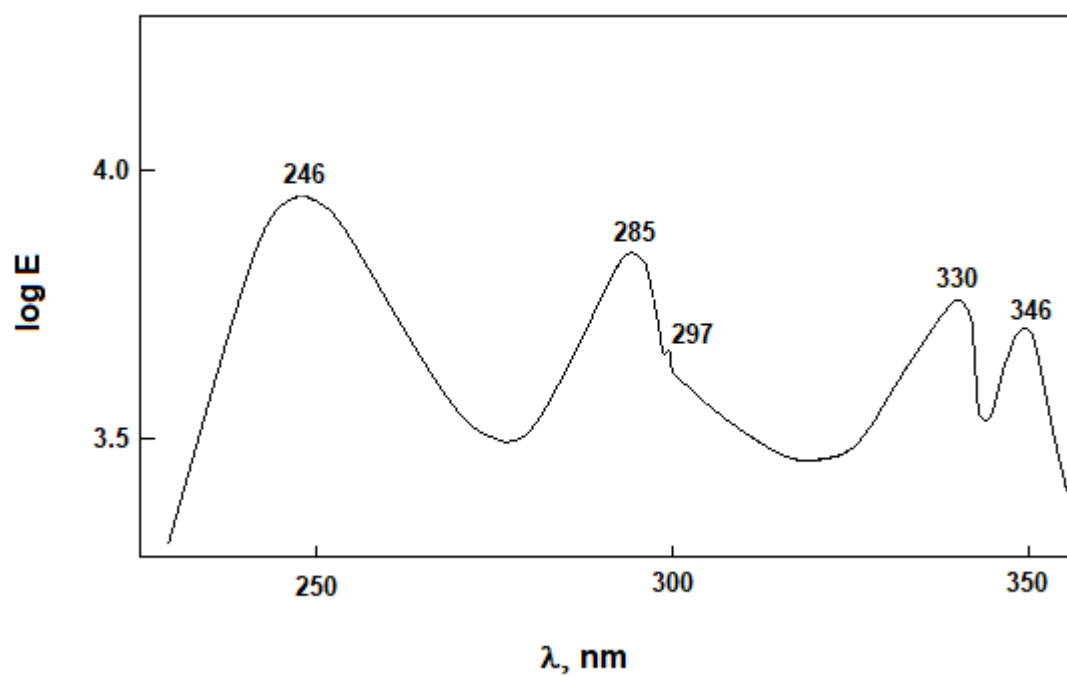


Procesamiento de la muestra



Taspina cruda

Anexo 3. Espectro UV – Visible de Taspina en Etanol



ANEXO 4. Cálculo para hallar la densidad del extracto acuoso de *C. cuneatus*

Peso de picnómetro vacío: 64,0521 g (I)

Se llenó el picnómetro con agua destilada libre de gas y se pesó

Peso de picnómetro más agua: 161,0230 g (II)

Se sustrajo al (II) el valor de (I) para obtener la masa de agua.

$$\text{II} - \text{I} \rightarrow 161,0230 - 64,0521 = 96,9709 \text{ g}$$

Para los cálculos se aplicó la fórmula siguiente:

$$\rho = \frac{m}{V} \text{ (A)}$$

En esta expresión se conoce la masa del agua: 96,9709 g.

Densidad de agua a 30°C es 0,99567 g/cm³

Despojando de (A) el volumen

$$\rho = \frac{m}{v} \rightarrow v = \frac{m}{\rho} = \frac{96,971}{0,99567} = 97,3927 \text{ cm}^3 \text{ o } 97,3927 \text{ ml}$$

El volumen obtenido es el volumen del agua, pero a su vez es el volumen de picnómetro a 30°C de temperatura experimental.

Peso del picnómetro + extracto acuoso de *C. cuneatus* = 168,621 g (III)

Se sustrae a III el valor de I para obtener el peso o masa del extracto acuoso.

$$\text{masa del extracto acuoso} = 168,621 - 64,0521 = 104,5689 \text{ g}$$

Como el volumen de picnómetro también es equiparable con el volumen del extracto acuoso, entonces se calcula la densidad del extracto acuoso de *C. cuneatus*.

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{104,5689 \text{ g}}{97,3927 \text{ cm}^3} = 1,074 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

Se obtuvo una densidad de 1,074 g/cm³

Anexo 5. Cálculo del rendimiento de taspina

Volumen del extracto acuoso de *C. cuneatus* 1000 cm³

Densidad extracto acuoso de *C. cuneatus* 1,074 g/cm³

Con estos datos se calcula la masa del extracto acuoso obtenido

$$m = \rho \cdot V \rightarrow m = 1,074 \cdot 1000 = 1074 \text{ g}$$

Para hallar el rendimiento se aplica la siguiente relación

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto auoso} \times 100}{\text{Peso materia prima}} = \frac{2,432 \text{ g} \times 100}{1074 \text{ g}} = \frac{243,20 \text{ g}}{1074 \text{ g}} = 0,226\%$$

La corteza de *C. cuneatus* contienen 0,226% de taspina.

ANEXO 6. Obtención de clorhidrato de taspina

Peso de clorhidrato de taspina

Peso de la taspina + peso del ácido clorhídrico: $369 + 36,5 = 405,5$ g (I)

Para preparar el clorhidrato de taspina se usó 26 ml = $0,026$ litros de HCl $0,1$ N

Se halla el peso del HCl con la siguiente relación

$$N = \frac{n_{\text{Equi}}}{V} \rightarrow n_{\text{Equi}} = N \cdot V \rightarrow \frac{m}{P_{\text{Equi}}} = N \cdot V \rightarrow m = N \cdot V \cdot P_{\text{Equi}}$$

$$m_{\text{HCl}} = 0,1 \cdot 0,026 \cdot 36,5 \rightarrow m_{\text{HCl}} = 0,0949 \text{ g}$$

Aplicando la estequiometría química se halla el peso de la taspina.

$$m_{\text{taspina}} = 369 \text{ g taspina} \left| \frac{0,0949 \text{ g HCl}}{36,5 \text{ g HCl}} \right| = 0,9594 \text{ g}$$

Luego se halla el clorhidrato de taspina

$$m_{\text{clorhidrato de taspina}} = 0,9594 + 0,0949 = 1,0543 \text{ g}$$

El peso real pesado en la balanza fue de $1,0482$ g

Anexo 7. Determinación del peso molecular de taspina

Punto de fusión de la mezcla del componente y D-camphor: 169,252°C

Punto de fusión del D-camphor: 180°C

Se halla la diferencia del punto de fusión

$$\Delta T = 180 - 169,252 = 10,748 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Aplicando la formula

$$M = \frac{k \cdot p \cdot 1000}{\Delta T \cdot P}$$

Sabiendo que

K= Depresión molar del D-camphor 39,7

p= peso de la muestra 50 mg= 0,05 g

P= peso del D-camphor 0,5 g

$$\Delta T = 10,748$$

$$M = \frac{39,7 \cdot 0,05 \cdot 1000}{10,748 \cdot 0,5} = \frac{1985}{5,374} = 369,371 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Se obtuvo un valor de 369,371 g/mol, valor muy cercano al valor de 369 g/mol que es el peso molecular de taspina, siendo el porcentaje de error el siguiente.

$$\%error = \left(\frac{\text{Peso molecular experimental} - \text{Peso molecular real IUPAC}}{\text{Peso molecular experimental}} \right) \cdot 100$$

$$\%error = \left(\frac{369,371 - 369}{369,371} \right) \cdot 100 = \frac{0,371}{369,371} = 0,10\%$$

Este valor es un error insignificante que expresa una evidente exactitud del método de Rast en la determinación del peso molecular lo cual es semejante al peso molecular IUPAC de la Taspina.

Anexo 8. Determinación de los valores de Rf de taspina

A. Solvente de corrida una mezcla de [diclorometano: metanol] (20:1).

Los valores de las distancias corridas por el sólido y solvente fueron las siguientes:

Distancia recorrida por el sólido y soluto patrón 11,2 cm

Distancia recorrida del solvente 16 cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida del soluto}}{\text{Distancia recorrida del sovente}} \times 100$$

$$Rf = \frac{11,2}{16} \times 100 = 0,7$$

Este valor es coincidente para taspina reportado por Ross *et al.*

B. Solvente de corrida una mezcla de [cloroformo: dietilamina] (18:2).

Los valores de las distancias corridas por el sólido y solvente fueron las siguientes:

Distancia recorrida por el soluto 8,25 cm

Distancia recorrida por el solvente 16 cm

$$Rf = \frac{8,25}{16} \times 100 = 0,52$$

Este valor de Rf encontrado coincide con el valor reportado por Pieters para taspina.

C. Solvente de corrida una mezcla de [cloroformo: acetona] (18:9).

Los valores de las distancias corridas por el sólido y solvente fueron las siguientes:

distancia recorrida por el soluto 2,4

distancia recorrida por el solvente 16

$$Rf = \frac{2,4}{16} \times 100 = 0,15$$

Este valor de Rf encontrado coincide con el valor reportado por Pieters para taspina.