



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE FITOESTEROIDES
EN PLANTAS Y LA POSTERIOR SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA HPLC

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

Ph.D. Eduardo Tejera Puente

Autora

Andrea Stephanie Beltrán Noboa

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Desarrollo de un método de extracción de fitoesteroides en plantas y la posterior separación por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, a través de reuniones periódicas con la estudiante Andrea Stephanie Beltrán Noboa, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Eduardo Tejera Puente

Doctor en Ciencias Farmacéuticas – Especialidad Bioquímica

CI: 1756501977

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Desarrollo de un método de extracción de fitoesteroides en plantas y la posterior separación por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, de la estudiante Andrea Stephanie Beltrán Noboa, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

José Miguel Álvarez Suarez

Doctor en Alimentación y Salud

CI: 1756653372

DECLARACION DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es originalmente de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Andrea Stephanie Beltrán Noboa

C.I. 1724018211

AGRADECIMIENTOS

A mi docente guía, Doctor Eduardo Tejera por su guía y sobre todo su ayuda incondicional en el desarrollo de este proyecto.

De manera especial a Genoveva Granda por toda la ayuda, guía, y excelente calidez humana que apporto en el trabajo de titulación y a mi desempeño personal.

Al Doctor José Miguel Álvarez, por su acompañamiento y apoyo a lo largo de mi trabajo de tesis. A la Dirección general de Investigación de Universidad de las Américas, por su apertura y seguimiento a lo largo del proyecto.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Dios por ser fuente de inspiración y luz en mi camino. Dedico todo este trabajo a mi mamá, este logro también es tuyo, gracias por ser mi motor de vida. A mi papá por enseñarme que para ser grandes en la vida primero debemos ser humildes y así triunfamos. A aquellos amigos que son más que hermanos, mi hermano y amada familia.

De manera especial quisiera dedicar mi tesis a mi tutor, por ser inspiración para mí en muchos aspectos, por su calidez humana, por todo lo que aportó en mi vida profesional y personal.

RESUMEN

La identificación de nuevos compuestos provenientes de la línea de productos naturales ha despertado el interés por sus posibles aplicaciones en el área médica y farmacéutica. Esta línea de investigación se centra en el aislamiento e identificación de compuestos bioactivos provenientes de plantas que presentan una alta gama de propiedades biológicas de interés para la salud. Dentro de este grupo podemos destacar los fitoesteroides o esteroides de origen vegetal. Los fitoesteroides son metabolitos secundarios, presentes en casi todas las plantas, a los cuales se les ha atribuido propiedades biológicas como son funciones antiinflamatorias, analgésicas e incluso posibles aplicaciones anticancerígenas como es el caso del B-sitosterol, uno de los esteroides más abundantes en la naturaleza. Al conocer la importancia de aislar estos compuestos bioactivos de forma eficaz, se requiere metodologías aplicables a un amplio rango de plantas. Por esta razón el objetivo de este proyecto de investigación consistió en desarrollar una metodología general para la extracción, separación e identificación de estos compuestos mediante la técnica analítica cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), una de las técnicas más empleadas en análisis de extractos de plantas por su sensibilidad y selectividad. Se probaron diferentes métodos de extracción sólido-líquido con varios solventes orgánicos, entre ellos se puede destacar la extracción con cloroformo y su posterior resuspensión en metanol, el cual fue el método óptimo. En el análisis HPLC se probaron dos métodos de corrida, los solventes empleados como fase móvil tenían diferente polaridad, y se varió el gradiente para favorecer la separación de compuestos. Se identificó compuestos similares presentes en todas las especies de plantas analizadas.

ABSTRACT

The identification of new compounds from the line of natural products has aroused the interest for its possible applications in the medical and pharmaceutical area. This line of research focuses on the isolation and identification of bioactive compounds from plants that have a high range of biological properties of interest for health. Within this group we can highlight the phytosteroids or steroids of vegetable origin. Phytosteroids are secondary metabolites, present in almost all plants, which have been attributed biological properties such as anti-inflammatory, analgesic and even possible anticancer applications as is the case of B-sitosterol, one of the most abundant sterols in the nature. By knowing the importance of isolating these bioactive compounds effectively, methodologies applicable to a wide range of plants are required. For this reason, the objective of this research project was to develop a general methodology for the extraction, separation and identification of these compounds through the analytical technique liquid chromatography of high efficiency (HPLC), one of the most used techniques in analysis of extracts of plants for their sensitivity and selectivity. Different solid-liquid extraction methods were tested with several organic solvents, among which we can highlight the extraction with chloroform and its subsequent resuspension in methanol, which was the optimal method. In the HPLC analysis two run methods were tested, the solvents used as mobile phase had different polarity, and the gradient was varied to favor the separation of compounds. Similar compounds present in all plant species analyzed were identified.

ÍNDICE

1.	Capítulo I. Introducción	1
1.1	Antecedentes.....	1
1.2	Planteamiento del Problema.....	3
1.3	Objetivos	4
1.4	Justificación de la investigación	4
2.	Capítulo II. Marco Teórico.....	5
2.1	Compuestos Bioactivos presentes en plantas.....	5
2.2	Esteroles.....	6
2.2.1	Fitoesteroles	9
2.2.2	Fuentes de Fitoesteroles	11
2.2.3	Tipos de Fitoesteroles	12
2.3	Aplicaciones de los Fitoesteroles	12
2.3.1.	Agentes Reductores de Colesterol:	13
2.3.2.	Actividad Anticancerígena	13
2.3.3	Actividad Antiinflamatoria.....	14
2.4	Extracción e identificación de Fitoesteroles	15
2.4.1	Métodos Generales de Extracción.....	15
2.5	Técnicas de Separación	18
2.5.1	HPLC.....	19
2.5.2	Separación por HPLC.....	19
2.6	Absorción ultravioleta para esteroides	22
2.7	Pruebas Colorimétricas para Esteroides	24
2.7.1	Reacción Liebermann- Burchard	25
2.7.2	Reacción de Salkowski.....	26
3.	Capítulo III. Metodología.....	26
3.1	Preparación y conservación de muestras.....	26
3.2	Extracción con metanol.....	27
3.3	Extracción con cloroformo.....	27

3.4	Extracción Éter Etílico y Metanol al 80%	28
3.5	Pruebas Cualitativas	28
3.5.1	Reacción Liebermann -Burchard.	28
3.5.2	Prueba de Salkowski	29
3.6	Análisis HPLC	29
3.6.1	Condiciones de HPLC	29
4.	Capítulo IV. Resultados y Discusión.....	30
4.1	Cromatogramas de plantas Método 1.	30
4.1.1	Selección de Compuestos Semejantes	31
4.2	Cromatogramas de Plantas. Método 2.....	33
4.2.1.	Selección de Compuestos Semejantes	33
5.	Conclusiones y Recomendaciones	38
5.1	Conclusiones.....	38
5.2	Recomendaciones.....	39
	REFERENCIAS	40
	ANEXOS	49

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

Los fitoesteroides, denominados también como fitoesteroles son esteroides provenientes de plantas. Forman parte de un grupo de alcoholes esteroideos que presentan estructuras químicas muy semejantes al colesterol, pero a diferencia de esta última, presentan un grupo metilo o etilo extra (Atif B. Awad & Fink, 2000). Se han reportado más de 100 tipos de fitoesteroles en diferentes especies de plantas, dentro de los más abundantes se encuentran el sitoesterol, stigmasterol y campesterol (Fernandes & Cabral, 2007). Encontrándose en casi todas las partes de las plantas (tallos, hojas y frutos) (Valenzuela B. & Ronco M., 2004). Una de las principales fuentes de fitoesteroides son los aceites vegetales, los cuales provienen de plantas tales como soja, girasol y maíz en donde se los encuentra en mayor cantidad (Suhad S. AbuMweis y Peter J.H. Jones, 2009).

Una de las principales aplicaciones de los fitoesteroles radica en el área medicinal y farmacéutica, ya que las plantas producen una amplia fuente de compuestos análogos que pueden ser empleados para el estudio de su estructura y actividad en diferentes aplicaciones (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001). Dentro de las principales aplicaciones farmacéuticas de los esteroides o esteroides vegetales está la de actuar como agentes reductores de colesterol. Una de las moléculas más empleadas para este fin era el sitoesterol, sin embargo, en esta última década se han empleado adicionalmente otras moléculas derivadas de los estanoles vegetales. Ambas clases de compuestos tienen la función de inhibir competitivamente la absorción de colesterol por lo que disminuye su nivel en plasma (Cantrill, Richard; Kawamura, 2008).

Otra de las aplicaciones farmacéuticas de gran importancia de los esteroides vegetales es su actividad antiinflamatoria. En estudios animales, se ha identificado funciones preventivas de los fitoesteroides en la colitis inducida y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Aldini et al., 2014).

Los efectos antiinflamatorios inducidos tanto por esteroides como por estanoles vegetales se han demostrado en estudios *in vitro* y en modelos animales experimentales, pese a esto es necesario realizar investigaciones más a fondo (Vilahur, Ben-Aicha, Diaz, Badimon, & Padro, 2018). Adicionalmente, algunos estudios mencionan la posible capacidad anticancerígena de unos de los fitoesteroides más estudiados como el B- sitoesterol (Piironen, Lindsay, Miettinen, Toivo, & Lampi, 2000).

La purificación es un proceso a través el cual partir de muestras de plantas se aíslan compuestos puros, para esto se requiere un procedimiento que implica múltiples pasos, como son: extracción, pre-purificación y uno o varios pasos de cromatografía. Además, se emplean métodos de extracción y partición por solventes orgánicos seguido de un proceso de cromatografía en los que se puede destacar la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Dinan et al., 2001).

La técnica HPLC es una de las más empleadas para realizar análisis de extractos de plantas. En comparación de otras técnicas clásicas como TLC por sus siglas en inglés (Thin Layer Chromatography), HPLC realiza separaciones más rápidas, precisas y proporciona una alta resolución y sensibilidad que favorece a la identificación de compuestos en muestras de plantas (Kumar Ph Scholar et al., 2017)

Dentro de HPLC uno de los métodos más empleados para la identificación de compuestos esteroidales es la cromatografía de fase reversa. Debido a que es uno de los métodos más utilizados para la separación de compuestos, en esta técnica la fase estacionaria es de naturaleza no polar y la fase móvil presenta mayor polaridad que la estacionaria (M V Moreno-Arribas and M C Polo, 2003).

1.2 Planteamiento del Problema

Las plantas medicinales son aquellas a las que se ha atribuido un potencial terapéutico debido a las propiedades biológicas de ciertos metabolitos de interés que se encuentran presentes en la planta, como puede ser el caso de los fitoesteroides (L. B. Araújo et al., 2013).

En estudios recientes se han desarrollado metodologías de extracción para fitoesteroides pero en especies específicas de plantas (E. L. Araújo, Randau, Sena-Filho, & Pimentel, 2008), así como estudios relevantes de fitosteroles partiendo de semillas oleaginosas (López, R. ; Vélez, 2017), sin embargo, hasta el momento no se ha desarrollado un procedimiento general que pueda ser empleado en una gran variedad de plantas.

En la caracterización de fitoesteroides en plantas, podemos observar que, si bien existen trabajos anteriores en la literatura, estos son pocos (ver Tabla 1, Anexo). Por otro lado, las metodologías empleadas varían considerablemente en lo que respecta a las estrategias de extracción, así como en los procedimientos de separación por HPLC.

Para el análisis e identificación de compuestos esteroidales se han empleado diferentes técnicas analíticas, tales como cromatografía líquida de alta

eficiencia (HPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC), pese a esto se debe tomar en cuenta factores como selectividad y sensibilidad de la técnica para aplicar el método analítico apropiado (Abidi, 2001a). Por esta razón, en ciertos casos es necesario la modificación o la variación del método para generar una buena estandarización de la técnica, tomando en cuenta las limitaciones de la instrumentación (Duong et al., 2017).

1.3 Objetivos

General:

- Desarrollar una metodología de extracción de fitoesteroides en plantas con su posterior separación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Específicos:

- Desarrollar un método de extracción sólido-líquido de fitoesteroides en plantas
- Diseñar un método de separación de fitoesteroides por cromatografía líquida de alta eficiencia

1.4 Justificación de la investigación

La importancia de los fitoesteroides radica en sus posibles aplicaciones, como reductores de niveles de colesterol en sangre, capacidad antiinflamatoria y anticancerígena. Sin embargo, realmente hay pocos estudios centrados en la caracterización de los fitoesteroides en plantas. La mayoría de los estudios se han centrado en pocas plantas y muestran una elevada heterogeneidad de métodos de extracción y purificación. La biodiversidad del Ecuador garantiza

una alta variedad en fuentes naturales de este tipo de compuestos y sus derivados, pese a esto, ningún estudio en este sentido ha sido realizado en el pasado.

Se han aplicado ciertos métodos analíticos para la detección y cuantificación de fitoesteroides en compuestos herbales, pero la técnica HPLC es la más empleada para el análisis de fitoesteroides en alimentos y compuestos herbales debido a su alta selectividad y sensibilidad (Abidi, 2001b). Otra de las ventajas que se puede confirmar en la cromatografía líquida que en el estudio de fitoesteroides tiene la capacidad de analizar el compuesto sin derivatización o cambio en el analito (Liu & Ruan, 2013).

Al no existir un método experimental general para la identificación de fitoesteroides se propone en el siguiente proyecto una metodología para la extracción, separación e identificación de fitoesteroides provenientes de diferentes tipos de plantas. Como parte de esta propuesta se ampliará el uso de la técnica HPLC en el proceso de separación de fitoesteroides.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1 Compuestos Bioactivos presentes en plantas

Las plantas son capaces de producir ciertos metabolitos los cuales pueden dividirse en dos grupos: Metabolitos primarios (PMs) y Metabolitos secundarios (SMs). La mayoría de compuestos bioactivos son producidos por metabolitos secundarios otorgando a la planta características como color, aroma y sabor. A pesar de que la clasificación de los compuestos bioactivos sea inconsistente se los puede clasificar en tres grupos principales (Fig. 1): 1. Terpenos y Terpenoides, 2. Alcaloides, 3. Compuestos Fenólicos. Los esteroides se

encuentran dentro del grupo de triterpenos por su estructura de 30 carbonos. Fomentan funciones específicas en el crecimiento en plantas, están presentes como hormonas de plantas y esteroides derivados de triterpenos (Antolak & Kregiel, 2017).

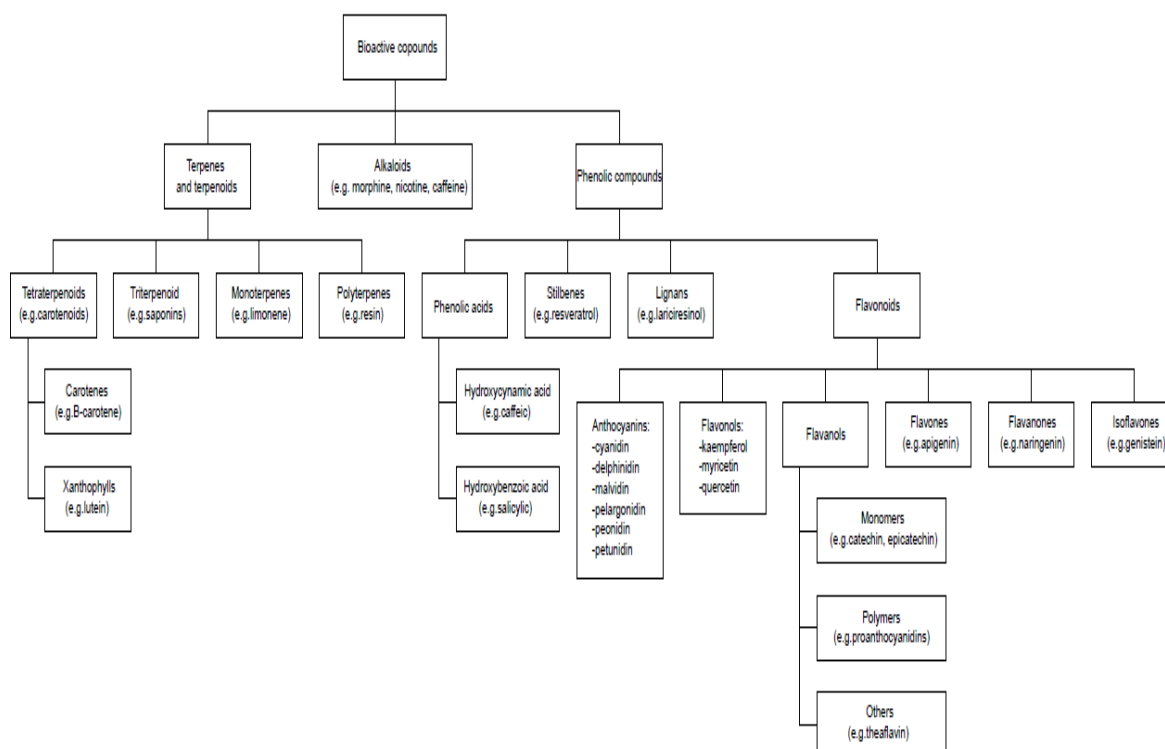


Figura 1. Clasificación General de Compuestos Bioactivos de Plantas

Tomado de: (Antolak & Kregiel, 2017)

2.2 Esteroides

Los esteroides son un grupo de compuestos naturales derivados de isoesteroides policíclicos hidroxilados de los que se conoce poseen actividades biológicas y propiedades físicas de importancia (Abidi, 2001a). Estos compuestos son sintetizados por organismos animales o plantas. Conforman una clase menos polar de compuestos esteroidales y pueden ser clasificados de acuerdo al tipo: fitoesteroides (origen vegetal), micoesteroides (origen fúngico), y zooesteroides

(origen animal). Son solubles en solventes apolares hidro- carbonados y se encuentran presentes en fracciones de lípidos que pueden ser de origen animal o de planta (Görög & Durham, 1983).

La mayoría de esteroides pueden ser caracterizados por un esqueleto esteroidal, el cual contiene grupos metilo en las posiciones 10 y 13, además, de una cadena lateral de hidrocarburo que contiene de 8-10 átomos de carbono unidos al carbono-17, un doble enlace entre C-5 y C-6 y un grupo hidroxilo en C-3. Dentro de esta familia el miembro más importante es el colesterol, el cual posee un grupo 2- (6 metil-heptilo) en C-17 formando un esqueleto de colestano (Görög & Durham, 1983)

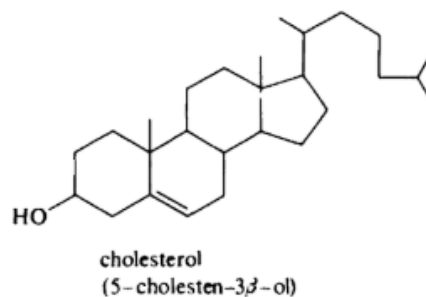


Figura 2. Estructura del colesterol.

Adaptado de: (Görög & Durham, 1983)

Los esteroides pueden presentar variaciones en el núcleo, diferencias en el sistema del anillo y variaciones en la cadena lateral (Abidi, 2001a). Se menciona tres subclases de esteroides que representan las principales variaciones (Akoh C. Casimir, 2002)

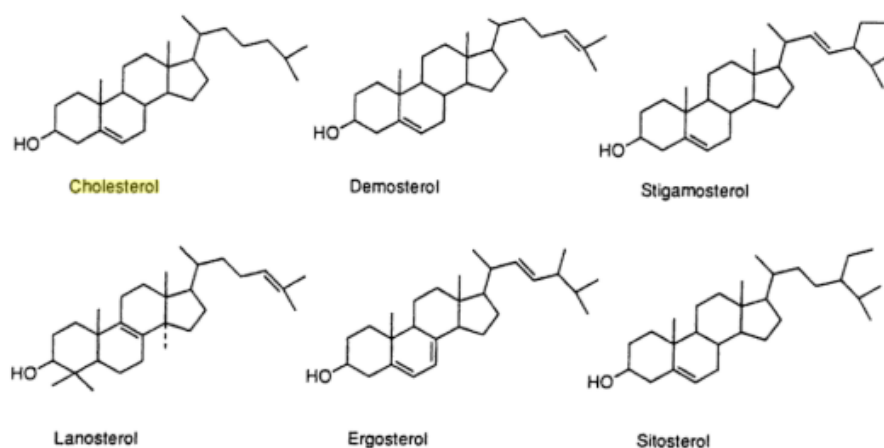


Figura 3. Principales Variaciones de esteroides
Adaptado de (Akoh C. Casimir, 2002)

Los esteroides de plantas se caracterizan por la presencia de un grupo alquilo adicional en C-24 en el núcleo de colesterol con cierta quiralidad alfa o beta (Akoh C. Casimir, 2002). En este caso se forma un nuevo compuesto de asimetría en C-24, y se derivan dos nuevas formas los esteroides ((24 S)-24 metilcolestano) = ergostano, ((24 R)-24 etilcolestano) = estigmastano (Görög & Durham, 1983).

Además, puede ocurrir el isomerismo geométrico al encontrarse con dobles enlaces en la cadena lateral, generando compuestos derivados similares. Los grupos hidroxilo - similares pueden encontrarse en varias posiciones como en lo C-1,4,7,25. A continuación se mencionan las estructuras de algunos de los esteroides más importantes (Duong et al., 2017).

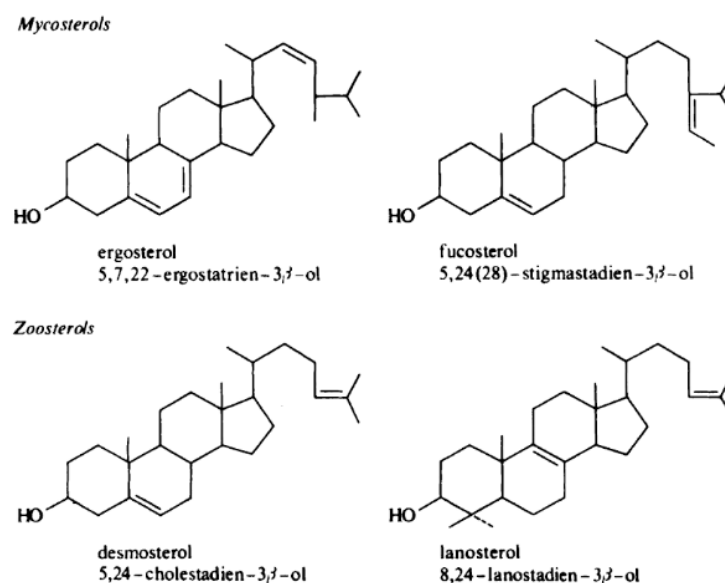


Figura 4. Estructura de Micoesteroles y Zooesteroles más relevantes.

Adaptado de: (Görög & Durham, 1983)

2.2.1 Fitoesteroles

Los fitoesteroles son esteroides de origen vegetal. Son miembros de la familia de productos naturales triterpenos, que incluyen más de 100 fitoesteroides diferentes y más de 400 tipos de triterpenos (Moreau, Whitaker, & Hicks, 2002).

Los fitoesteroides presentan estructuras semejantes al del colesterol, el núcleo está formado por cuatro anillos, un grupo 3 β -hidroxilo, además de presentar un doble enlace en la posición 5,6, lo que favorece a la función de estabilización de bicapas de fosfolípidos en las membranas celulares (Fernandes & Cabral, 2007). Poseen una estructura química muy similar al colesterol pero en la que se diferencia por su cadena lateral (Piironen et al., 2000). A diferencia del colesterol que posee una cadena lateral compuesta por ocho carbonos, los fitoesteroides generalmente presentan una cadena lateral conformada por 9 o 10 carbonos, de un total de 28 o 29 átomos de carbono (Moreau et al., 2002).

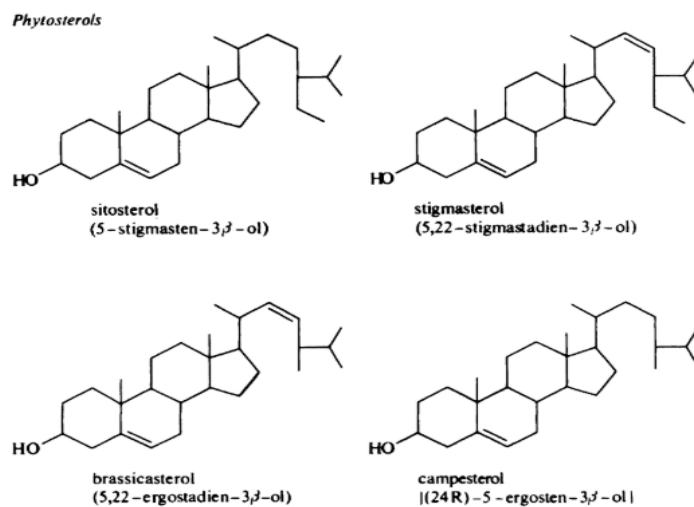


Figura 5. Estructura de los Fitoesteroles más relevantes

Adaptado de: (Görög & Durham, 1983)

En las células animales el colesterol cumple con la función de ser componente estructural de membrana, en plantas los fitoesteroles cumplen funciones análogas tales como control de fluidos de membranas y permeabilidad en plantas. Además, pueden presentarse en forma de fitoesteroles libres los cuales sirven para estabilizar las bicapas de fosfolípidos en membranas celulares de plantas (Moreau et al., 2002).

El fitoesterol más relevante de plantas y algas es el Sitoesterol, el cual conforma una amplia variedad de otros esteroides (Görög & Durham, 1983). Por otro lado, Sitoesterol y Stigmasterol son los esteroides que se encuentran de forma más extensa y abundante en plantas (Harrabi et al., 2008), sin embargo, ergoesterol es el esteroide más abundante en hongos y levaduras (Akoh C. Casimir, 2002).

2.2.2 Fuentes de Fitoesteroles

Han sido reportados más de 200 tipos de esteroides de origen vegetal provenientes de diferentes especies de plantas, en los que se mencionan en mayor cantidad algunos compuestos como B-sitosterol, stigmasterol y campesterol, los cuales conforman el 95-98% de fitoesteroides identificados (Harrabi et al., 2008).

En materiales vegetales especialmente en aceites de origen vegetal presentan esteroides en forma libre y esterificados, así como glicósidos de esteroides esterificados a glicósidos de esteroides acilados. Tanto los esteroides libres y en cierto punto los glicósidos de esteroides acilados pueden incorporarse a las membranas celulares (Piironen et al., 2000). Entre las principales fuentes de esteroides son los aceites vegetales de semillas oleaginosas, cereales, frutos secos y ciertas legumbres (Valenzuela B. & Ronco M., 2004). En ciertos aceites se pueden encontrar otro tipo de fitoesteroides en menor cantidad como son el brassicasterol, sitoestanol y el campestanol (Phillips, Ruggio, Toivo, Swank, & Simpkins, 2002). A continuación, se mencionan los principales fitoesteroides y fitoestanoles:

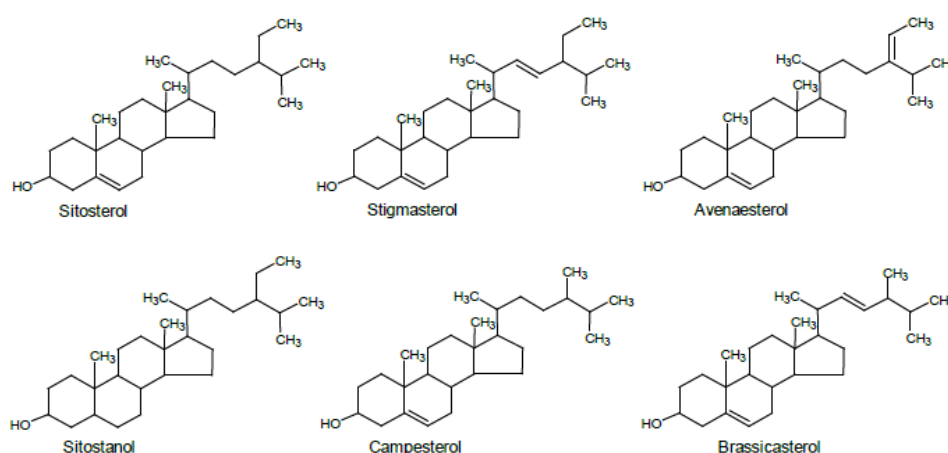


Figura 6. Estructura química de los principales fitoesteroides y fitoestanoles
Adaptado de: (Moreau et al., 2002)

2.2.3 Tipos de Fitoesteroles

Las plantas producen una amplia variedad de moléculas esteroidales, las cuales pueden ser divididas en tres categorías de acuerdo a su relevancia biológica (Dinan et al., 2001).

- En la primera categoría se encuentran moléculas que aportan con roles fisiológicos de importancia en la planta tales como hormonas o feromonas entre las que se puede mencionar los brassinosteroides, fitohormonas que promueven el crecimiento (Dinan et al., 2001).
- La segunda categoría incluye moléculas alelo químicas semejantes con hormonas animales, como los ecdisteroides las cuales son análogos a hormonas de muda de piel de insectos. Así como los andrógenos, oestrogenos, corticoesteroides se relacionan con hormonas de vertebrados (Dinan et al., 2001). Además, estas moléculas poseen la capacidad de ser precursores para la producción de hormonas farmacéuticas (Abidi, 2001).
- En la tercera categoría se encuentran sustancias alelo químicas que aportan con funciones de protección a la misma planta como acción repelente. Son encargadas de secretar sustancias tóxicas en contra de fitopatógenos animales u hongos de carácter parasitario. En esta categoría se pueden mencionar cucurbitacinas, cardenólidos, sapogeninas, y alcaloides esteroides (Dinan et al., 2001).

2.3 Aplicaciones de los Fitoesteroles

Los fitoesteroles cumplen roles en diferentes áreas, entre ellas se menciona la farmacéutica en la producción de esteroides terapéuticos, nutrición, aditivos

anti-colesterol en comidas funcionales, propiedades anticancerígenas, antiinflamatoria y cosmética (Fernandes & Cabral, 2007).

2.3.1. Agentes Reductores de Colesterol:

Varios estudios indican que los esteroides de origen vegetal son eficaces para reducir los niveles de lípidos e inhibir la absorción de colesterol. Estos compuestos presentan la misma eficiencia al estar hidrogenados o mantener su estructura simple, como es el caso de los ésteres de esteroides que favorecen la reducción de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en humanos (Patterson, 2008). El potencial de reducción de colesterol de los esteroides vegetales se debe a la solubilidad y la miscibilidad presentes en su estructura. (Fernández, Suárez, Ferruelo, Gómez-Coronado, & Lasunción, 2002).

Las variables que pueden influir en su eficacia incluyen dosis, frecuencia de administración y la dieta, por esta razón se ha fijado el interés hacia los compuestos esteroidales presentes en alimentos funcionales (Thompson & Grundy, 2005). Además, se debe mencionar el efecto de reducción de los niveles de colesterol por acción de los estanoles puede mejorarse, al ser ingeridos en una forma soluble como es el éster fitoesterílico (Meng et al., 2006).

2.3.2. Actividad Anticancerígena

Una de las aplicaciones más importantes de los esteroides vegetales es que aportan protección contra ciertos tipos de cáncer como colón, mama y próstata al ser ingeridos en la dieta (Atif B. Awad & Fink, 2000). Además, se han realizado estudios extensivos en modelos animales en los que se afirma que

los esteroides vegetales pueden suprimir el crecimiento de las células tumorales como (LNCaP y HT-29) (A B Awad, von Holtz, Cone, Fink, & Chen, 1998).

Entre los fitoesteroides más relevantes se encuentra el B- sitoesterol. En ciertos estudios se demostró el mecanismo de protección contra el cáncer mediante una regulación negativa de la síntesis de colesterol, el cual fue visualizado en las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 que fueron xenoinjertadas en ratones (Atif B. Awad, Gan, & Fink, 2000).

Mediante este hallazgo se implicó la posibilidad de que los esteroides vegetales podrían retrasar el crecimiento y prolongación de las células de cáncer de mama, por otro lado, se encontró evidencia que los esteroides vegetales pueden interferir en el desarrollo de cáncer de próstata ya que el B-sitoesterol mejoró los síntomas urinarios y las medidas de flujo en pacientes tratados (Berger et al., 2004).

2.3.3 Actividad Antiinflamatoria

Otra de las aplicaciones de gran importancia de los esteroides vegetales es su actividad antiinflamatoria. Se realizaron estudios en modelos experimentales con ratones en el cual se indujo la enfermedad de colitis, una mezcla de fitoesteroides fue suministrada antes, durante y después de la inducción de la colitis y se demostró que disminuye los efectos inflamatorios de la enfermedad (Aldini et al., 2014). En otros estudios en animales se ha atribuido a los fitoesteroides posibles funciones preventivas en diversas afecciones, y se menciona el mecanismo empleado que consta en la inhibición de secreción de mediadores inflamatorios tales como la interleucina -6 y el factor de necrosis tumoral – alfa por monocitos (Berger, Jones, & Abumweis, 2004a).

Por otro lado, recientemente se ha reportado un grupo de esteroides de plantas con estructuras específicas los cuales son conocidos por inhibir el deterioro oxidativo en aceites vegetales, funcionando como potentes agentes de anti polimerización para aceites reusados y afirmando su eficacia como agentes antioxidantes al ser ingeridos en la dieta (Vilahur et al., 2018).

2.4 Extracción e identificación de Fitoesteroides

Dentro de las técnicas más empleadas para la extracción, identificación y cuantificación de compuestos esteroidales se reportan diferentes métodos de extracción, seguido de una identificación y cuantificación por métodos cromatográficos entre los que se encuentran la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) las cuales pueden además estar acopladas a espectrómetro de masas (MS) o un detector por resonancia magnética nuclear (MNR) (Abidi, 2001a).

2.4.1 Métodos Generales de Extracción

Se presenta un proceso general de extracción y purificación de compuestos esteroidales:

- a. Extracción con solventes orgánicos, incrementando su polaridad
- b. Partición con solventes, con el fin de remover compuestos polares y menos polares.
- c. Pasos iniciales para la cromatografía.
- d. Purificación final mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Dinan et al., 2001)

Para el proceso de extracción se emplea una serie de solventes de acuerdo a la polaridad del compuesto. Por lo general se emplean solventes con alcohol, acetona, éter etílico, cloroformo o h-hexano. En la tabla 2. se menciona los tipos de esteroides de acuerdo a su polaridad.

Tabla 2.

Diferentes tipos de esteroides clasificados por su polaridad.

Propiedad	Ejemplos
No - Polares	BS (ésteres de acil grasos), BU,CA
Medianamente Polares	BS, CU, ES, SA, WI
Polares a Muy Polares	BS (glucósidos), CA(glicósidos), ES, (glicósidos, fosfatos), SS

Adaptado de: (Dinan et al., 2001)

Abreviaciones para las diferentes clases de esteroides: BS: Brassinosteroides; BU: bufadienolides; CA: cardenolides; CU: cucurbitacins; ES: eccysteroids; SA: alcaloides esteroidales; SS: saponinas esteroidales; VS: esteroides del tipo vertebrado; WI: withanolides.

El segundo paso consiste en una partición con solventes no miscibles, con el fin de obtener una recuperación del compuesto más puro removiendo contaminantes de naturaleza polares o apolares (Abidi, 2001a) . En la tabla 3. se mencionan algunos solventes empleados para la partición.

Tabla 3.

Solventes empleados para la partición.

Solventes empleados	Fase Orgánica	Fase acuosa, agua o metanol
n-Hexano- Metanol 80%	Lípidos no polares, esteroles	BS, ES, WI
Éter dietílico- Metanol acuoso	WI	
Cloroformo- Agua	BS, VS, CU, WI	ES
Acetato Isobutílico- Agua	VS	ES
Acetato de etilo - Agua	(ES), VS, CA	ES
Cloroformo - Metanol - Agua	ES	
n- Butanol- Agua	ES, SS, SA	

Adaptado de: (Dinan et al., 2001)

Abreviaciones para las diferentes clases de esteroides: BS: Brassinosteroides; BU: bufadienolides; CA: cardenolides; CU: cucurbitacins; ES: eccysteroids; SA: alcaloides esteroidales; SS: saponinas esteroidales; VS: esteroides del tipo vertebrado; WI: withanolides.

Como tercer paso, se emplea procedimientos cromatográficos con el fin de purificar el compuesto. Entre las técnicas más empleadas se puede aplicar cromatografía de alta eficiencia (HPLC), cromatografía de capa delgada preparativa (TLC) para experimentos a pequeñas escalas y una columna cromatografía de gases (GC) en experimentos a gran escala (Liu & Ruan, 2013). Por lo general, después de dos etapas de cromatografía el compuesto puede considerarse como puro, sobre todo si el compuesto es cristalizado a partir de las fracciones correspondientes (Dinan et al., 2001).

2.5 Técnicas de Separación

Se pueden aplicar diferentes métodos para la separación y enriquecimiento de ciertas clases de fitoesteroles y esteroides insaponificables totales. Los tres métodos principales son TLC, HPLC, y extracción de fase sólida (SPE) (Azadmard-Damirchi & Dutta, 2010).

La técnica HPLC es una de las más empleadas para realizar análisis de extractos de plantas con el fin de identificar fitoesteroides en plantas herbales, además que realizar separaciones por HPLC demuestra resultados más rápidos y precisos a comparación de los métodos clásicos. Es la técnica más ampliamente utilizada, ya que representa la técnica más poderosa y favorece en la recuperación de compuestos puros en un rango de 1- 100 mg (Dinan et al., 2001).

Por otro lado, la cromatografía de capa delgada (TLC) es uno de los métodos convencionales para la separación de diferentes clases de fitoesteroides. En manera general se emplea el material de la muestras aplicándolo al plato de TLC con el fin de identificar las bandas de esteroides contrastando con un estándar de referencia (Azadmard-Damirchi & Dutta, 2010).

Entre otros métodos de purificación la extracción de fase sólida (SPE) es un método cromatográfico simple y de bajo costo que ha sido empleado para la extracción y purificación de esteroides totales en aceites vegetales insaponificables. Además, puede emplearse en la preparación de lípidos previos a métodos como HPLC, GC Y GC-MS (Azadmard-Damirchi & Dutta, 2010).

2.5.1 HPLC

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es un tipo de cromatografía líquida instrumental que emplea una fase estacionaria la cual consta de pequeñas partículas, logrando de esta manera separaciones más eficientes en comparación con una cromatografía líquida convencional (Moreno-Arribas & Polo, 2003). La técnica es conocida por diferentes nombres incluido cromatografía líquida de alta presión, debido a las elevadas presiones empleadas para movilizar la fase móvil o el disolvente a través de la fase estacionaria. En términos generales se pueden mencionar que existen tres grandes grupos que dominan las separaciones cromatográficas: cromatografía de fase inversa, intercambio iónico y cromatografía de exclusión de tamaño (M V Moreno-Arribas and M C Polo, 2003).

En la mayoría de equipos de cromatografía líquida se puede acoplar con una serie de detectores como (UV), espectrómetro de masas (MS) o cromatografía de gases (GC) acoplada a detectores de espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (APCI-MS) (Abidi, 2001). Varios estudios han demostrado que la cromatografía líquida junto a estos detectores son capaces de cuantificar, perfilar e identificar conjugados de esteroides, de una variedad de alimentos y plantas (Liu & Ruan, 2013). Pese a la selectividad y sensibilidad de la técnica HPLC o GC, puede presentar ciertas limitantes en la detección y cuantificación de fitoesteroides por eso es necesario acoplarlos a ciertos detectores como (UV) o detector de masas (MS), tomando en cuenta los costos de operación (López, R. ; Vélez, 2017).

2.5.2 Separación por HPLC

La cromatografía de fase reversa (RP) o inversa es uno de los métodos cromatográficos más utilizados para separación de compuestos con residuos

hidrofóbicos y que no poseen un carácter polar dominante. En RP-HPLC la fase estacionaria tiene carácter hidrofóbico y la fase móvil posee un carácter polar o semipolar. Por lo general se emplea utilizando una fase unida sobre sílice, unida a un ligando que es una cadena de hidrocarburo puede ser C8 o C18. La fase móvil en RP-HPLC es un disolvente parcialmente acuoso, orgánico y de naturaleza más polar que la fase estacionaria (S. C. Moldoveanu & David, 2012).

RP- HPLC emplea menos solventes orgánicos polares volátiles en agua y de esta manera ofrece un equilibrio rápido de una fase estacionaria de sílice unida con los solventes de la fase móvil. La selectividad de la fase estacionaria en esteroides individuales va a depender de la diferencia de tamaño de la molécula, el número de doble enlaces para la aplicación de la técnica en el análisis de esteroides (Abidi, 2001).

Las moléculas de soluto están en equilibrio entre la fase estacionaria hidrófoba y la fase móvil parcialmente polar. La dirección del equilibrio determina una retención más fuerte o más débil de los analitos (S. C. Moldoveanu & David, 2012).

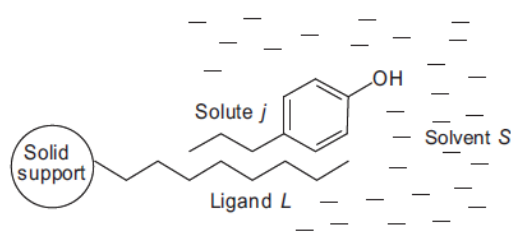


Figura 7. Interacción entre un soluto j con ligando L en un solvente S.
Tomado de: (S. C. Moldoveanu & David, 2012).

Por lo general, la retención de un soluto hidrófobo en una columna C18 es más fuerte que en una columna C8. Esto es debido a que el ligando más largo en una fase estacionaria hidrófoba C18 conduce a fuerzas de Wan der Waals más fuertes con el soluto (S. C. Moldoveanu & David, 2012).

Para la selección de una fase estacionaria adecuada, se emplean columnas de fase hidrófoba, denominadas como columnas RP. Las principales características que deben cumplir estas columnas son propiedades físico – químicas como tamaño de las partículas, homogeneidad, resistencia a un rango de pH más amplio, protección de los extremos. Entre las columnas más empleadas son las que tienen una fase unida a C18, seguido de la fase C8. El soporte más común para las fases ligadas es la sílice porosa. La pureza de la sílice es importante para la calidad de la columna, por lo general se emplea la pureza de sílice tipo B. Además, de la sílice porosa se emplean partículas de núcleo cubiertas como soporte para las fases hidrófobas (S. C. Moldoveanu & David, 2017).

En la Tabla 4 describimos las fases estacionarias más empleadas en RP-HPLC.

Tabla 4.

Tipos de Fases estacionarias hidrófobas

Tipo de Fase	Fase/ Columna	Interacción
N-alquilo común en sílice con tapa final	C8,C18	Hidrofóbico Fuerte
N-alquilo especial sobre sílice con tapón final	C2, C4, C12, C14	Hidrofóbico Medio o Fuerte
N-alquilo en extremo	C8, C18	Hidrofóbico Fuerte

orgánico/ sílice (tipo BEH)		
N-alkilo en sílice con extremo polar	C8, C18	Hidrofóbico Fuerte y polaridad media
Polar incrustado en sílice con tapa final	C8, C18, etc, con O, - CONH, urea, etc	Hidrofóbico Fuerte y polaridad baja
Alquilo Mixto en sílice	C18 corto alquilo, C4-C18	Hidrofóbico medio o fuerte
Fases unidas a zirconio	C8, C18, etc	Hidrofóbico Fuerte

Adaptado de (S. C. Moldoveanu & David, 2017)

2.6 Absorción ultravioleta para esteroides

En ciertos estudios se demuestra que existe una correlación entre la absorción ultravioleta y la estructura molecular del esteroide. La absorción ultravioleta es característica de ciertos sistemas cromóforos más que de la molécula en su conjunto. Se define como cromóforo al grupo que contiene múltiples enlaces que son responsables de la absorción de luz o color en las moléculas (Dorfman, 1953).

Los átomos o moléculas con insaturación múltiple absorben a 150 – 200 mp, una región difícil de medir con espectrometría. Sin embargo, la conjugación de dos o más de estos cromóforos provoca un desplazamiento en la absorción hacia el ultravioleta cercano en un rango de (200- 400 mp) y hacia lo visible. Los grupos cromóforos comunes presentes en los esteroides son los grupos etileno, carbonilo y carboxilo. Todos muestran una absorción fuerte a 1700 - 200mp, una región que esta fuera del rango de la mayoría de espectrofotómetros. Sin embargo, los grupos carbonilo tienen una banda adicional bien definida aproximadamente 280 mp, por lo tanto, se describe el

rango útil de espectrofotómetro a 200mp, en la que se absorben los dobles enlaces alquilados de la región. De esta forma, estos dos grupos pueden ser detectados fácilmente (Dorfman, 1953). Con relación a los esteroides no se ha reportado que los disolventes ejercen efecto sobre las características de absorción en dienos y polienos conjugados. Sin embargo, el efecto de solvente en casos de que un grupo polar esté presente no ha sido previamente determinado (Dorfman, 1953).

En la tabla 5. Resume los valores de λ_{max} y ϵ_{max} para diferentes cetonas esteroides. Hay que señalar que varios de estos compuestos no muestran absorción ultravioleta selectiva, esto es un hecho difícil de explicar, ya que existen sustancias estrechamente relacionadas exhiben una banda cetona.

Tabla 5.

Absorción ultravioleta para grupos cetonas aislados

Posición del grupo Cetona	Promedio λ_{max}	Promedio ϵ_{max}	Distancia λ_{max}	Distancia ϵ_{max}
C3	282	31	280-286	16-50
C6	288	45	280-300	40-50
C7	290	40	287-292	40
C11	287	75	285-290	50-107
C12	287	50	285-288	25-70
C16	297	35		
C17	293	46	293-294	43-48
C20	284	56	282-285	40-75

Tomado de: (Dorfman, 1953)

Pese a que el detector UV muestra una alta especificidad y sensibilidad, existe problemas en la detección de compuestos derivados del esteroles más común como es el colesterol ya que no pueden ser identificados en una sola longitud de onda. Debido a que exhiben su máxima absorción de UV en longitudes de onda diferentes. La longitud de onda universal se encuentra entre 205nm y 210nm, sin embargo, no es posible trabajar con estas longitudes de onda con eluciones de gradiente (Guardiola, 2002). En la Fig.8 se puede apreciar diferentes compuestos derivados del colesterol que presentan su absorción máxima en diferentes longitudes de onda .

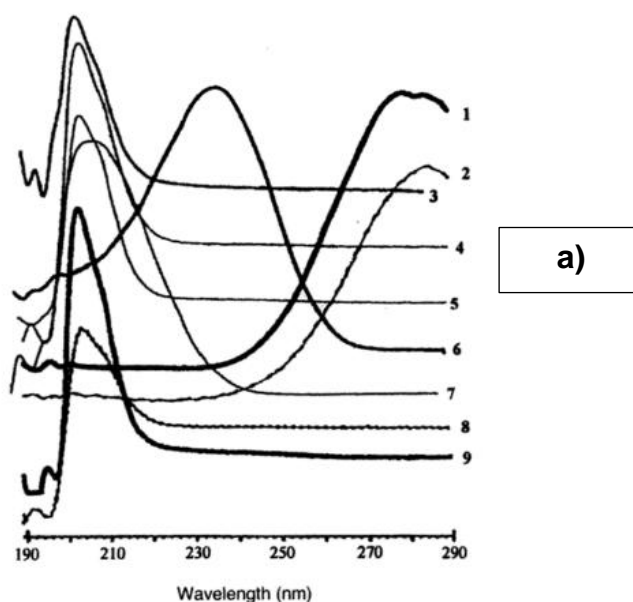


Figura 8. Espectro Ultravioleta (UV) del colesterol y sus derivados oxidados.

Tomado de: (Guardiola, 2002)

a) Espectros: 1. 3,5-colestano-7dieno, 2. Colestano-4,6dieno-3eno, 3. 2-alfa-hidroxicolesterol, 4. 7-alfa-hidroxi-colesterol, 5. 7-beta-hidroxi-colesterol, 6. 7-ceto-colesterol, 7. 26-hidroxicolesterol, 8. Colesterol, 9. 25-hidroxicolesterol.

2.7 Pruebas Colorimétricas para Esteroides

Para la identificación de esteroides se emplean sistemas cromofóricos o reacciones colorimétricas, resultado de reacciones de esteroides con ácidos fuertes. Las técnicas Liebermann – Burchard y Salkowski son las técnicas más empleadas para estos análisis. Los colores visibles son atribuidos generalmente a la transferencia de carga entre el esteroide como donante y un ión carbonio deslocalizado, generado del esteroide por el medio ácido, actuando como aceptor (Overton & Connolly, 1972).

2.7.1 Reacción Liebermann- Burchard

En la reacción Liebermann- Burchard (LB), la solución de esteroide debe estar en cloroformo, con ácido sulfúrico concentrado y anhídrido acético para lograr la formación de una capa de color verde. La prueba es positiva para estenoles y negativa para estanoles. Este método además es uno de los más empleados para determinación de colesterol en sangre (Sujata V. Bhat, B.A. Nagasampagi, 2006)

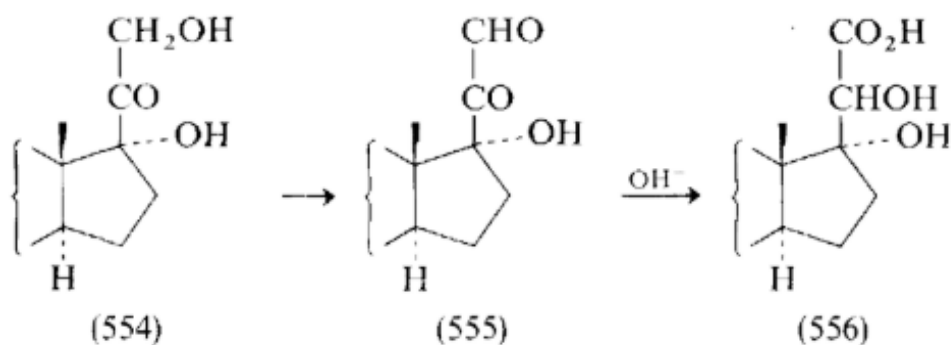


Figura 9. Reacción Liebermann- Burchard

Tomado de: (Overton & Connolly, 1972)

2.7.2 Reacción de Salkowski

El mecanismo de acción en la reacción de Salkowski es prácticamente el mismo que de la reacción (LB). La diferencia radica en el empleo de anhídrido acético en la reacción (LB) utilizado únicamente como diluyente para el ácido sulfúrico. En este caso cuando el ratio de H₂SO₄:Ac₂O es mayor, se obtiene el color rojo-purpura característico de la prueba Salkowski. En ambas reacciones el agente oxidante obligatorio es el ácido sulfúrico, el cual es reducido a sulfuro dióxido. El anhídrido acético puede ser reemplazado por ácido acético, etil acetato o butanol (Cook, 1958).

En la reacción de Salkowski el colesterol o esteroles debe estar en una solución de cloroformo con ácido sulfúrico concentrado, para dar el color rojo en la capa de cloroformo y el verde fluorescente en la capa de ácido (Sujata V. Bhat, B.A. Nagasampagi, 2006)

3. Capítulo III. Metodología

3.1 Preparación y conservación de muestras

Las muestras empleadas corresponden a un grupo de plantas provenientes del mercado Iñaquito en Quito.

Las plantas son:

1. Ataco (*Amaranthus quitensis*)
2. Stevia (*Stevia rebaudiana*)
3. Canela (*Cinnamomum verum*)
4. Cola de caballo (*Equisetum arvense*)
5. Menta (*Mentha piperita*)

Las especies de plantas fueron identificadas por un botánico y se realizó una clasificación por especie con el fin de tener un respaldo de cada planta. Las plantas fueron limpiadas, deshojadas y llevadas a congelación previa en - 80 °C. Posteriormente las plantas fueron liofilizadas durante un día, y trituradas mediante un molino eléctrico. Las muestras trituradas se almacenaron en - 80 °C.

3.2 Extracción con metanol

Se pesó un gramo de muestra de planta y se disolvió en 30 ml de metanol puro, se dejó por 24 horas en agitación a 45 °C. Luego, los extractos fueron filtrados con papel filtro y aforados a 25 ml. Se tomó 1 ml del extracto original destinado para pruebas colorimétricas.

Posterior a la extracción se tomó una alícuota de 5 ml para concentrar en rotavapor a 40 °C, hasta que la muestra se seque en el balón, evitando secar el extracto hasta quemarlo. En este punto con las muestras previamente concentradas, fueron disueltas nuevamente en diferentes solventes. Por cada 5 ml de extracto original fueron disueltas en 5 ml de: 1) metanol, 2) acetonitrilo y 3) cloroformo. De esta forma se generó tres nuevos extractos para la prueba en HPLC.

3.3 Extracción con cloroformo

Se pesó 1 gramo de muestra y fue disuelto en 30 ml de cloroformo puro, fue dejado en agitación por 24 horas a 45 °C. Luego, los extractos fueron filtrados con papel filtro y aforados a 25 ml. Se tomó 1 ml del extracto original destinado para pruebas colorimétricas.

Posterior a la extracción se tomó una alícuota de 5 ml para concentrar en rotavapor a 40 °C, hasta que la muestra se seque en el balón, evitando secar el extracto hasta quemarlo. En este punto con las muestras previamente concentradas, fueron disueltas nuevamente en diferentes solventes. Por cada 5 ml de extracto original fueron disueltas en 5 ml de: 1) metanol, 2) acetonitrilo y 3) cloroformo. De esta forma se generó tres nuevos extractos para la prueba en HPLC.

3.4 Extracción Éter Etílico y Metanol al 80%

Se pesó un gramo de muestra y fue disuelto en una mezcla de 15 ml de éter etílico y 15 ml de metanol al 80%, fue dejado en agitación por 24 horas a 45 °C. Luego, los extractos fueron filtrados con papel filtro y aforados a 25 ml. Posterior a la extracción se tomó una alícuota de 5 ml para concentrar en rotavapor a 40 °C, hasta que la muestra se seque en el balón, evitando secar el extracto hasta quemarlo. En este punto con las muestras previamente concentradas, fueron disueltas nuevamente en diferentes solventes. Por cada 5 ml de extracto original fueron disueltas en 5 ml de metanol para la prueba en HPLC.

3.5 Pruebas Cualitativas

Se realizaron dos pruebas cualitativas colorimétricas para la identificación de presencia de esteroides.

3.5.1 Reacción Liebermann -Burchard.

Las muestras fueron resuspendidas en cloroformo. Se tomó alícuotas de cada muestra entre 1-2 ml y fueron colocadas en tubos de ensayo y se agregó 2 ml

del reactivo de Liebermann -Burchard (LB). La reacción con este compuesto ocurre después de 5 min de agregarlo (L. B. Araújo et al., 2013).

Las muestras deben estar disueltas en cloroformo, sin embargo, se realizó una prueba con muestra suspendida en metanol y éter etílico. La solución debe tornarse azul-violeta y finalmente verde, confirmando la presencia de compuestos esteroidales.

3.5.2 Prueba de Salkowski

El extracto fue disuelto en cloroformo, se tomaron alícuotas de 1 a 2 ml en tubos de ensayo y se agregó un volumen igual de reactivo concentrado para la prueba de Salkowski. La solución debe tornarse roja indicando la presencia de compuestos esteroidales.

3.6 Análisis HPLC

Los extractos re disueltos fueron filtrados a través de un filtro jeringa de 0.45 μ m para su posterior análisis HPLC. Para la preparación de las muestras en viales se realizó una dilución 1:10 para la corrida. El análisis cromatográfico fue realizado en un equipo HPLC (Agilent Technologies Series 1200), y se empleó una columna C18 (Hypersil Gold C18 150 x 4.6 mm 5 μ m).

3.6.1 Condiciones de HPLC

En la primera corrida se probaron diferentes longitudes de onda: 205 nm, 210 nm, 220 nm, 280 nm, 325 nm, 425 nm, 525 nm, 625 nm.

A partir del análisis de los cromatogramas derivados de estas condiciones, se definieron dos nuevas estrategias: Tabla 7, 7A y Tabla 8, 8A.

Las Tablas 6, 7, 7A, 8 y 8A se encuentran como Anexo 2.

A modo de simplificación, se muestra el diagrama general de la metodología empleada en el estudio, esta figura se encuentra como Anexo 3.

4. Capítulo IV. Resultados y Discusión

El mejor método de extracción fue cloroformo resuspendido en metanol, este método fue seleccionado ya que presentó mayor recuperación e identificación de compuestos en corridas previas. Posteriormente se realizó nuevas corridas variando el gradiente en el método y se probó dos tipos de fase móvil.

4.1 Cromatogramas de plantas Método 1.

Se realizó una nueva corrida variando las condiciones de gradiente como se indicó en metodología. En este método se alargó el gradiente con el fin de generar una mejor separación entre picos, además se aumentó el tiempo de corrida para tratar de recuperar más compuestos. El modo de corrida fue dinámico gradiente ya que se probó dos tipos de solventes.

En el método 1. Se empleó como fase móvil acetonitrilo y agua en una proporción (50:50). En las siguientes imágenes se presenta el cromatograma del método 1 con la variación en el gradiente en las tres longitudes de onda seleccionadas.

Los cromatogramas son presentados hasta un tiempo de corrida de 60 min, debido a que después de este tiempo no se identificaron más compuestos. Las figuras 11, 12 y 13 se encuentran como Anexo 4.

4.1.1 Selección de Compuestos Semejantes

En esta sección se enumeraron los picos más semejantes entre plantas, y ciertos picos más relevantes. Para la selección de buenos picos es importante tomar en cuenta condiciones como la pureza del pico, tiempo de retención, simetría del pico y su cola además, de tomar en cuenta la selectividad de la columna en una fase reversa (S. Moldoveanu & David, 2016).

Las figuras 14, 15, 16, 17 y 18 se encuentran como Anexo 4. En el método 1. Se puede observar que el pico seleccionado como 10, presenta semejanza entre las plantas ataco, menta, cola de caballo y canela. Además, en la tabla 9, se menciona los tiempos de retención de cada planta los cuales son muy semejantes entre plantas.

Tabla 9.

Tiempos de Retención en diferentes plantas. Método 1

Compuesto	Tiempo de Retención
Ataco	TR. 5.421
Cola de Caballo	TR. 5.421
Menta	TR. 5.422
Canela	TR. 5.421

Se debe tomar en cuenta que cada planta presenta diferentes perfiles esteroidales, ya que se analizaron diferentes especies de plantas. Cada planta presenta sus propiedades características, debido a que la composición y la cantidad de compuestos difiere entre especie (Antolak & Kregiel, 2017). Además, se puede observar una diferencia en los tiempos de retención en cada compuesto, esto puede ser debido a un desplazamiento en el tiempo causado por la cantidad de compuestos presentes en las plantas, y que estos salen a diferentes tiempos desplazando los compuestos de interés.

Cabe mencionar que en este análisis los compuestos no se encuentran puros y pueden presentar mezclas entre sustancias. Un claro ejemplo es el pico 13 de la planta canela, se puede observar que el grosor del pico se presenta casi en el doble del tiempo de otros compuestos y que el compuesto se encuentra en elevada concentración. Para verificar que el compuesto no se encuentra realmente puro, se visualizó el espectro UV en 3D. De esta forma se logró confirmar la presencia de compuestos que se han detectado casi juntos por el equipo. Por esta razón el pico está tan concentrado y el espectro presenta similitud entre compuestos. Las figuras 19, 20 y 21 se encuentran como Anexo 4. En la Fig. 20 se presenta el espectro ultravioleta en 3D. del pico 13 de la planta Canela.

En el espectro se identifica dos ejes centrales el primero representa el tiempo en el que es identificado el compuesto, el siguiente eje muestra las longitudes de onda en las que puede ser detectado el compuesto, el eje y o eje vertical es la concentración que presenta el compuesto. En la Fig. 21 se observa que el pico 13 de Canela presenta la mayor absorbancia sobre el minuto 11, en el espectro 3D de la Fig. 20 se puede apreciar que segundos antes presenta otro espectro que confirma la presencia de un compuesto junto a este, así como segundos después se observa otro espectro que es identificado a longitudes de onda diferentes. De esta forma se confirma la presencia de una mezcla de

compuestos que fueron detectados juntos por el equipo, afirmando que el compuesto no es puro.

4.2 Cromatogramas de Plantas. Método 2

En el método 2. Se empleó como fase móvil acetonitrilo y metanol en una proporción (50:50). En las siguientes imágenes se presenta el cromatograma del método 2 con la variación en el gradiente en las tres longitudes de onda seleccionadas. Las figuras 22, 23 y 24 se encuentran como Anexo 5.

4.2.1. Selección de Compuestos Semejantes

En el método 2. El pico seleccionado como 12, presenta semejanza entre las plantas ataco, menta, cola de caballo. Las figuras 25, 26, 27, 28 y 29 se encuentran como Anexo 5.

Tabla 10.

Tiempo de retención en diferentes plantas. Método 2.

Compuesto	Tiempo de Retención
Ataco	TR. 17.9
Stevia	TR. 18
Menta	TR. 17.85

En la Fig. 29 se puede observar los espectros en las diferentes plantas, pese a que existe una variación en el tiempo de retención en cada planta como se reporta en la tabla 10, se puede deducir que experimentalmente es el mismo compuesto, en la Fig. 30 al ser normalizados los espectros se puede verificar que el espectro es el mismo. Una de las principales causas de la variación del tiempo de retención es la heterogeneidad de plantas, como se había mencionado con anterioridad cada planta posee compuestos innatos de la especie, que van intervenir al momento de ser detectados por el equipo.

Otra de las causas de la diferencia en el tiempo de retención al no poseer un estándar, no se saber que compuesto va a estar antes de nuestra molécula de interés, esto va interferir en la identificación del compuesto. Hay que tomar en cuenta que los compuestos no se encuentran totalmente puros, un claro ejemplo es los compuestos presentes en la canela tanto en el método 1 como en el método 2 se puede identificar la impureza del compuesto. En la Fig. 31 se muestra el espectro 3D del pico 4 de la planta canela en el método 2. Las figuras 29, 30, 31 y 32 se encuentran como Anexo 5.

En los cromatogramas del método 2 se puede observar que el pico 4 de canela tiene su mayor absorción sobre los 6,2 minutos, y otra absorción en 6,4 min. En la Fig. 32 se puede comprobar que existen otras moléculas que presentan espectros en tiempos muy similares a este compuesto y además son detectadas a varias longitudes de onda, interfiriendo en la pureza del compuesto. En los antecedentes se había mencionado que los solventes no afectan en la absorción ultravioleta de los compuestos esteroidales, sin embargo no se conocía a certeza los posibles efectos que podrían ocurrir al emplear solventes polares (Dorfman, 1953). En este punto se evidenció que al utilizar un solvente polar como es el caso del método 2 empleando acetonitrilo: metanol, no se realizaron separaciones idóneas de los compuestos esteroidales, ya que la muchos de esteroides presentan naturaleza polar

como menciona (Dinan et al., 2001). Además, en este método ocurrió otro fenómeno que es la vacancia de picos o la presencia de picos negativos sobre todo en longitudes de onda más amplias como es 280nm y 625nm.

Esto pudo ser causado por el solvente metanol presentó mayor absorbancia frente a los compuestos y por esta razón se generaron los picos negativos. Otra de las posibles causas es que se presentó diferencia entre las concentraciones de la fase móvil y el soluto (Katz, 1998). Se debe recalcar que ciertos de los picos negativos fueron tomados en consideración ya que presentan absorbancias y espectros semejantes entre las plantas, en lo que se pudo confirmar la presencia de compuestos semejantes en diferentes especies de plantas, que fueron detectados a longitudes de onda más amplias que las convencionales.

Una de las fases móviles más empleada para la determinación de compuestos esteroidales es acetonitrilo: agua (Kumar Ph Scholar et al., 2017) como se empleó en el método 1, ya que es muy método muy conveniente en RP-HPLC y favorece a la recuperación de compuestos en extractos de plantas. Sin embargo, en estudios recientes se probaron fases móviles con metanol como en el caso del método 2 y comparando su eficiencia para ambos sistemas la difusión superficial de partículas fue dominante en un gel de sílica, por lo tanto los dos sistemas presentan resultados favorables en cromatografía de fase reversa (Miyabe & Takeuchi, 1997)

Para la detección de esteroides se debe tomar en cuenta que la absorbancia de los esteroides va a depender de los dobles enlaces y grupos carbonilos presentes en la estructura, ya que presentan mucha heterogeneidad en la absorción a diferentes longitudes de onda (Dorfman, 1953), como se pudo observar en ambos métodos y a tres diferentes longitudes de onda hubo una

gran cantidad de compuestos identificados por el equipo, pero se debe recalcar que los compuestos esteroidales pese a presentar estructuras químicas muy semejantes el espectro ultravioleta va a ser diferente para cada compuesto, esto se pudo evidenciar en estudios de (Lee, Weon, Yun, Eom, & Ma, 2015), al realizar determinación de fitoesteroides con tres tipos de fitoesteroles muy semejantes estructuralmente como campesterol, stigmasterol y daucolesterol los espectros fueron diferentes para cada compuesto. Por lo tanto, de acuerdo a (Dorfman, 1953) realmente es complicado atribuir una absorción específica a un compuesto como son los esteroides, ya que puede existir un tipo de cromoforo conjugado con características similares de absorción pero en diferentes compuestos.

Por otro lado, en la pureza de los picos se puede evidenciar que muchos de los compuestos no se encuentran puros o son mezclas de sustancias como es el caso de la canela. Esto puede ocurrir debido a la gran cantidad de moléculas presentes en las plantas que tienen sus propiedades características (Antolak & Kregiel, 2017), además, se puede deducir que existen compuestos derivados de esteroides como son los terpenos ya que en las pruebas colorimétricas realizadas previas a los análisis se identificó la presencia de estos compuestos.

Por lo general al realizar la prueba LB al formarse un anillo café o rojo en la capa de cloroformo junto con dos capas verdes fluorescentes en la parte ácida indica la presencia de compuestos esteroidales (Alamgir, 2018), esto ocurrió con las plantas analizadas, sin embargo, en el caso de la canela, la solución se tornó un color rojo oscuro lo que indica la presencia de triterpenos o triterpenoide (Prakashan, 2009). Se puede confirmar esto de acuerdo con a (Alamgir, 2018) en la prueba de Salkowski al colocar el reactivo la capa inferior debe tornarse roja indicando la presencia de esteroides, pero al tornarse amarilla confirma la presencia de triterpenoides como en el caso de canela.

Otro factor que puede influir son los tipos de esteroides presentes en las plantas, en la prueba colorimétrica LB según (Cook, 1958), de acuerdo a la rapidez con la que la coloración cambia va a depender del tipo de esteroide presente en la muestra. Por lo general el tiempo de reacción e identificación de compuestos esteroides ocurre en los primeros 5 minutos de agregar el reactivo (L. B. Araújo et al., 2013), pese a esto cada planta presentó diferente tiempo en los cambios de coloración así como las tonalidades de verde o rojo que presentaban. De esta forma se puede evidenciar que existen varios tipos de compuestos esteroidales por cada especie de planta.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

El mejor método de extracción para la identificación de compuestos esteroidales fue cloroformo resuspendido en metanol, debido a que favoreció la identificación de más compuestos y fue afín a las diferentes fases móviles empleadas.

Modificar las condiciones de gradiente fue necesario para mejorar la separación de picos, esto se realizó con diferentes concentraciones en los solventes con el fin de determinar la afinidad de los esteroides por solvente.

Con la aplicación de los métodos en HPLC fue posible la identificación de compuestos a longitudes de onda mayores a las reportadas en estudios previos (Abidi, 2001a), así como la identificación de compuestos similares en especies diferentes de plantas.

Se puede determinar que la absorbancia de los compuestos esteroides es muy heterogénea debido a las diferencias estructurales que presentan dichos compuestos, por lo tanto, se aplicó diferentes longitudes de onda para generar una mejor detección de estos compuestos.

Se puede apreciar la variedad de moléculas presentes por cada especie de planta y la afinidad de cada compuesto de acuerdo al tipo de solvente empleado como fase móvil.

5.2 Recomendaciones

Para lograr una mejor separación de compuestos se recomienda emplear una columna C18 más larga.

Se recomienda para análisis posteriores tener los estándares de al menos dos tipos de esteroides para su identificación y caracterización en plantas.

Para una identificación precisa de los tipos de compuestos se recomienda acoplar el equipo a un detector como espectrómetro de masas (Liu & Ruan, 2013), con el fin de caracterizar estructuralmente las variedades de esteroides presentes en estas especies de plantas.

REFERENCIAS

- Abdulmalik, I. A., Sule, M. I., Musa, A. M., Yaro, A. H., Abdullahi, M. I., Abdulkadir, M. F., & Yusuf, H. (2011). *Isolation of Steroids from Acetone Extract of Ficus iteophylla*. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2(5), 270–272.
- Abidi, S. . (2001a). *Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils*. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 173–201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00946-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00946-3)
- Abidi, S. L. (2001b). *Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils*. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 173–201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00946-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00946-3)
- Ahmed, Y., Rahman, S., Akhtar, P., Islam, F., Rahman, M., & Yaakob, Z. (2013). *Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of Saurauia roxburghii*. *International Food Research Journal*, 20(5), 2939–2943.
- Akoh C. Casimir, M. B. D. (2002). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition - Google Libros* (Second Edi). New. York. Recuperado el 10 de junio de 2019 de: <https://books.google.com.ec/books?id=EatdWzMFA4sC&pg=PA111&dq=cholesterol+the+most+important+sterol&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiyxrq3o4DiAhUuTt8KHytCSsQ6AEIJzAA#v=onepage&q=cholesterol the most important sterol&f=false>
- Alamgir, A. N. M. (2018). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts. Volume 2, Phytochemistry and Bioactive Compounds*.
- Aldini, R., Micucci, M., Cevenini, M., Fato, R., Bergamini, C., Nanni, C., ... Budriesi, R. (2014). *Antiinflammatory effect of phytosterols in experimental murine colitis model: prevention, induction, remission study*. *PloS One*, 9(9), e108112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108112>

- Antolak, H., & Kregiel, D. (2017). *Food Preservatives from Plants. Food Additives*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70090>
- Araújo, E. L., Randau, K. P., Sena-Filho, J. G., & Pimentel, M. (2008). *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): Perspectives for a phytotherapeutic product. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(SUPPL.), 777–784. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500024>
- Araújo, L. B., Silva, S. L., Galvão, M. A. M., Ferreira, M. R. A., Araújo, E. L., Randau, K. P., & Soares, L. A. L. (2013). Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 736–742. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500004>
- Awad, A. B., & Fink, C. S. (2000). Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2127–2130. <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2127>
- Awad, A. B., Gan, Y., & Fink, C. S. (2000). Effect of β -Sitosterol, a Plant Sterol, on Growth, Protein Phosphatase 2A, and Phospholipase D in LNCaP Cells. *Nutrition and Cancer*, 36(1), 74–78. https://doi.org/10.1207/S15327914NC3601_11
- Awad, A. B., von Holtz, R. L., Cone, J. P., Fink, C. S., & Chen, Y. C. (1998). *beta-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle*. *Anticancer Research*, 18(1A), 471–473. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9568122>
- Azadmard-Damirchi, S., & Dutta, P. C. (2010). *Phytosterol Classes in Olive Oils and their Analysis by Common Chromatographic Methods. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00027-9>
- Berger, A., Jones, P. J. H., & Abumweis, S. S. (2004a). Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, 3, 5. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-3-5>

- Berger, A., Jones, P. J. H., & Abumweis, S. S. (2004b). *Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients*. *Lipids in Health and Disease*, 3, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-3-5>
- Cañabate-Díaz, B., Segura Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., & Duran Martos, J. (2007). *Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS*. *Food Chemistry*, 102(3), 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.038>
- Cantrill, Richard; Kawamura, Y. (2008). *Phytosterols, phytostanols and their esters*. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 5, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03859.x>
- Cook, R. P. (1958). *Cholesterol chemistry, biochemistry, and pathology*. Academic Press.
- Dinan, L., Harmatha, J., & Lafont, R. (2001). *Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids*. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 105–123. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00992-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00992-X)
- Dorfman, L. (1953). *Ultraviolet Absorption of Steroids*. *Chemical Reviews*, 53(1), 47–144. <https://doi.org/10.1021/cr60164a002>
- Duong, S., Strobel, N., Buddhadasa, S., Auldist, M. J., Wales, W. J., Orbell, J. D., & Cran, M. J. (2017). *Quantitative Instrumental Analysis of Phytosterols in Fortified Foods*. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21400-5>
- Fernandes, P., & Cabral, J. M. S. (2007). *Phytosterols: Applications and recovery methods*. *Bioresource Technology*, 98(12), 2335–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.006>
- Fernández, C., Suárez, Y., Ferruelo, A. J., Gómez-Coronado, D., & Lasunción, M. A. (2002). *Inhibition of cholesterol biosynthesis by Δ^{22} - unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Δ^{24} - reductase in*

- mammalian cells. Biochemical Journal*, 119, 109–119.
- Görög, S., & Durham, D. (1983). *Quantitative analysis of steroids* (Second Edi). Hungary.
- Guardiola, F. (2002). *Cholesterol and phytosterol oxidation products : analysis, occurrence, and biological effects*. Barcelona, Spain.
- Harborne, J. B. (Jeffrey B. . (1998). *Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall.
- Harrabi, S., St-Amand, A., Sakouhi, F., Sebei, K., Kallel, H., Mayer, P. M., & Boukhchina, S. (2008). *Phytosterols and phytosterols distributions in corn kernel. Food Chemistry*, 111(1), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.044>
- Katz, E. (1998). *Handbook of HPLC*. M. Dekker.
- Kim, K.-S., Yang, H. J., Lee, J.-Y., Na, Y.-C., Kwon, S.-Y., Kim, Y.-C., ... Jang, H.-J. (2014). *Effects of β -sitosterol derived from Artemisia capillaris on the activated human hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-induced mouse liver fibrosis. BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 363. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-363>
- Kumar Ph Scholar, M. D., Goswami, A., Gahlot Senior Demonstrator, G., Kumar Jinger Assistant Professor, S., Patel, S., Talreja, T., ... Sharma, T. (2017). *The Pharma Innovation. Journal* (Vol. 6). Recuperado el 9 de junio de 2019 de: www.thepharmajournal.com
- Lee, J., Weon, J. B., Yun, B.-R., Eom, M. R., & Ma, C. J. (2015). *Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in Artemisia apiacea by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector. Pharmacognosy Magazine*, 11(42), 297–303. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.153082>
- Liu, S., & Ruan, H. (2013). *A highly sensitive quantification of phytosterols through an inexpensive derivatization. Chemistry and Physics of Lipids*,

166(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.12.002>

- López, R.; Vélez, J. P. (2017). ANÁLISIS DE FITOESTEROLES EN LA SEMILLA DE *Persea americana* Miller (Var. Lorena) POR CROMATOGRAFÍA DE GASES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ANALYSIS OF PHYTOSTEROLS IN SEEDS OF *Persea americana* Miller (Var. Lorena) BY GAS CHROMATOGRAPHY AND HIG. *Universidad Militar Nueva Granada* |, 13(1), 35–41. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2013>
- M V Moreno-Arribas and M C Polo. (2003). *High-performance Liquid Chromatography*. Recuperado el 200 de mayo de 2019 de: <https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/3-s2.0-B012227055X002327/first-page-pdf>
- Meng, X., Sun, P., Pan, Q., Shi, Z., Yang, K., & He, R. (2006). *Synthesis of plant sterol esters catalyzed by heteropolyacid in a solvent-free system*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(1), 13–18. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500265>
- Miyabe, K., & Takeuchi, S. (1997). *Effect of Acetonitrile/Water Mobile-Phase Composition on Adsorption Characteristics of Reversed-Phase Liquid Chromatography*. <https://doi.org/10.1021/AC961044M>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2012). *Retention Mechanisms in Different HPLC Types. Essentials in Modern HPLC Separations*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385013-3.00005-7>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017). *RP-HPLC Analytical Columns. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00007-X>
- Moldoveanu, S., & David, V. (2016). *Selection of the HPLC method in chemical analysis*.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). *Phytosterols*,

phytosterols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses, 41, 457–500.

Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2003). *CHROMATOGRAPHY | High-performance Liquid Chromatography*. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 1274–1280). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00232-7>

N. Kiruthiga, D. S. S. (2014). *Studies on Phytochemicals and Steroid Isolation from N-Hexane Extract of Anisochilus Carnosus*, 5, 337–345. Recuperado el 9 de junio de 2019 de: https://www.researchgate.net/publication/265291074_Studies_on_Phytochemicals_and_Steroid_Isolation_from_N-Hexane_Extract_of_Anisochilus_carnosus

Overton, K. H., & Connolly, J. D. (1972). *Terpenoids and steroids Volume 2, A review of the literature published between September 1970 and August 1971*. Chemical Society.

Patterson, C. . (2008). *Phytosterols and Stanols Complementing a healthy diet*. Ontario, Canada. Recuperado el 30 de mayo de 2019 de: www.forbesmedi.com

Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Toivo, J. I., Swank, M. A., & Simpkins, A. H. (2002). *Free and esterified sterol composition of edible oils and fats*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(2), 123–142. <https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1044>

Piironen, Lindsay, Miettinen, Toivo, & Lampi. (2000). *Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 939–966. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)

- Prakashan, N. (2009). *Pharmacognosy*. Recuperado el 9 de junio de 2019 de: https://books.google.com.ec/books?id=KwYIsLRyDp4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Preeti, K., Sharma, R. A., & Mala, A. (2016). *ISOLATION AND IDENTIFICATION OF STEROIDS FROM DIFFERENT PARTS OF PROSOPIS JULIFLORA*. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2017v9i3.18896>
- Radulović, N., Stojanović, G., & Palić, R. (2006). *Composition and antimicrobial activity of Equisetum arvense L. essential oil*. *Phytotherapy Research*, 20(1), 85–88. <https://doi.org/10.1002/ptr.1815>
- Rajani Srivastava. (2017). (PDF) *An updated review on phyto-pharmacological and pharmacognostical profile of Amaranthus tricolor: A herb of nutraceutical potentials*, SSN (E): 2(SSN (E): 2277-7695 ISSN (P): 2349-8242 NAAS Rating 2017: 5.03 TPI 2017; 6(6): 124-129 © 2017 TPI www.thepharmajournal.com Received: 19-04-2017 Accepted: 20-05-2017), SSN (E): 2277-7695 ISSN (P): 2349-8242 NAAS Rating. Recuperado el 11 de junio de 2019 de: https://www.researchgate.net/publication/317653790_An_updated_review_on_phyto-pharmacological_and_pharmacognostical_profile_of_Amaranthus_tricolor_A_herb_of_nutraceutical_potentials
- Santana, P. M., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T., & Orellana, A. (2009). Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3), 45–53. Recuperado el 3 de junio de 2019 de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-71949118587&partnerID=40&md5=c00ba13b32ce0a8a4bf0a11273b5ccf7>
- Sendker, J., Böker, I., Lengers, I., Brandt, S., Jose, J., Stark, T., ... Hensel, A. (2017). *Phytochemical Characterization of Low Molecular Weight Constituents from Marshmallow Roots (Althaea officinalis) and Inhibiting*

- Effects of the Aqueous Extract on Human Hyaluronidase-1. Journal of Natural Products*, 80(2), 290–297.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00670>
- Shah, U. M., Patel, S. M., Patel, P. H., Hingorani, L., & Jadhav, R. B. (2010). *Development and Validation of a Simple Isocratic HPLC Method for Simultaneous Estimation of Phytosterols in Cissus quadrangularis. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(6), 753–758.
<https://doi.org/10.4103/0250-474X.84587>
- Slavin, M., & Yu, L. (Lucy). (2012). *A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. Food Chemistry*, 135(4), 2789–2795.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.043>
- Suhad S. AbuMweis y Peter J.H. Jones. (2009). Esteroles de origen vegetal, componentes naturales de las plantas con efectos potenciales de beneficio para la salud. Recuperado el 19 de enero de 2019 de: http://portal.aniname.com/imp_187.shtml
- Sujata V. Bhat, B.A. Nagasampagi, M. S. (2006). *Chemistry of Natural Products - Sujata V. Bhat, B.A. Nagasampagi, Meenakshi Sivakumar - Google Libros*. Springer. Recuperado el 20 de enero de 2019 de: https://books.google.com.ec/books?id=C3la6a_gnKUC&pg=PA29&dq=liebermann+burchard+reaction&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiptq-e6t_iAhWNwFkKHQnkBo8Q6AEINjAC#v=onepage&q=liebermann+burchard+reaction&f=false
- Thompson, G. R., & Grundy, S. M. (2005). *History and Development of Plant Sterol and Stanol Esters for Cholesterol-Lowering Purposes. The American Journal of Cardiology*, 96(1), 3–9.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.03.013>
- Valenzuela B., A., & Ronco M., A. M. (2004). FITOESTEROLES Y FITOESTANOLES: ALIADOS NATURALES PARA LA PROTECCION DE

LA SALUD CARDIOVASCULAR. *Revista Chilena de Nutrición*, 31, 161–169. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182004031100003>

Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). *Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381–412. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12021>

Vilahur, G., Ben-Aicha, S., Diaz, E., Badimon, L., & Padro, T. (2018). *Phytosterols and inflammation*. *Current Medicinal Chemistry*, 25. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180622151438>

ANEXOS

ANEXO 1.

Tabla 1.

Estudios previos realizados de fitoesteroles en plantas

Estudio	Referencia
Total Phytosterol Content in <i>Acanthospermum hispidum</i>	(L. B. Araújo et al., 2013)
Qualitative and quantitative estimation of phytoesterol in <i>Achyranthes aspera</i> and <i>Cissus quadrangularis</i>	(Kumar Ph Scholar et al., 2017)
Phyto-pharmacological profile of <i>Amaranthus tricolor</i> : A herb with nutraceutical potential	(Rajani Srivastava, 2017)
Extraction of Phytoesterol in soybeans	(Slavin & Yu, 2012)
Isolation from N-hexane of <i>Anisochilus Carnosus</i>	(N. Kiruthiga, 2014)
Efecto antiinflamatorio del aceite de rama de <i>Bursea graveolens</i> Triana & Planch. (Palo Santo) de Ecuador	(Santana et al., 2009)
Análisis en la semilla <i>Persea americana Miller (Var. Lorena)</i>	(López, R. ; Vélez, 2017)
Isocratic Method of HPLC estimation of Phytoesterols in <i>Cissus quadrangularis</i>	(Shah, Patel, Patel, Hingorani, & Jadhav, 2010)
Effects of B-sitoesterol derived from <i>Artemisia capillaris</i>	(Kim et al., 2014)
Isolation of Steroid from <i>Saurauia roxburgui</i>	(Ahmed et al., 2013)
Phytochemical Characterization of (<i>Althaea officinalis</i>)	(Sendker et al., 2017)
Isolation and Identification of steroids from different part of <i>Prosopis Juliflora</i>	(Preeti, Sharma, & Mala, 2016)
Isolation of Steroids	(Dinan et al., 2001)
Isolation of plant steroids from Acetone Extract of <i>Ficus iteophylla</i>	(Abdulmalik et al., 2011)
Phytoesterols: Aplicaciones and recovery methods	(Fernandes & Cabral, 2007)
Separation and Determination of sterols in olive oil	(Cañabate-Díaz et al., 2007)
Plant sterols in foods and vegetable oils	(Abidi, 2001a)
Phytosterols in corn Kernel	(Harrabi et al., 2008)
Plant Sterols	(Piironen et al., 2000)

Phytoosterols and Phytoestanolos in food	(Moreau et al., 2002)
Phytoesterol classes in olive oil	(Azadmard-Damirchi & Dutta, 2010)
Nutritional Components in Amaranth seeds	(Venskutonis & Kraujalis, 2013)
Composition and antimicrobial activity of <i>Equisetum arvense</i> L. essential Oil	(Radulović, Stojanović, & Palić, 2006)
Phytochemical Methods	(Harborne, 1998)

Los Anexos de 2 al 5 se encuentran confidenciales hasta el momento de su publicación.

