

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Aislamiento y caracterización de solanina por Espectroscopía de Infrarrojos en
berenjena (*Solanum melongena L.*)**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Químicas con
mención en Química Analítica**

PAMELA YEKATERINE VÉLEZ TERREROS

QUITO, 2014

CERTIFICADO

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, mención Química Analítica, de la candidata Pamela Yekaterine Vélez Terreros, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha:

Mtr. María Fernanda Pilaquina

DIRECTORA

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y la madre Dolorosa, por ser la luz de espiritualidad en mi vida.

A mis padres que son el eje fundamental de mi vida. Mi papi quien siempre me da las fuerzas para salir adelante, hombre correcto y honesto a quien admiro. A mi mami quien es mi mejor amiga que con su dulzura, amor y cariño siempre me apoya y me guía en la vida, gracias a ellos me he convertido en la mujer que soy, simplemente les amo.

A mis hermanos; Lenin que con sus acciones me enseña a salir adelante y Fabricio (Cheo) que nunca me abandonó en los momentos más difíciles, siempre siendo mí apoyo incondicional dándome palabras de aliento y ejemplo para lograr mis objetivos.

A mis familias, que estando cerca y lejos se han preocupado por mí, de manera especial a Lucy y Jenny mi prima, quienes siempre estuvieron a mi lado en mi vida universitaria.

A la Mtr. María Fernanda Pilaquina, mi directora de tesis, por su apoyo incondicional y por la confianza que me brinda.

A mis amigas Cris y Caro por mantener viva esa amistad sin importar la distancia.

A Juan Francisco y Vale quienes supieron ver en mí algo extraordinario y siempre me apoyan.

A mis amigos Jess, Ely, Elga, George, Sofí, Deivid, PLs y todos aquellos que de una u otra manera fueron y son un apoyo a lo largo de mi carrera universitaria por brindarme sus conocimientos y amistad.

Al doctor Glossman, por facilitarme información valiosa para este trabajo de investigación.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y todos los docentes que han sido parte de mi formación académica.

*Este trabajo está dedicado
con mucho amor, cariño y gratitud
a mis padres,
por su arduo sacrificio y
dedicación para alcanzar mi meta.*

*“Nunca permitas que tus miedos
sean más grandes que tus sueños”*

Johan David.

*“El secreto del éxito es estar preparado
para cuando llega tu oportunidad”*

Benjamín Disraeli.

TABLA CON CONTENIDOS

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE DIAGRAMAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I	6
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. BERENJENA (<i>Solanum melongena L.</i>).....	6
1.1.1. ETIMOLOGÍA.....	6
1.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	6
1.1.3. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA BERENJENA.....	8
1.1.4. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL.....	12
1.1.5. PROPIEDADES MEDICINALES DE LA BERENJENA.....	14

1.2.	ALCALOIDES.....	15
1.2.1.	GLICOALCALOIDES.....	15
1.2.2.	ALCALOIDES ESTEROIDALES.....	15
1.2.3.	BIOSÍNTESIS.....	16
1.2.4.	SOLANINA.....	17
1.2.4.1.	PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.....	19
1.2.4.2.	USO MEDICINAL.....	20
1.2.4.3.	TOXICIDAD.....	21
CAPÍTULO II.....		22
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1.	MUESTREO.....	22
2.2.	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	23
2.3.	EXTRACCIÓN.....	23
2.3.1.	EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.....	24
2.3.2.	EXTRACCIÓN POR MICRO-SOXHLET.....	24
2.3.3.	EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.....	24
2.4.	MÉTODO 1. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.....	25
2.5.	MÉTODO 2. EXTRACCIÓN POR MICRO-SOXHLET.....	25
2.6.	MÉTODO 3. EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.....	27
2.7.	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN.....	30
2.7.1.	CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	31

2.7.2.	IDENTIFICACIÓN DE SOLANINA POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	31
2.7.3.	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (IR).....	32
2.7.3.1.	INSTRUMENTACIÓN.....	34
2.7.4.	DETERMINACIÓN DE LA SOLANINA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS CON TRANSFORMADAS DE FOURIER (FT-IR).....	36
2.7.5.	OTRAS PRUEBAS.....	37
2.7.5.1.	DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN.....	37
2.7.5.2.	ENSAYO CUALITATIVO.....	37
CAPÍTULO III.....		39
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1.	EXTRACCIÓN	39
3.2.	IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO.....	43
3.2.1.	CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	43
3.2.2.	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS.....	44
3.2.3.	OTRAS PRUEBAS.....	54
3.2.3.1.	DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN.....	54
3.2.3.2.	ENSAYO CUALITATIVO.....	54
CAPÍTULO IV.....		55
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
4.1.	CONCLUSIONES.....	55

4.2. RECOMENDACIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición de la berenjena por cada 100g de fruto fresco	13
Tabla 1.2. Propiedades físicas y químicas de la solanina.....	20
Tabla 3.1. Concentración de solanina en extractos obtenidos por diferentes disolventes.....	41
Tabla 3.2. Contenido de solanina extraído de la cáscara seca de berenjena.....	42
Tabla 3.3. Resultados de identificación de solanina por cromatografía de capa fina.....	43
Tabla 3.4. Identificación de grupos funcionales en el espectro infrarrojo	46
Tabla 3.5. Resultados obtenidos del punto de fusión	54

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1.1. Diagrama de la biosíntesis	17
Diagrama 1.2. Diagrama sintomatológico por la ingesta de solanina	21
Diagrama 2.1. Diagrama de bloques de los componentes de un espectrofotómetro FT-IR	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Planta de <i>Solanum melongena</i> L.	7
Figura 1.2. Fruto de berenjena <i>Solanum melongena</i> L.	10
Figura 1.3. Cultivo de Berenjena, sector “El Limón” vía Portoviejo – Crucita, Ecuador.....	11
Figura 1.4. Estructura química de la solanina	18
Figura 1.5. Estructura tridimensional de la solanina	19
Figura 2.1. Macerado en ácido acético al 2%	26
Figura 2.2. Equipo de micro-Soxhlet	26
Figura 2.3. Pesado y macerado de la muestra seca.....	27
Figura 2.4. Muestra sometida a baño María y baño de ultrasonido.....	28
Figura 2.5. Filtrado y lavado	28
Figura 2.6. Separación de la fase orgánica	29
Figura 2.7. Evaporación de la fase orgánica recolectada	29
Figura 2.8. Berenjena de izquierda a derecha: cáscara, pulpa con semillas y pedúnculo	30
Figura 2.9. Representación de las vibraciones moleculares por la interacción con energía infrarroja	34
Figura 2.10. Esquema de un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR)	35
Figura 2.11. Equipo FT-IR Perkin Elmer modelo BTXII	36
Figura 3.1. Aislamiento de la solanina por el método de extracción por maceración	40
Figura 3.2. Cromatoplasmas de los métodos de extracción 1, 2 y 3	44
Figura 3.3. Espectro IR del estándar de solanina pura 99% Sigma Aldrich.....	45
Figura 3.4. Espectro IR del diclorometano.....	47

Figura 3.5. Espectro IR computacional de la molécula de solanina	48
Figura 3.6. Espectro infrarrojo (IR) de la molécula de flavonoide rutina computarizada.....	49
Figura 3.7. Comparación de los espectros IR del computacional y estándar, con el espectro de la muestra extraída del pedúnculo de berenjena	50
Figura 3.8. Comparación de los espectros IR del computacional y estándar, con el espectro de la muestra extraída de la pulpa con semillas de berenjena	51
Figura 3.9. Comparación de los espectros IR del computacional y estándar, con el espectro de la muestra extraída de la cáscara de berenjena	53

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Certificado de análisis de la Solanina	64
---	----

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización del glicoalcaloide esteroideal solanina por espectroscopía de infrarrojos en el fruto de berenjena *Solanum melongena L.* La solanina es un compuesto que ha demostrado tener actividad antiproliferativa y efectos anticancerígenos.

Se analizó el fruto de la berenjena adquirido en supermercados locales, empleando un muestreo de tipo aleatorio simple. Para la extracción de solanina, se probaron tres métodos: extracción con ácido acético al 5% y etanol absoluto; extracción con ácido acético al 2% y micro-Soxhlet con etanol al 80% y extracción por maceración con metanol. Cada proceso fue seguido de una etapa individual de aislamiento y purificación. El método con el que se identificó la presencia de solanina por cromatografía de capa fina (CCF) con un factor de retención (R_f) de 0.12 y una desviación estándar de 0.02 en el fruto de berenjena, fue el de maceración.

Posteriormente, se analizó la presencia de solanina en tres partes del fruto de berenjena: cáscara, pedúnculo y pulpa con semillas, siguiendo el método de extracción por maceración.

Se detectó la presencia de solanina en muestra de cáscara, con una concentración de 0.53 mg/g y una desviación estándar de 0.15.

La confirmación del compuesto se llevó a cabo por espectroscopía de infrarrojos (FT-IR). Las comparaciones de los espectros IR experimentales se realizaron con el espectro del estándar y el espectro computacional.

Además, se determinó que el punto de fusión del compuesto aislado fue de 283°C con una desviación estándar de 0.94. Se realizó el ensayo cualitativo de Libermann-Burchard, dando positivo para la presencia de un compuesto esteroidal.

En conclusión, se adecuó un método que permite la obtención de solanina a partir del fruto de la berenjena, identificando la presencia del compuesto en la cáscara y no en pedúnculo y pulpa con semillas.

Palabras claves: Solanina, aislamiento, *Solanum melongena L.*, CCF, espectroscopía de infrarrojos.

ABSTRACT

The purpose of this research was to isolate and to characterize the steroidal glycoalkaloid solanine using infrared spectroscopy in the fruit of eggplant *Solanum melongena* L. Solanine is a compound that has shown antiproliferative activity and anticancer effects. The eggplant was purchased on local supermarkets a simple random sampling type. Solanine was extracted using three methods: extraction with acetic acid 5% and absolute ethanol; acetic acid 2% extraction and micro-Soxhlet with ethanol 80%; and extraction by maceration with methanol. Each process was followed by a single stage of isolation and purification. The method that identified the presence of solanine in the eggplant, using thin layer chromatography with a retention factor (Rf) of 0.12 and a standard deviation of 0.2 in eggplant fruit, was maceration. Subsequently, the presence of solanine was analyzed in three parts of the eggplant fruit: peel, stalk and pulp with seedst, following the method of extraction by maceration. Solanine presence was detected in peel sample with a concentration of 0.53 mg/g and a standard desviation 0.15. Infrared spectroscopy (FT-IR) was used to confirm the presence of the compound. Comparisons of experimental IR spectra were made with standard and computational spectrum. Furthermore, it was determined that the melting point of the isolated compound is 283 °C with a standard deviation of 0.94. Qualitative Liebermann-Burchard test gave a positive result for the presence of steroids. In conclusion, a method to isolate solanine from eggplant fruit was adapted, identifying the presence of the compound just in the peel.

Keywords: Solanine, isolation, *Solanum melongena* L, TLC, infrared spectroscopy.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, esto es algo conocido y explotado por el hombre desde hace muchos años. Gracias a la importante biodiversidad del planeta, el aprovechamiento de estos recursos cada vez adquiere mayor protagonismo y divulgación. La biodiversidad es un tema amplio y complejo que abarca desde la variabilidad genética de especies, poblaciones, comunidades y ecosistemas, hasta el conocimiento de las relaciones que se establecen entre los seres humanos y la naturaleza. El desconocimiento taxonómico, es uno de los principales obstáculos para su conservación y utilización sostenible [1].

El alcance de las enfermedades hoy en día se prolifera de una manera muy rápida en especial el cáncer, es por esta razón que alrededor de todo el mundo se buscan maneras y productos para prevenir o curar dicha enfermedad.

El presente trabajo tiene como finalidad el aislamiento y caracterización de la solanina obtenida de la berenjena *Solanum melongena L.* La importancia del estudio de la solanina como alcaloide se concentra en su actividad antiproliferativa, es decir que actúa contra las células cancerosas del colon e hígado humano. Investigaciones realizadas revelan que este compuesto como anticancerígeno ataca a las células malignas del cuello uterino, el linfoma y el estómago [2].

En la actualidad existen estudios de la extracción de solanina en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) [3]. Sin embargo, se encuentra muy poca información de la solanina en otros tipos de plantas de la familia *Solanaceae*.

La solanina es un glicoalcaloide esteroidal derivado de las plantas del género *Solanum*, cuya fórmula elemental es $C_{45}H_{73}NO_{15}$. Está constituida por tres partes: un oligosacárido, un esteroide y un heterociclo que contiene nitrógeno. Es una sustancia tóxica en concentraciones de 2 mg/kg. Se encuentra presente en las hojas, frutos y tubérculos.

Debido a la presencia de este compuesto en la berenjena (*Solanum melongena L.*), se ha visto la necesidad de adecuar un método de extracción, aislamiento y caracterización de esta sustancia en el fruto, ya que es la parte comestible de la planta.

Para poder guiar de una manera más fácil al lector a través de este trabajo, a continuación se detalla la estructura del mismo:

En el Capítulo I, se encuentra una descripción de la planta de berenjena y la solanina.

En el Capítulo II, se indican los principios teóricos de las técnicas analíticas implementadas en este trabajo, al igual que los materiales y métodos ocupados en el desarrollo experimental.

En el Capítulo III, se encuentran los resultados obtenidos, los mismos que son discutidos por comparaciones experimentales y teóricas de otros estudios realizados.

En el Capítulo IV, se muestran las conclusiones y recomendaciones obtenidas del trabajo de investigación.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. BERENJENA (*Solanum melongena L.*)

1.1.1. ETIMOLOGÍA [4]

El nombre científico de la berenjena es *Solanum melongena L.* *Solanum* proviene del vocablo griego *strychnos* y podría ser relacionado con el latín “sol ”, debido a que la planta crece sitios algo soleados. *Melongena* proviene del vocablo griego *byzantino*, que significa negro, probablemente por el color del fruto.

1.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA [5]

A continuación se realiza una breve descripción acerca de la clasificación taxonómica de la planta de berenjena. En la Figura 1.1 podemos observar la representación de la planta y su fruto.

- Nombre común: *Berenjena*
- Reino: *Plantae*
- Subreino: *Viridaeplantae*
- Superdivisión: *Streptophyta*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliosida*
- Orden: *Solanales*
- Familia: *Solanaceae*
- Género: *Solanum L.*
- Especie: *Solanum melongena L.*

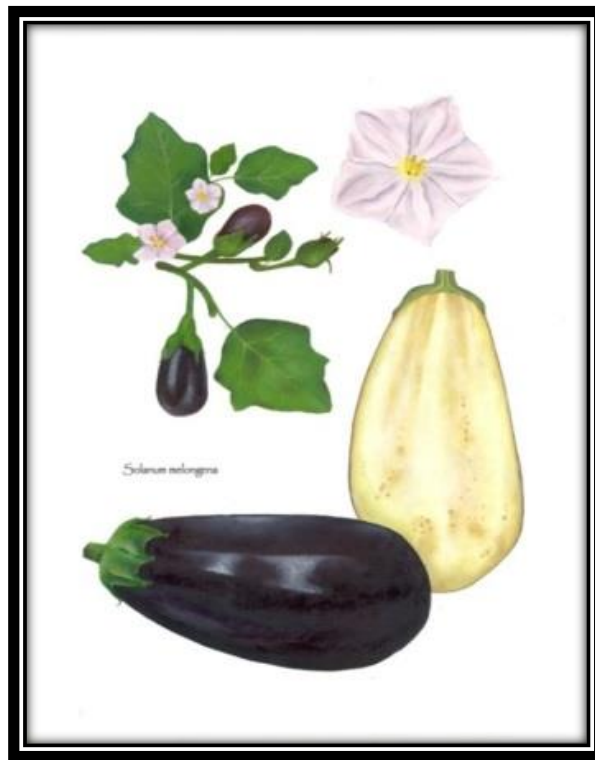


Figura 1.1. Planta de *Solanum melongena L.* [6]

1.1.3. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA BERENJENA

ORIGEN

Su origen se dio en zonas subtropicales y tropicales asiáticas. En la actualidad se cultiva en países mediterráneos como España, Italia, Grecia y en América fue introducida por los españoles. China y la India son los países con mayores cultivos en el mundo [7].

PLANTA

Es una planta herbácea, en sus tallos se encuentran tejidos lignificados que le dan aspecto arbustivo, puede rebrotar dos veces al año con un cuidado y poda adecuada. Mide entre 0,7 a 1,0 m de altura. Tiene varias ramificaciones erectas, espinosas [7].

SISTEMA RADICULAR

Su sistema radicular es muy potente, lo que permite soportar periodos de sequía, y sus raíces alcanzan grandes profundidades [8].

HOJAS

Son enteras, ovaladas y grandes, miden de 15 a 25 cm de largo con nervaduras que presentan espinas y por la parte posterior están cubiertas de una vellosidad grisácea, insertas de forma aleatoria en el tallo [8].

FLORES [7]

Las flores se presentan solitarias o en pequeños racimos, de tamaño mediano, con cáliz de 5 o más sépalos espinosos, con corola de 5 o más pétalos de color violáceo y con estambres que

encierran el ovario que después de autofecundación dará origen al fruto o baya que constituye el órgano de consumo.

Los pétalos son de color violáceo, tanto el pedúnculo como el cáliz poseen abundantes espinas, aunque actualmente se tiende al cultivo de variedades sin espinas. Los estambres presentan anteras muy desarrolladas de color amarillo que se sitúan por debajo del estigma, dificultando la fecundación directa. El cáliz de la flor perdura después de la fecundación y crece junto al fruto, envolviéndolo por su parte inferior, lo que puede dar lugar a ataques de botritis cuando la humedad relativa es elevada, ya que los pétalos quedan atrapados entre el cáliz y el fruto.

La mayor parte de las variedades florecen en ramilletes de tres a cinco flores, una de las cuales es hermafrodita de pedúnculo corto y continuo desde el tallo hasta el cáliz, da lugar a un fruto comercial, mientras que el resto de las flores abortan o dan lugar a un fruto pequeño de peor calidad. Normalmente la primera flor aparece en el vértice de la primera bifurcación o tallo principal de la planta. La fecundación de la flor es autógena, aunque también puede haber cruzamiento con flores de otras plantas o incluso de la misma planta. El exceso de humedad perjudica la dehiscencia del polen, por lo que la flor puede caerse como consecuencia de la falta de fecundación.

FRUTO [7]

Los frutos de la berenjena son de forma variable desde redonda a alargada, con un tamaño muy pequeño (2 cm) a grandes (30 cm de largo), con una epidermis lisa o corrugada.

Existen diversas variedades de color oscuro, rayadas o de color más claro, y de forma alargadas o cortas. El color del fruto depende de la cantidad de antocianinas que tenga el mismo. Los frutos brillantes de color negro o morado oscuro (Figura 1.2) son más

demandados. La estructura interna de la berenjena en estado inmaduro es comparable al tomate del género *Solanum lycopersicum*, pero en la medida que avanza la madurez, se hace difícil distinguir los diferentes tejidos porque las paredes del fruto se fusionan con tejido desarrollado a partir de la placenta, formando una sola masa de tejido parenquimatoso, en el que se encuentran inmersas semillas.

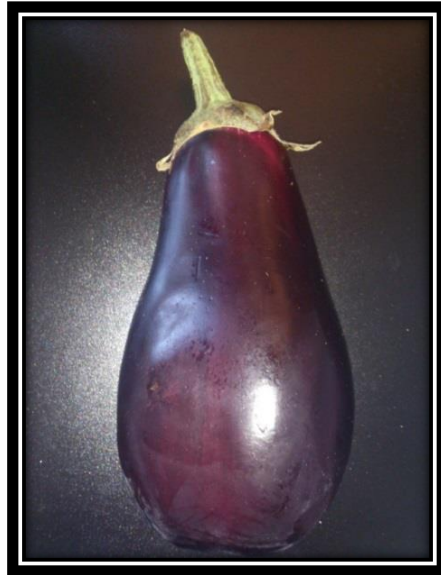


Figura 1.2. Fruto de berenjena *Solanum melongena* L.

SEMILLAS

Sus semillas son pequeñas aproximadamente de 2 mm, tienen unas texturas planas y pardas.

VARIETADES [7]

Las variedades de berenjenas que se comercializan son:

- “Americana” se basa en su uniformidad de forma (ovalada a globosa), firmeza y color de la piel púrpura oscuro.

- “Japonesa” es elongada, delgada, de color púrpura claro a oscuro, muy perecedera.
- “Blanca” tiene forma ovalada a globular, tamaño pequeño y de piel delgada.
- “Mini-Japonesa” es pequeña, elongada, con vetas de diferentes tonalidades de púrpura y violeta.
- “China” que es elongada, delgada y de color púrpura claro.

ZONAS DE CULTIVO

En el Ecuador no existe un registro de las principales zonas de cultivos de la berenjena, pero se conoce que en la provincias de Manabí, Chimborazo y Pichincha se encuentra cultivos artesanales, siendo Manabí la principal provincia que provee de este producto al resto del país. En Figura 1.3 podemos observar un cultivo artesanal existente en la provincia de Manabí.



Figura 1.3. Cultivo de Berenjena, sector “El Limón” vía Portoviejo – Crucita, Ecuador

REQUISITOS CLIMATOLÓGICOS

La berenjena tiene un mejor crecimiento a temperaturas promedio mensuales de 21 a 29 °C, por lo que se le denomina un cultivo de época cálida. Las temperaturas promedio menores a 18 o mayores a 35 °C pueden ser una causa limitante para el crecimiento, polinización y fructificación de estos cultivos. Las temperaturas que se consideran óptimas son diurnas de 26 a 32 °C y nocturnas de 21 a 26 °C. A temperaturas por debajo de los 15 °C el crecimiento de la planta es mínimo. Al exponerse a temperaturas por debajo de los 10 °C, tanto la planta como el fruto sufren daños por el frío. Condiciones de humedad muy alta o muy baja favorecen la presencia de distintos tipos de enfermedades e insectos que pueden ser dañinos a la planta [9].

1.1.4. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

El fruto de la berenjena resulta adecuado para tratar la obesidad y se utiliza en las dietas para adelgazar por su alto contenido en agua, que supera el 90% y especialmente por su bajo contenido calórico. Su consumo aporta minerales, como fósforo y hierro, junto con el calcio, el sodio y el potasio. Su aporte vitamínico es pobre en comparación con otras frutas, verduras u hortalizas. Posee vitamina B₆, vitamina B₉ y en cantidades menos apreciables vitamina B₁ y vitamina B₂ [10].

La piel de la berenjena contiene una antocianina, la nasunina, con acción antioxidante sobre los lípidos sanguíneos. Además contiene flavonoides que pueden ayudar a disminuir los niveles de colesterol [11]. En la Tabla 1.1 se pueden apreciar los componentes y sus respectivas cantidades por cada 100 gramos de fruto fresco.

Tabla 1.1. Composición de la berenjena por cada 100 g de fruto fresco [11]

ELEMENTO	POR 100 g DE PORCIÓN COMESTIBLE
Energía (kcal)	27
Proteínas (g)	1.2
Lípidos totales (g)	0.2
AG saturados (g)	0.05
AG monoinsaturados (g)	Trazas
AG poliinsaturados (g)	0.1
Colesterol (mg/1000kcal)	0
Hidratos de carbono (g)	4.4
Fibra (g)	1.2
Agua (g)	93
Calcio (mg)	11
Hierro (mg)	0.7
Yodo (µg)	2
Magnesio (mg)	12
Zinc (mg)	0.28
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	214
Fósforo (mg)	21.4
Selenio (µg)	1
Tiamina (mg)	0.04

Riboflavina (mg)	0.05
Niacina (mg)	0.6
Vitamina B ₆ (mg)	0.08
Folatos (µg)	18
Vitamina B ₁₂ (µg)	0
Vitamina C (mg)	6
Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	3
Vitamina E (mg)	0.03

1.1.5. PROPIEDADES MEDICINALES DE LA BERENJENA

Los principales beneficios medicinales de la berenjena se describen a continuación [12]:

- Mejora la circulación sanguínea
- Interviene en la prevención de arteriosclerosis
- Ayuda a disminuir el colesterol
- Intervienen como desengrasante, no permitiendo que los ácidos grasos saturados se depositen en las arterias
- Estimula la bilis, lo cual permite disolver las grasas ayudándole al hígado
- Contribuye con un efecto balsámico calmando dolores
- Es muy adecuada para tratar la obesidad

1.2. ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos de carácter básico, provenientes en su mayoría de las plantas como metabolitos secundarios.

La estructura química de los alcaloides es extremadamente variable. Un alcaloide contiene al menos un átomo de nitrógeno procedente de un tipo de amina. En su forma pura, la mayoría de alcaloides son sólidos cristalinos incoloros, no volátiles y tienden a tener un sabor amargo [13].

1.2.1. GLICOALCALOIDES

Los glicoalcaloides son compuestos formados por la unión de un alcaloide y un azúcar. Son metabolitos secundarios que la propia planta produce como mecanismo de protección y en respuesta a situaciones de estrés, como la temperatura o ataque de insectos u hongos, actuando como un insecticida sobre ellos [3].

1.2.2. ALCALOIDES ESTEROIDALES [14]

Los alcaloides esteroideos están presentes en las familias *Solanaceae* y *Liliaceae*. Son sustancias que poseen características tanto de esteroides como de alcaloides. En su estructura tienen un núcleo complejo que contiene nitrógeno.

Los esteroides son compuestos orgánicos, derivados del núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano que están compuestos de carbono e hidrógeno

formando cuatro anillos fusionados. Su estructura básica posee 17 átomos de carbono en total, la misma que puede ser modificada por adición de diferentes grupos funcionales.

1.2.3. BIOSÍNTESIS [15]

En el Diagrama 1.1 se observa una simplificación de la biosíntesis de los glicoalcaloides esteroidales. En (a) se presenta la biosíntesis a partir de la acetil coenzima A hasta la formación de glicoalcaloides esteroidales, en el proceso, interfiere el sustrato FPP (*2-trans*, *6-trans*farnesildifosfato). Las flechas entrecortadas indican múltiples pasos enzimáticos. Los terpenos hacen referencia a isoprenoides de bajo peso molecular. En (b), se muestran las fórmulas estructurales para varios intermediarios de la biosíntesis de glicoalcaloides esteroidales.

La solanina se sintetiza del colesterol que es producido en la planta por factores que producen estrés a la misma.

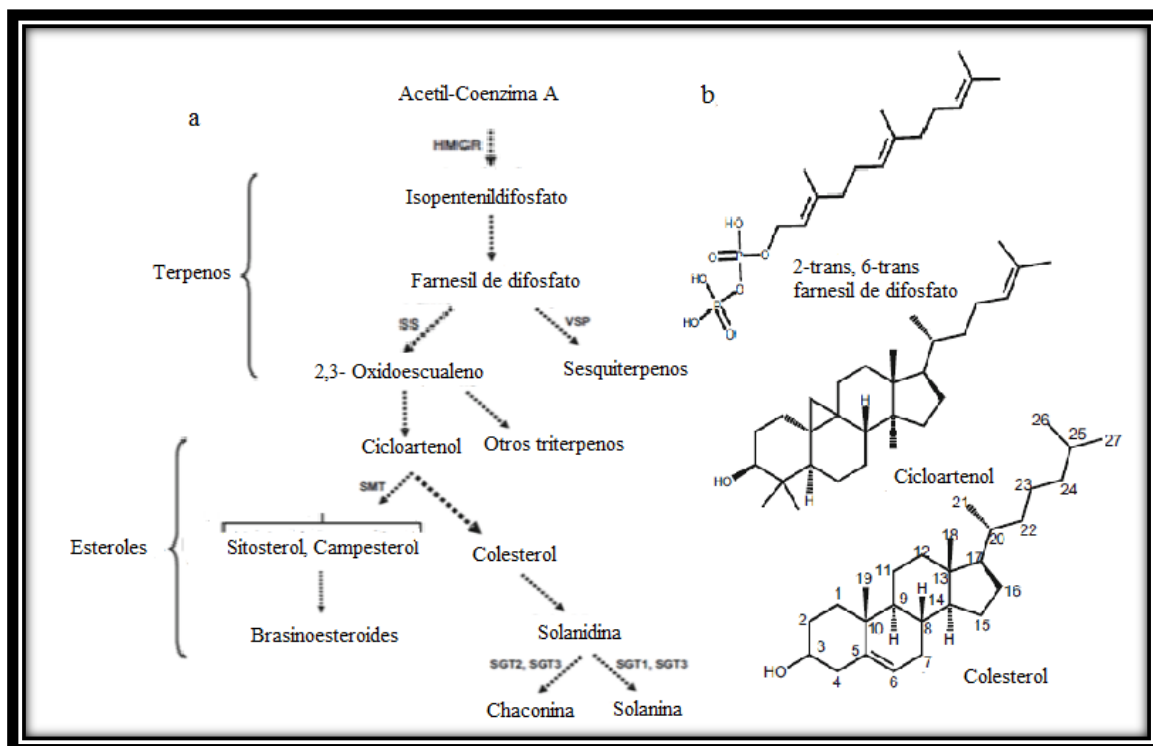


Diagrama 1.1. Diagrama de la biosíntesis, (Acetyl- CoA, acetil coenzima A; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril; SS, escualeno sintasa; VSP, ciclase vetispiradiene; SMT, esterol C24-metiltransferasa; SGT, glicosiltransferasa solanidina) [15]

1.2.4. SOLANINA

Fue aislada por primera vez en 1821 por Desfosses, en las bayas maduras de la yerba mora (*Solanum nigrum*) [16]. Se encuentra de manera natural en los miembros de la familia de las *Solanaceas* como las papas (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), la hierba mora y la berenjena, entre otros. Esta sustancia es parte del mecanismo de defensa natural de la planta.

La solanina es un glicoalcaloide esteroide derivado de las plantas del género *Solanum*, cuya fórmula elemental es $C_{45}H_{73}NO_{15}$. Está formado por una parte de oligosacáridos, un esteroide y un heterociclo que contiene nitrógeno como se muestra en la Figura 1.4

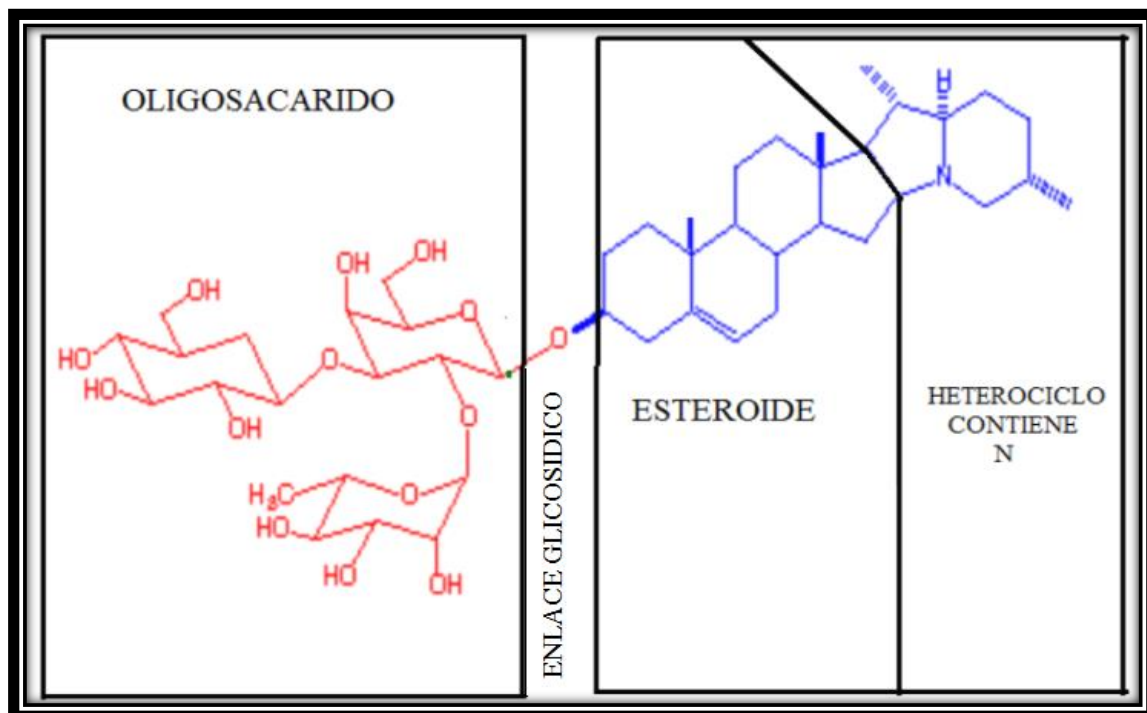


Figura 1.4. Estructura química de la solanina [17]

En la Figura 1.5 se observa la fórmula tridimensional de la molécula de solanina, donde las esferas de color gris corresponden a los átomos de carbono, las de color rojo a los oxígenos, las blancas a los hidrógenos y la de color azul al nitrógeno.

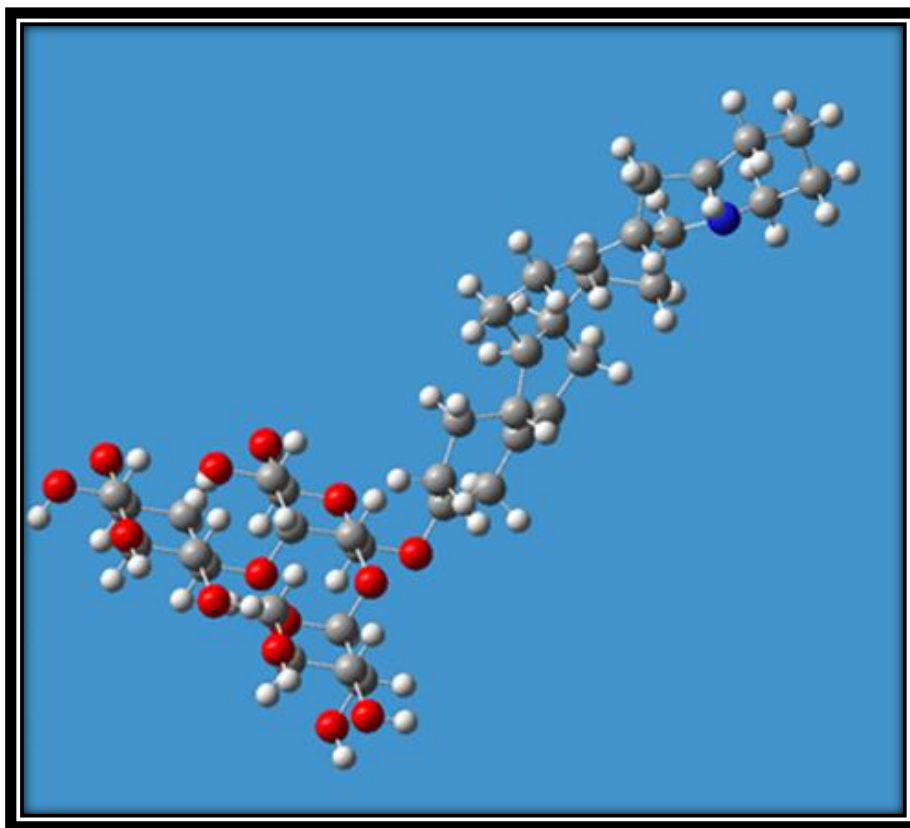


Figura 1.5. Estructura tridimensional de la solanina

1.2.4.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

En la Tabla 1.2 se puede observar algunas propiedades físicas y químicas correspondientes a la molécula de solanina. En su estructura denota la presencia del átomo de nitrógeno como alcaloide. Presenta un elevado peso molecular lo que indica que se trata de una macromolécula. El compuesto es altamente soluble en alcohol caliente y poco soluble en agua.

Tabla 1.2. Propiedades físicas y químicas de la solanina [18,19]

Solanina	
Sinónimos:	Solanina, Solatunina.
Número de CAS:	20562-02-1
Fórmula molecular:	$C_{45}H_{73}NO_{15}$
Peso molecular:	868.06 g/mol
Punto de fusión:	285 °C
Cristalización:	Agujas largas en alcohol
Solubilidad:	Soluble en alcohol caliente Muy poco soluble en agua Insoluble en éter, cloroformo y benceno

1.2.4.2.USO MEDICINAL

Históricamente la solanina se ha utilizado en el tratamiento de epilepsia y el asma. Tiene una actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* y de *Staphylococcus aureus*. La importancia del estudio de este glicoalcaloide se centra en su actividad antiproliferativa, es decir que actúa contra las células cancerosas del colon e hígado humano. Como efectos anticancerígenos podemos mencionar que ataca a las células malignas del cuello uterino, el linfoma y el estómago. Estas pruebas clínicas se ensayaron en base a la extracción de solanina contenida en la papa (*Solanum tuberosum*) [2].

Estudios realizados en los últimos años, revelan que la solanina podría inducir cambios morfológicos en las células hepatocarcinomas [20].

1.2.4.3. TOXICIDAD

En los animales, la ingesta total de la planta puede llegar a producir diversos tipos de intoxicaciones, en los seres humanos que regularmente consumen el fruto de la berenjena se pueden observar diferentes tipos de problemas neurológicos y gastrointestinales, que pueden evaluarse como toxicidad aguda, subaguda y crónica [21], de acuerdo a la dosis de solanina ingerida pueden presentar diversos sintomatología como se resume en el Diagrama 1.2. Así, una dosis de 2 – 4 mg/kg se considera peligrosa, determinándose como dosis letal media (DL₅₀) a la ingesta de cantidades mayores a 5 mg/kg [22].

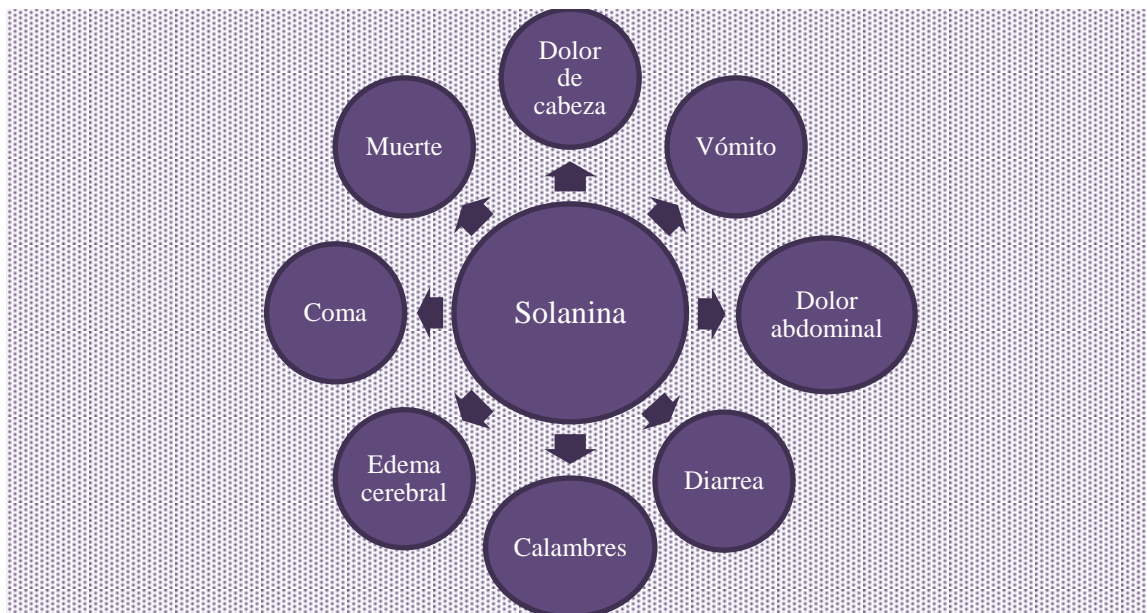


Diagrama 1.2. Diagrama sintomatológico por la ingesta de solanina

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el aislamiento y posterior caracterización de la solanina del fruto de la berenjena, se emplearon tres métodos de extracción, los cuales se describen a continuación:

2.1. MUESTREO

El muestreo es una herramienta de la investigación científica, cuya función básica es determinar que parte de una población debe examinarse, con la finalidad de hacer inferencias sobre dicha población.

Para la extracción se utilizaron frutos de berenjena *Solanum melongena L.* del tipo americana. Las muestras analizadas fueron adquiridas mediante un muestreo probabilístico aleatorio simple en la provincia de Pichincha, ciudad Quito en los supermercados Supermaxi de la Av. 12 de Octubre y Plaza del Norte.

Los criterios de recolección de muestras se basaron en similitud de peso, color, textura y lisura de piel del fruto de la berenjena. Las muestras fueron identificadas adecuadamente y de modo inmediato para su posterior análisis. En cada método de extracción, se tomó como muestra representativa el doble del peso sugerido en la técnica. Se realizaron cinco repeticiones por método, dando como resultado un total de quince muestras analizadas.

Una vez adecuado el método idóneo de extracción, se usaron cinco muestras más para las pruebas de caracterización.

2.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tratamiento previo al análisis asegura la homogeneidad de la muestra analítica, ya que esta debe contener todos los componentes de la muestra completa y además mantener las mismas proporciones.

Para los métodos de extracción 1 y 2, se lavó el material vegetal y se procedió a recortar en rebanadas de aproximadamente 5 cm de todo el fruto. Se homogeneizó y se separó en frascos con sellado hermético de acuerdo a la cantidad necesaria para cada método.

En el método 3 luego de la homogeneización, la muestra fue secada en la estufa Memmert® modelo UNB 500 a 60 °C por aproximadamente 24 horas.

2.3. EXTRACCIÓN

La extracción es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente. La separación de una mezcla de compuestos sólidos también se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad en un determinado solvente.

2.3.1. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

Es el proceso por el cual se extrae un componente soluble de un sólido mediante un solvente.

Para llevar a cabo la extracción será necesario, en primer lugar, poner en contacto íntimo las dos fases hasta conseguir la transferencia de soluto de la mezcla original al disolvente. Una vez finalizada esta etapa de transporte de materia, se procede a la separación de las fases, obteniéndose una mezcla de disolvente y soluto llamada “extracto” y una mezcla de la que se ha extraído el soluto, denominada “refinado”, que estará formada por la fase sólida inerte con una parte de la disolución retenida [23].

2.3.2. EXTRACCIÓN POR MICRO-SOXHLET

Es una extracción cíclica continua, donde se emplea un solvente orgánico que al evaporarse, asciende hasta el refrigerante donde se condensa y cae por goteo al compartimento que contiene la muestra, extrayendo el analito de interés [24].

2.3.3. EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

Esta técnica se basa en la extracción de la fase sólida con una fase líquida, donde la materia vegetal (sólida) al ser molida o fragmentada, permite que el solvente (líquido) penetre en los tejidos de la muestra de tal manera que los ablanda y disuelve las porciones solubles, facilitando la extracción [25].

2.4. MÉTODO 1: EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

Este método se basó en lo indicado por Trease *et al.* (1988) [26] para la extracción de alcaloides en papa (*Solanum tuberosum*). Se pesaron 25 g de muestra fresca previamente tratada como se indicó en el apartado 2.2, en una balanza analítica Mettler Toledo modelo AL204 con precisión de 0.1 mg. Se licuó con 100 mL de una solución de ácido acético al 5%/etanol (1:9) por 5 minutos. Posteriormente, se filtró con una bomba de vacío Gast modelo DAA-V704-EB utilizando tierras de diatomeas como medio filtrante. El filtrado se calentó en una placa marca Velp a 90°C hasta que se redujo a la mitad del volumen inicial. Ésta solución se alcalinizó con 120 mL de hidróxido de amonio al 10%, se filtró nuevamente al vacío con tierras de diatomeas y se realizaron tres lavados con 25 mL de hidróxido de sodio 0.1 N. El residuo se colocó en un vaso de precipitación y se lavó con 50 mL de ácido acético al 5%. Se agitó y se realizó una última filtración. El filtrado se lo llevó a baño María en el equipo Gemmy modelo YCW-010E hasta la evaporación completa del solvente.

2.5. MÉTODO 2: EXTRACCIÓN POR MICRO-SOXHLET

Este método fue propuesto por Spoladore, D. *et al.* (1983) [27] en su artículo “*Extração e isolamento de α -Solanina de brotos de batata*”. Se pesaron 500 g de la muestra previamente tratada y se dejó en maceración en un frasco ámbar con 2 L de ácido acético al 2% por 48 horas (ver Figura 2.1). Luego se procedió a filtrar y se ajustó el pH a 9 del filtrado con 35 mL de hidróxido de amonio 15 M. Se sometió a un baño María a 85.5°C por un tiempo de 5 horas y luego se refrigeró por 24 horas.



Figura 2.1. Macerado en ácido acético al 2%

El precipitado fue separado por centrifugación utilizando una centrifuga Mixtasel BL a 100 rpm durante 5 minutos. Se lavó al precipitado dos veces con 15 mL de hidróxido de amonio al 1%, se filtró y se dejó secar a temperatura ambiente.

El residuo, se introdujo en cartuchos de papel filtro que se colocaron en la cámara de extracción del equipo de micro-Soxhlet. La extracción se realizó con 17 mL de etanol al 80% por 5 horas (ver Figura 2.2). Para la eliminación del solvente, se rotaevaporó en el equipo de marca Büchi® modelo BM 200.



Figura 2.2. Equipo de micro-Soxhlet

2.6. MÉTODO 3: EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

En el método descrito por CaasiLit, M, *et al.* (1990) [28]. Se pesaron 4 g de muestra seca tratada previamente como se muestra en la Figura 2.3, la misma que se colocó en un frasco ámbar con 40 mL de metanol absoluto, se agitó y se dejó en maceración por 17 horas.



Figura 2.3. Pesado y macerado de la muestra seca

El extracto se sometió a baño María con una temperatura constante de 50 °C por un tiempo de 4 horas y se colocó por 30 minutos en un baño de ultrasonido Branson modelo 3510, como se ilustra en la Figura 2.4.



Figura 2.4. Muestra sometida a baño María y baño de ultrasonido

Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró y se lavó el papel filtro con tres porciones de 5 mL de metanol absoluto. Se recogió el lavado como se indica en la Figura 2.5, la solución recolectada se evaporó hasta obtener un volumen de 2 mL aproximadamente y se adicionó 20 mL de ácido clorhídrico al 1%, se mezcló y filtró.

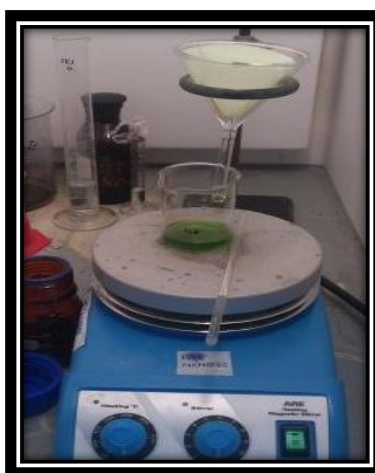


Figura 2.5. Filtrado y lavado

Se lavó el papel filtro con 15 mL de ácido clorhídrico al 1% y amoníaco concentrado (1:1), la solución del lavado se recolectó y se añadieron 10 mL de cloroformo. Se trasvasó la mezcla a

un embudo de separación, donde se recogió la fase orgánica y se realizaron tres extracciones con 10 mL de cloroformo y etanol (3:2) como se indica en la Figura 2.6.



Figura 2.6. Separación de la fase orgánica

La fase orgánica recolectada se rotaevaporó a 75°C, como se muestra en la Figura 2.7.



Figura 2.7. Evaporación de la fase orgánica recolectada

Una vez que se probó que el método 3 fue el mejor para el proceso de extracción, se realizó el muestreo y tratamiento de las muestras de acuerdo a las condiciones señaladas anteriormente, en el fruto fresco dividido en tres partes: cáscara, pedúnculo y pulpa con semillas como se muestra en la Figura 2.8 y se procedió con lo indicado en el apartado 2.6.

Finalmente por gravimetría, se determinó la cantidad de analito obtenido en cada una de las partes del fruto analizado. Se tomó en cuenta el peso inicial y final de los balones para el cálculo correspondiente.



Figura 2.8. Berenjena de izquierda a derecha: cáscara, pulpa con semillas y pedúnculo

2.7. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

La identificación se realizó por cromatografía de capa fina (TLC) con el estándar de solanina, mientras que la caracterización se hizo por espectroscopía de infrarrojos con transformadas de Fourier (FT-IR). Se determinó el punto de fusión y se realizó un ensayo cuantitativa.

2.7.1. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La cromatografía de capa fina conocida también como TLC (thin layer chromatography, por sus siglas en inglés) es una técnica cromatográfica que se utiliza para la separación de componentes puros de una mezcla.

En la cromatografía de capa fina, la fase estacionaria está constituida por una cromatoplaca. El sustrato que se va analizar se coloca cerca del borde de la superficie absorbente en forma de una pequeña mancha circular con la ayuda de un capilar y se deja secar. Luego, se sumerge este borde de la placa en el disolvente o fase móvil. El disolvente asciende por la placa por efecto de la capilaridad, arrastrando consigo el sustrato. Antes de que alcance el extremo superior de la placa, se detiene el flujo del disolvente retirando la placa de la cámara cromatográfica. Se deja secar y se revela [29].

El coeficiente de partición, o factor de retención (R_f), relaciona la distancia recorrida por el o los componentes del sustrato sobre la distancia recorrida por el disolvente, lo que nos permite tener la cualificación. Dicha relación responde a la fórmula [29]:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el sustrato}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}} \quad (1)$$

2.7.2. IDENTIFICACIÓN DE SOLANINA POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Para la identificación, se empleó la técnica de cromatografía de capa fina utilizando como estándar a la solanina Sigma Aldrich con pureza al 99% (ver Anexo I) y los productos obtenidos de los tres métodos propuestos.

Se utilizaron cromatoplasmas de silicagel marca Merck 60G. Como disolvente se utilizó una mezcla de cloroformo, metanol e hidróxido de amonio al 1% (70:30:5) [30]. Se saturó la cámara cromatográfica por 20 minutos y se colocaron las placas tomando en consideración que el solvente no sobrepase la línea de siembra de las muestras.

Se realizó el revelado del analito rociando las cromatoplasmas con una solución de ácido sulfúrico y metanol (1:1), permitiendo de esta manera la formación de un complejo colorimétrico de color rojo.

La identificación del compuesto se realizó comparando los factores de retención (R_f).

2.7.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (IR)

La espectroscopía de infrarrojos es una técnica analítica que se utiliza para el estudio de moléculas, que se basa en la región infrarroja del espectro. Esta es la región de longitudes de onda que da mayor información sobre las vibraciones de las moléculas y, por lo tanto, sobre la estructura de las mismas.

La espectroscopía infrarroja se emplea principalmente para compuestos orgánicos y, esencialmente, para identificación y determinación de estructuras químicas [29].

Los tipos de muestras que se pueden analizar por espectroscopia de infrarrojos son:

- Muestras sólidas (puras o mezclas)
- Muestras líquidas (puras o solución)
- Muestras gaseosas

En el caso de las muestras líquidas y gaseosas se emplean celdas como un acople en el equipo.

Las sustancias al tener enlaces químicos producen frecuencias de vibración específicas, las mismas que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Las frecuencias dependen

de las masas atómicas, de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula y de la geometría molecular.

Cuando la muestra es incidida por la radiación infrarroja, ésta es capaz de ocasionar cambios en los estados vibracionales de la molécula. La posición e intensidad de las bandas depende de la molécula en análisis. La absorción de radiación que obtiene la muestra, indica el tipo de enlace y grupos funcionales presentes en la muestra.

La región del infrarrojo se divide en tres subregiones, conocidas como infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio o fundamental (MIR) y el infrarrojo lejano (FIR). El análisis químico tiene mayor aplicación en el infrarrojo medio ($4000-600\text{cm}^{-1}$) y el infrarrojo cercano.

Los tipos de vibraciones que ocurren en la molécula, se dan por las posiciones relativas de los átomos que no están fijas, sino que fluctúan continuamente como resultado de diferentes tipos de vibración. Pueden distinguirse dos tipos básicos de vibraciones, las de tensión y las de flexión.

Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión. Los distintos tipos de vibración se ilustran en la Figura 2.9.

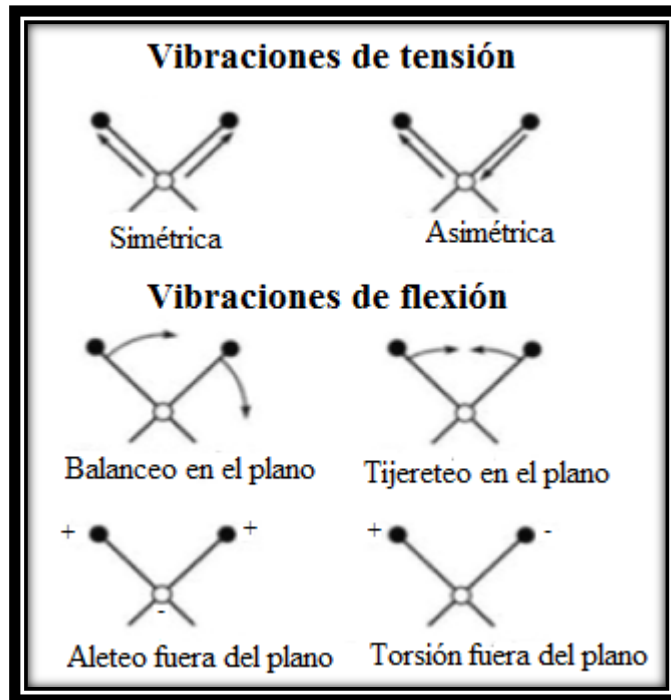


Figura 2.9. Representación de las vibraciones moleculares por la interacción con energía infrarroja [31]

2.7.5.3. INSTRUMENTACIÓN

El espectrofotómetro FT-IR está constituido por cuatro componentes fundamentales: fuente, interferómetro, compartimiento de muestra, detector y salida los cuales están representados en el Diagrama 2.1.

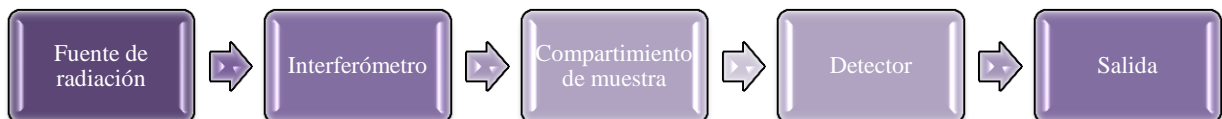


Diagrama 2.1. Diagrama de bloques de los componentes de un espectrofotómetro FT-IR

El espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier, está constituido por un interferómetro de Michelson el cual posee un espejo móvil, un espejo fijo y un divisor de haz como se observa en la Figura 2.10.

El haz de radiación infrarroja es generado en la fuente y después de su colimación se dirige hacia el interferómetro mediante un espejo. El rayo del láser sigue a la radiación infrarroja a través del interferómetro con el objeto de determinar el desplazamiento del espejo móvil y para conocer la longitud de onda a la que se produce la absorción de radiación, luego se encuentra un espejo ajustable que conduce el rayo procedente del interferómetro a la muestra. Desde el compartimiento de la muestra el rayo llega a un detector térmicamente estable [31].

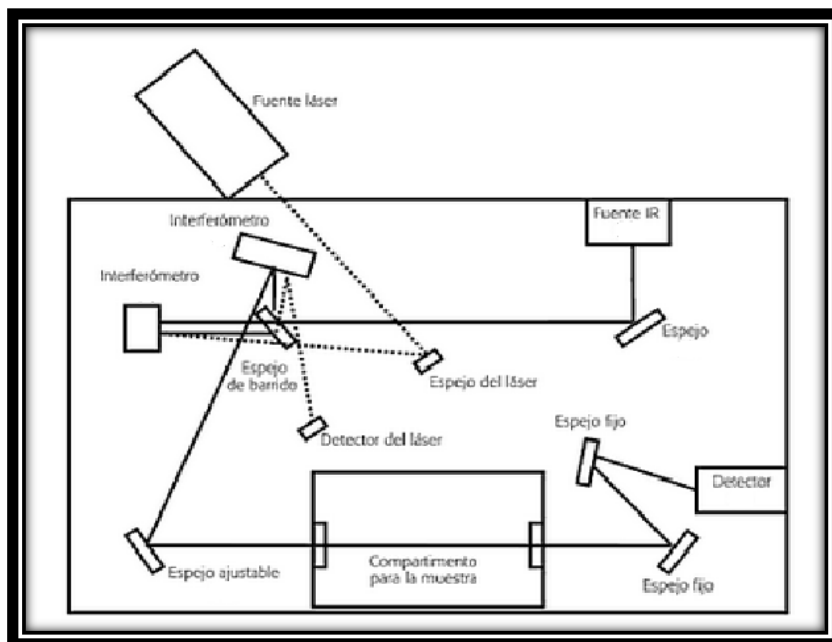


Figura 2.10. Esquema de un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR) [31]

2.7.6. DETERMINACIÓN DE LA SOLANINA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS CON TRANSFORMADAS DE FOURIER (FT-IR)

Luego de la extracción realizada mediante el método 3 en las partes del fruto: cáscara, pedúnculo y pulpa con semillas, se procede a la identificación de solanina por espectroscopia de infrarrojos FT-IR.

Las muestras resultantes del aislamiento fueron redisueltas en 5 mL de diclorometano. Se tomó con un gotero la muestra y se colocaron 2 gotas en el porta-muestra del equipo FT-IR Perkin Elmer modelo BTXII de la Figura 2.11 para su análisis.



Figura 2.11. Equipo FT-IR Perkin Elmer modelo BTXII

Los parámetros bajo los cuales se realizaron los análisis fueron los siguientes:

- Rango entre $4000.0-520.0 \text{ cm}^{-1}$
- Número de exploraciones: 10
- Resolución: 4.0 cm^{-1}
- Intervalos: 2.0 cm^{-1}
- Unidad: % transmitancia

2.7.7. OTRAS PRUEBAS

Para completar este trabajo de investigación se realizaron dos pruebas de identificación importantes para compuestos orgánicos, las cuales se describen a continuación:

2.7.7.1. DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN

La determinación de punto de fusión, se realizó en una placa caliente de Fischer, que consta de un termómetro que registra temperaturas hasta de 300 °C, un bloque de calefacción macizo sobre el que se deposita la muestra. La temperatura se regula por medio de un transformador variable y el punto de fusión puede observarse con ayuda de un foco de iluminación.

Para la lectura de la solanina, se colocaron los cristales de la muestra entre el porta y cubreobjetos y estos sobre la placa de calentamiento, se focalizó la muestra y se revisó que el termómetro se encuentre colocado correctamente. Luego se procedió a encender la placa y determinar el punto de fusión correspondiente.

2.7.7.2. ENSAYO CUALITATIVO

Para la identificación de estructuras esteroidales se realizó el ensayo de Liebermann-Burchard, el cual nos permitió reconocer la presencia de solanina mediante una prueba colorimétrica positiva cuando se evidencia un cambio de color que puede ser [32]:

- Rosado – rojo
- Azul verdoso
- Verde intenso
- Verde oscuro – negro

Para la preparación del reactivo se colocó 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo en un tubo de ensayo y se agregaron 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. En esta mezcla se colocaron 2 gotas de la muestra obtenida por el método 3 y se observó el cambio de coloración.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EXTRACCIÓN

Para el aislamiento de la solanina en el fruto de la berenjena no se encontró un método específico, por lo que las técnicas propuestas se ajustaron haciendo algunas modificaciones para poder obtener el compuesto deseado. Los métodos encontrados fueron para el aislamiento de solanina exclusivo en hojas de berenjena y en tubérculos de papa *Solanum tuberosum*.

La elección del solvente fue determinada en función de los datos aplicados en estudios previos realizados.

En el método 1 de extracción con solventes, no se realizaron modificaciones, de esta manera se mantuvieron las condiciones indicadas por Trease, G. y sus colaboradores. Como resultado, se observó en la base del recipiente un residuo sólido de color blanquecino amarillento que no correspondía a la solanina por las pruebas de identificación realizadas, sino posiblemente a una mezcla del compuesto con algún flavonoide por su coloración.

En el método 2 se realizó una extracción por micro-Soxhlet. Se empleó un equipo micro para realizar la extracción, manteniendo las condiciones propuestas Spoladore, D. y sus colaboradores en el artículo “*Extração e isolamento de α -Solanina de brotos de batata*”. De esta manera se disminuyó el tiempo de análisis y la cantidad de solvente utilizado.

Luego de la evaporación de la muestra, se observó la presencia de un residuo blanquecino en las paredes del balón. Sin embargo, al igual que en el método 1, las pruebas de identificación, no confirmaron la presencia de solanina.

En el método 3 de extracción por maceración, una de las modificaciones fue la implementación de un baño con ultrasonido por 30 minutos para garantizar una mejor superficie de contacto de la muestra con el solvente. En uno de los pasos de este método indicado por CaasiLit, M. y sus colaboradores en su artículo *“Mechanism of Resistance of Eggplant (Solanum melongena L.) to the Cotton Leaf hopper, Amrascabiguttula (Ishida) II. Morphological and Biochemical Factors Associated with Resistance”*, se emplea sulfato de sodio anhidro para la saturación de la solución, sin embargo al momento de la separación, dicho compuesto contaminaba el extracto por la ausencia de agua en la muestra, por lo que se decidió descartar este paso en función de que este reactivo solo sirve para eliminar la humedad.

Al finalizar la evaporación, se observó la presencia de una sustancia blanca en las paredes del balón, como se observa en la Figura 3.1. Las pruebas de identificación confirmaron que la sustancia obtenida fue solanina.

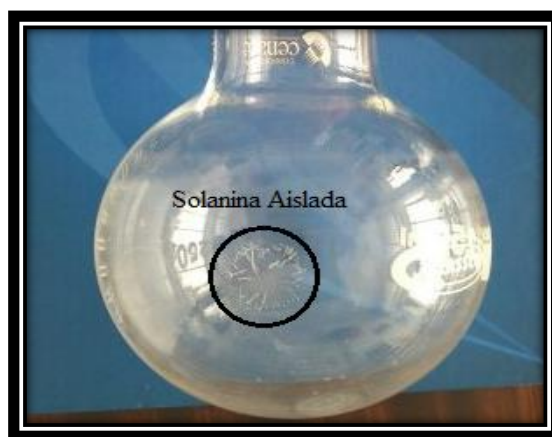


Figura 3.1. Aislamiento de la solanina por el método de extracción por maceración

Una vez culminadas las extracciones de solanina en el fruto de berenjena, se puede indicar que en el caso del método 1 de extracción con solventes y del método 2 de extracción por micro-Soxhlet no se obtuvieron resultados positivos. Esto se puede atribuir a que de acuerdo al uso del solvente, varía la solubilidad del glicoalcaloide, tal como se indica en la Tabla 3.1. Como se puede observar, el ácido acético al 5% extrae menor cantidad de solanina que el metanol, con una diferencia de 2.98 y 4.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto seco respectivamente en una matriz de papa *Solanum tuberosum*. En el método 1, donde se utilizó etanol que es un buen disolvente de la solanina, al estar en una mezcla con el ácido acético al 5%, disminuyó la efectividad de extracción. En el método 2, propone el uso de ácido acético al 2%, y sin embargo tampoco se evidenciaron mejores resultados. En el método 3 en cambio, se empleó metanol, los resultados demostraron que el proceso de extracción fue satisfactorio.

Tabla 3.1. Concentración de solanina en extractos obtenidos por diferentes disolventes [33]

Extractos obtenidos por 1 g de cáscara seca de papa en 40 mL durante 48 h	Solanina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ extracto seco)
Tetrahidrofurano	0.263
Metanol	4.290
Acetato de etilo	0.137
Cloroformo	0.144
Acetonitrilo	0.138
Acetona	0.173
Isopropanol	1.005
Etanol	4.063

Diclorometano	0.855
Agua	0.693
Ácido acético al 5%	2.98

El rendimiento de la solanina obtenido siguiendo el método 3 fue de 0.53 mg/g de acuerdo a los siguientes resultados indicados en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Contenido de solanina extraído de la cáscara seca de berenjena

Extracción	Contenido de solanina (mg/g)
1	0.70
2	0.40
3	0.50
Promedio	0.53
Desviación estándar	0.15

Como se puede observar, la presencia de solanina en el fruto de berenjena no es significativa, resultado que concuerda con el estudio realizado por Zhou, B, *et al.* (2009) [34], donde se determinó por HPLC (High performance liquid chromatography, por sus siglas en inglés) un contenido de solanina de 0.62 mg/g en muestra seca.

3.2. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO

Luego de realizar el aislamiento de la solanina en el fruto homogenizado y en cada una de las partes del fruto, se procedió a su identificación mediante las técnicas de cromatografía de capa fina y espectroscopía de infrarrojos.

3.2.1. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Con esta técnica usando las cromatoplasmas de silicagel, se pudo calcular el factor de retención (Rf) únicamente de la muestra obtenida del método 3. Los métodos 1 y 2 no mostraron ningún resultado, a pesar de ser analizadas bajo las mismas condiciones.

En la Tabla 3.1 se pueden observar los resultados del análisis cromatográfico con los diferentes métodos. El valor promedio de Rf obtenido del resultado del método 3, muestra un factor de retención de 0.12, una desviación estándar de 0.02.

Tabla 3.3. Resultados de identificación de solanina por cromatografía de capa fina

	Rf Estándar	Rf Muestra
Método 1	0.12	--
Método 2	0.11	--
Método 3	0.12	0.13 0.09 0.12 0.11 0.13
Promedio	0.12	0.12
Desviación estándar	0.01	0.02

En la Figura 3.2, se observan las cromatoplasmas empleadas en la cromatografía de capa fina con las muestras obtenidas de cada método.

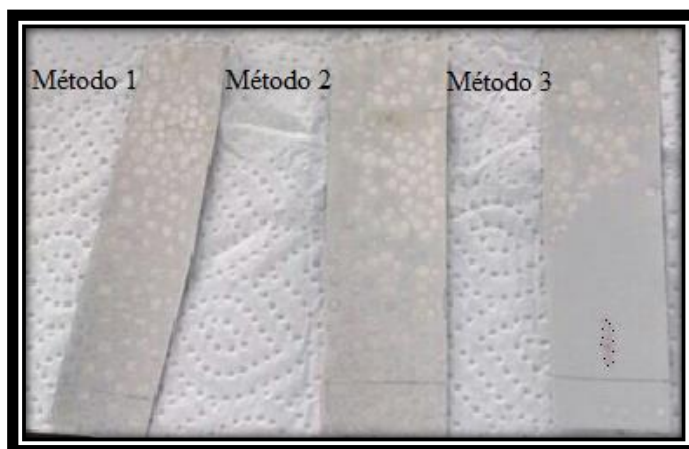


Figura 3.2. Cromatoplasmas de los métodos de extracción 1, 2 y 3

Una vez que se realizó la identificación de la solanina por cromatografía de capa fina se determinó que el método 3 es el adecuado para el aislamiento de la misma, por lo que se descartaron los métodos 1 y 2.

3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS

El análisis de identificación por espectroscopia de infrarrojos se efectuó en las partes del fruto de berenjena tratadas de acuerdo al protocolo 2.6 y 2.7.6. Se realizó la comparación espectral del estándar de solanina de la Figura 3.3, el espectro IR computacional de la Figura 3.5 y los espectros IR experimentales de solanina en la cáscara, pedúnculo y pulpa con semillas del fruto de la berenjena.

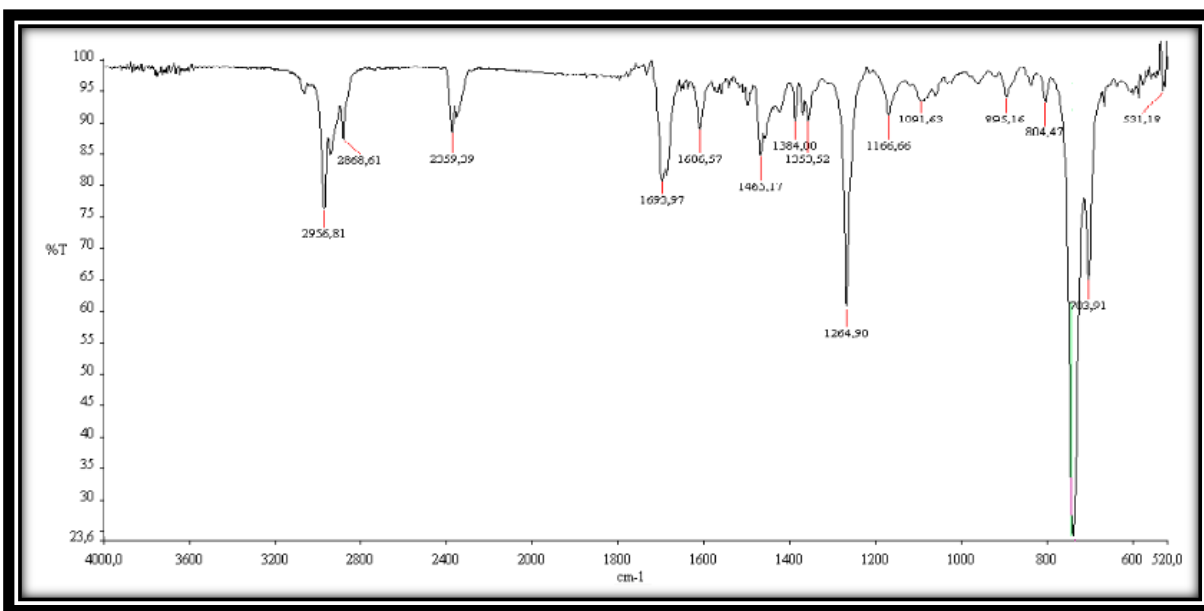
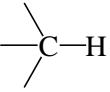
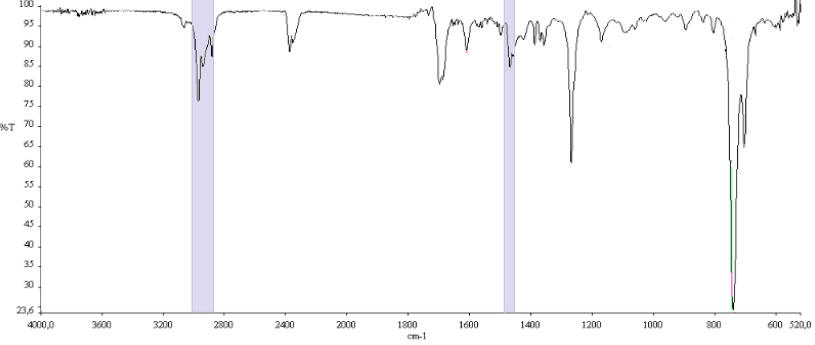
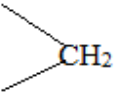
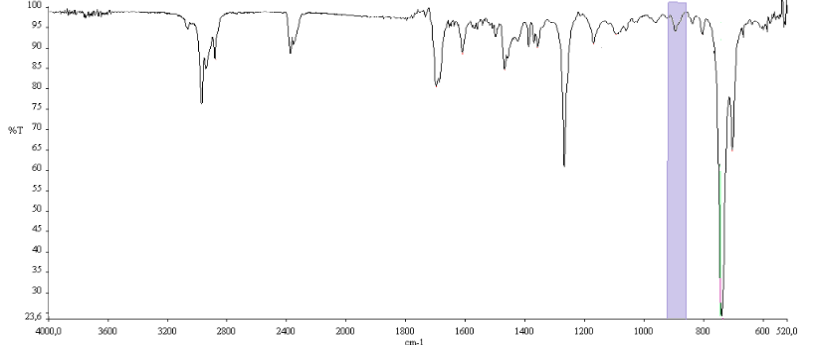

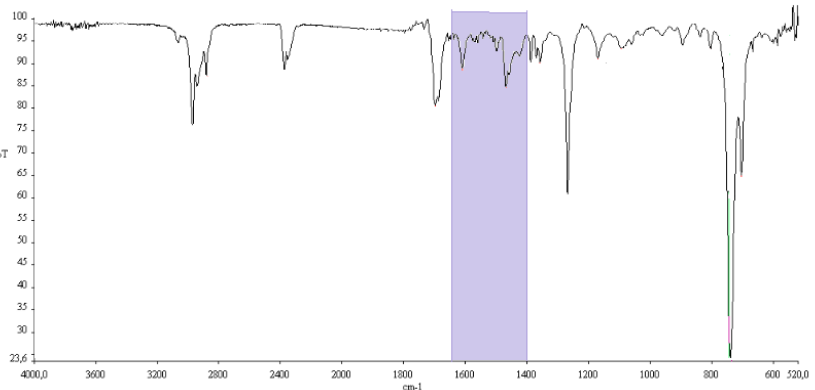


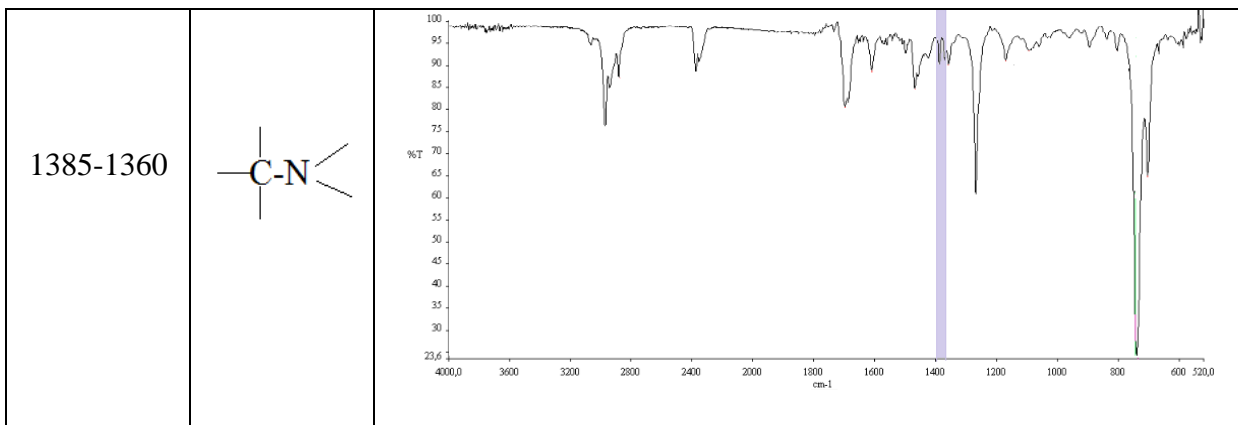
Figura 3.3. Espectro IR del estándar de solanina pura 99% Sigma Aldrich

En la Tabla 3.1, se puede observar el espectro IR del estándar de solanina, donde se identifican los grupos funcionales y el tipo de vibraciones en los siguientes rangos:

- Vibración de tensión del C-H en el rango de $3056 - 2850 \text{ cm}^{-1}$
- Vibración de flexión del C-H en el rango de $1390 - 1350 \text{ cm}^{-1}$
- Vibración de flexión del $-\text{CH}_2$ en el rango de $900 - 880 \text{ cm}^{-1}$
- Vibración de flexión del CH_3 en el rango de $1650 - 1400 \text{ cm}^{-1}$
- Vibración de tensión del $-\text{CH}_2\text{-N}$ en el rango de $1385 - 1360 \text{ cm}^{-1}$

Tabla 3.4. Identificación de grupos funcionales en el espectro infrarrojo

Intervalo de número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Espectro IR
<p>3065-2850</p> <p>1390-1350</p>		
<p>900-880</p>		
<p>1650-1400</p>		



El solvente empleado para la lectura de las muestras y del estándar fue diclorometano. Para eliminar el efecto del disolvente presente en las muestras, se obtuvo el espectro IR del solvente puro, como se muestra en la Figura 3.4. Se pueden apreciar las bandas típicas del diclorometano. A 1265 cm^{-1} pertenece la vibración de flexión del H-C-H y las situadas en el rango de $700\text{ a }748\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la vibración de tensión del C-Cl.

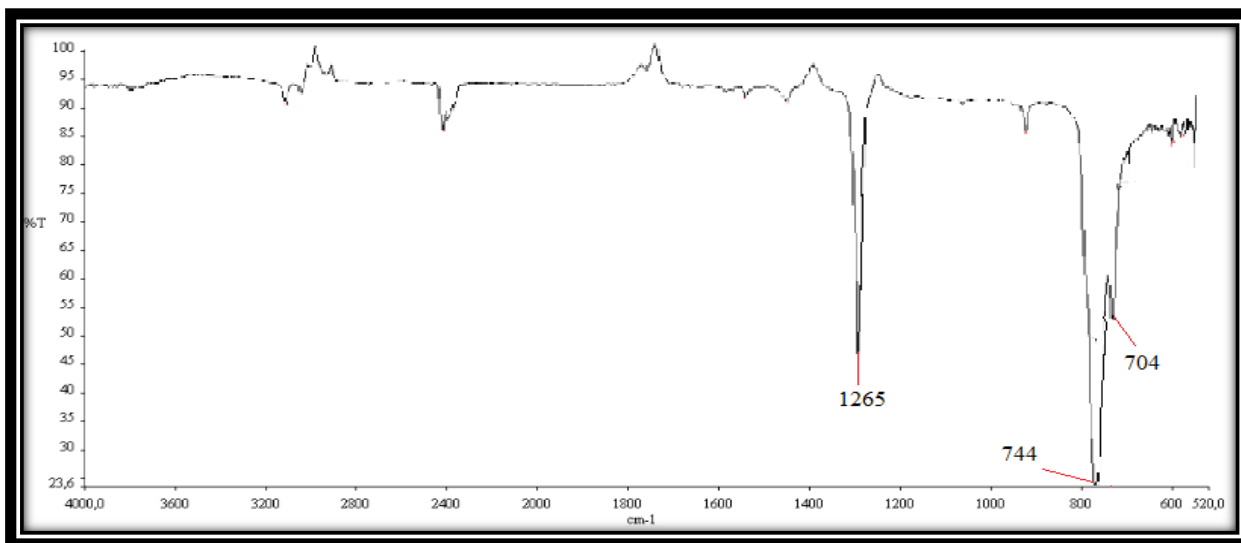


Figura 3.4. Espectro IR del diclorometano

Para la comparación espectral se tomó como referencia los resultados presentados por Glossman, D. (2007) [35], en cuyo estudio se obtuvo el espectro IR de la solanina usando el programa *Swizard* con el modelo CHIH-DFT (Density functional theory for heterocyclic systems, por sus siglas en inglés). El espectro computacional de solanina se aprecia en la Figura 3.5, el mismo, facilita la identificación de las bandas en el espectro del estándar y en los experimentales. El espectro computacional se obtiene en fase gaseosa, sin influencia de parámetros externos y por lo tanto, existe variación con el experimental.

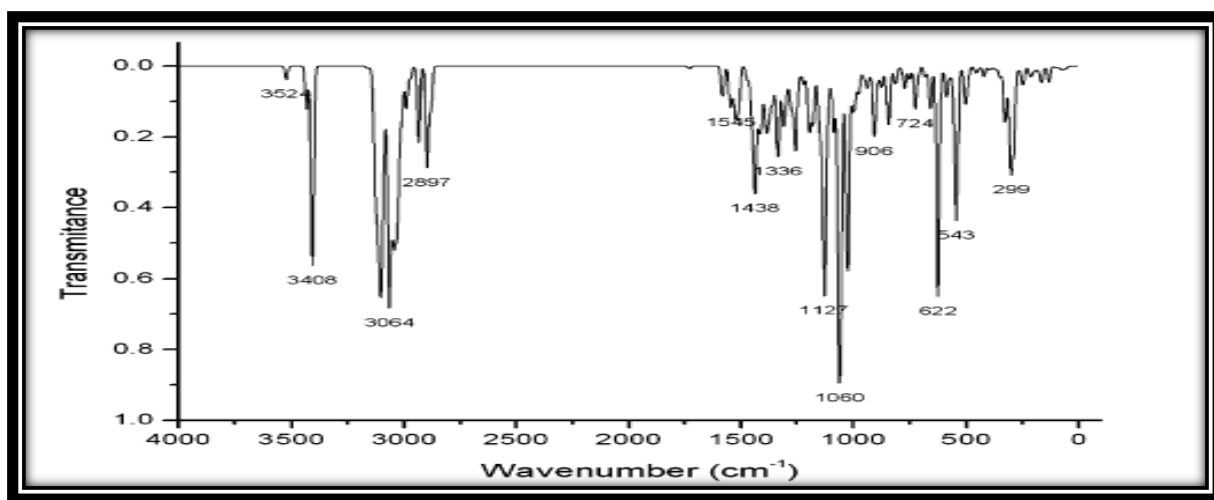


Figura 3.5. Espectro IR computacional de la molécula de solanina [35]

Una vez obtenidos los espectros IR experimentales de las tres partes del fruto de berenjena, se realizó un análisis comparativo con los espectro IR del estándar y computacional de solanina.

En la Figura 3.7 se observa la comparación con el espectro IR obtenido de la extracción del pedúnculo, donde se pueden apreciar las bandas similares a la del estándar a 2970 cm^{-1} que está dentro del rango del grupo funcional C-H y la de 1365 cm^{-1} correspondiente al enlace

-CH₂-N. Sin embargo, se observa una banda a 1736 cm⁻¹ perteneciente a un grupo carbonilo el mismo que no pertenece al espectro del estándar de solanina ni al espectro computacional. Por la ubicación de dicha banda y la coloración del compuesto se pensaría que se trata de un flavonoide. La rutina es un flavonoide presente en el fruto de la berenjena [36], en la Figura 3.6 se muestra el espectro computacional del mismo.

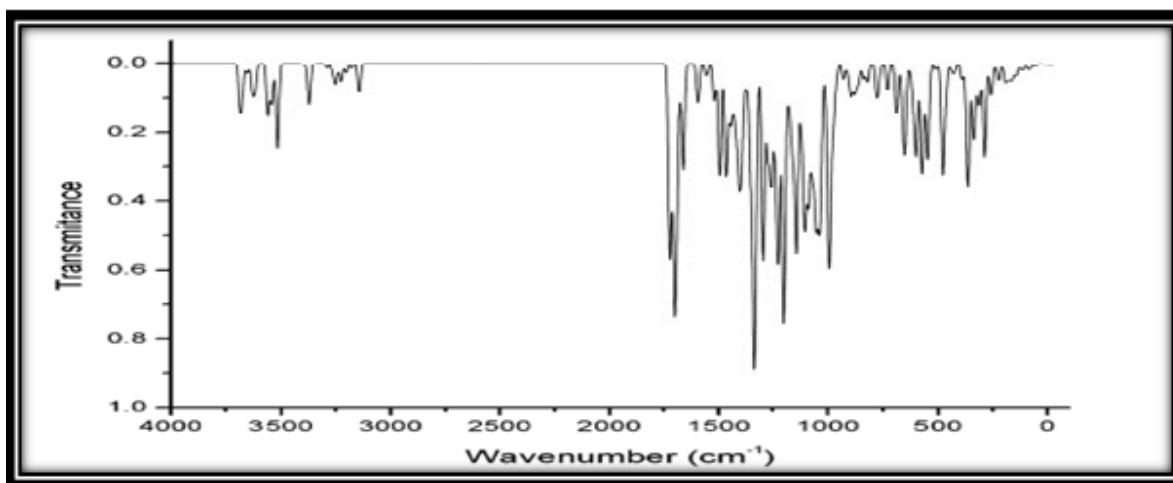


Figura 3.6. Espectro IR computacional de la molécula de flavonoide rutina usando el modelo M05-2X/3-21G [37]

La correlación del espectro del pedúnculo con el del estándar es de 0.4589. Por lo que no se pudo identificar solanina en el pedúnculo del fruto de la berenjena.

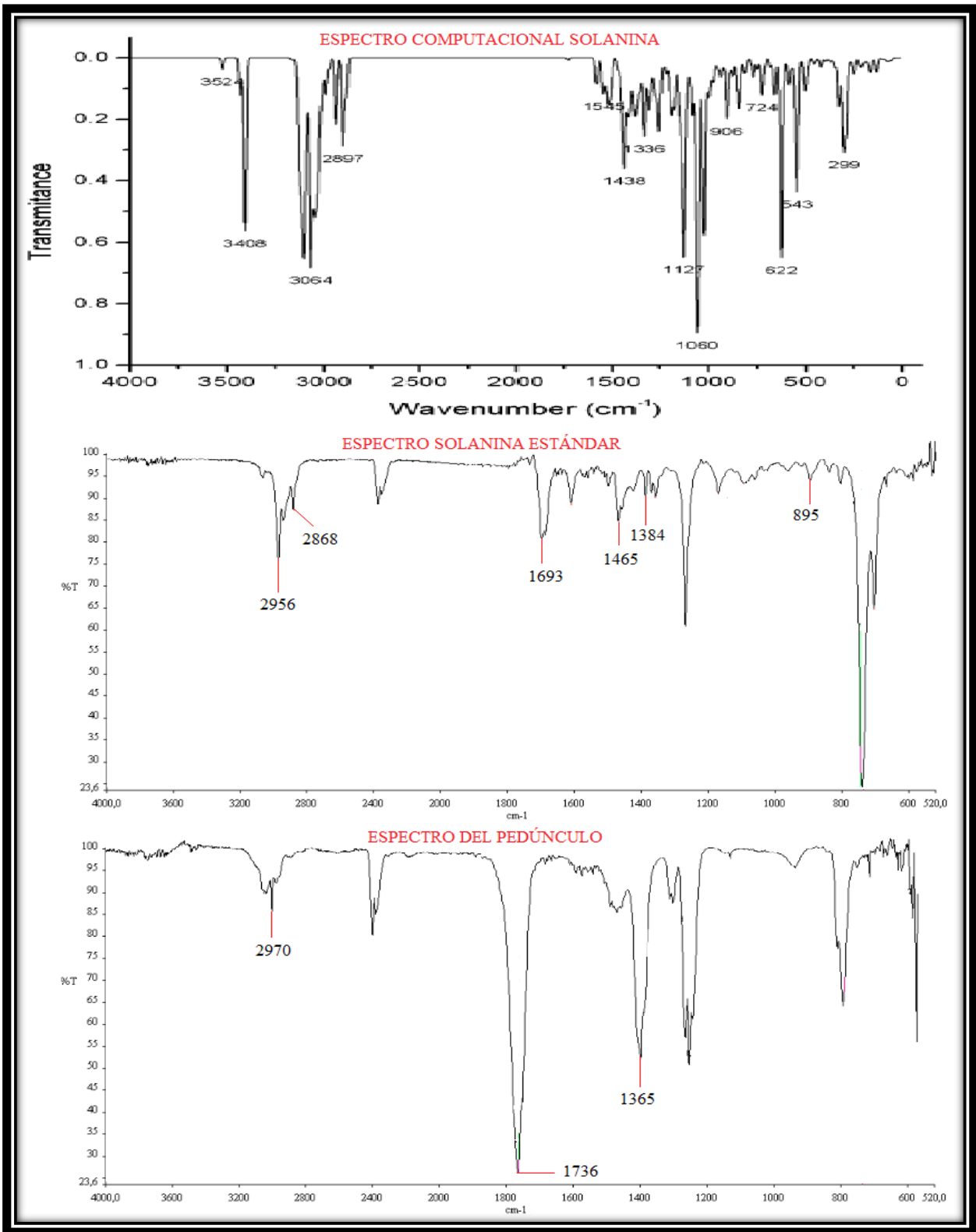


Figura 3.7. Comparación de los espectros IR del computacional y estándar, con el espectro de la muestra extraída del pedúnculo de berenjena

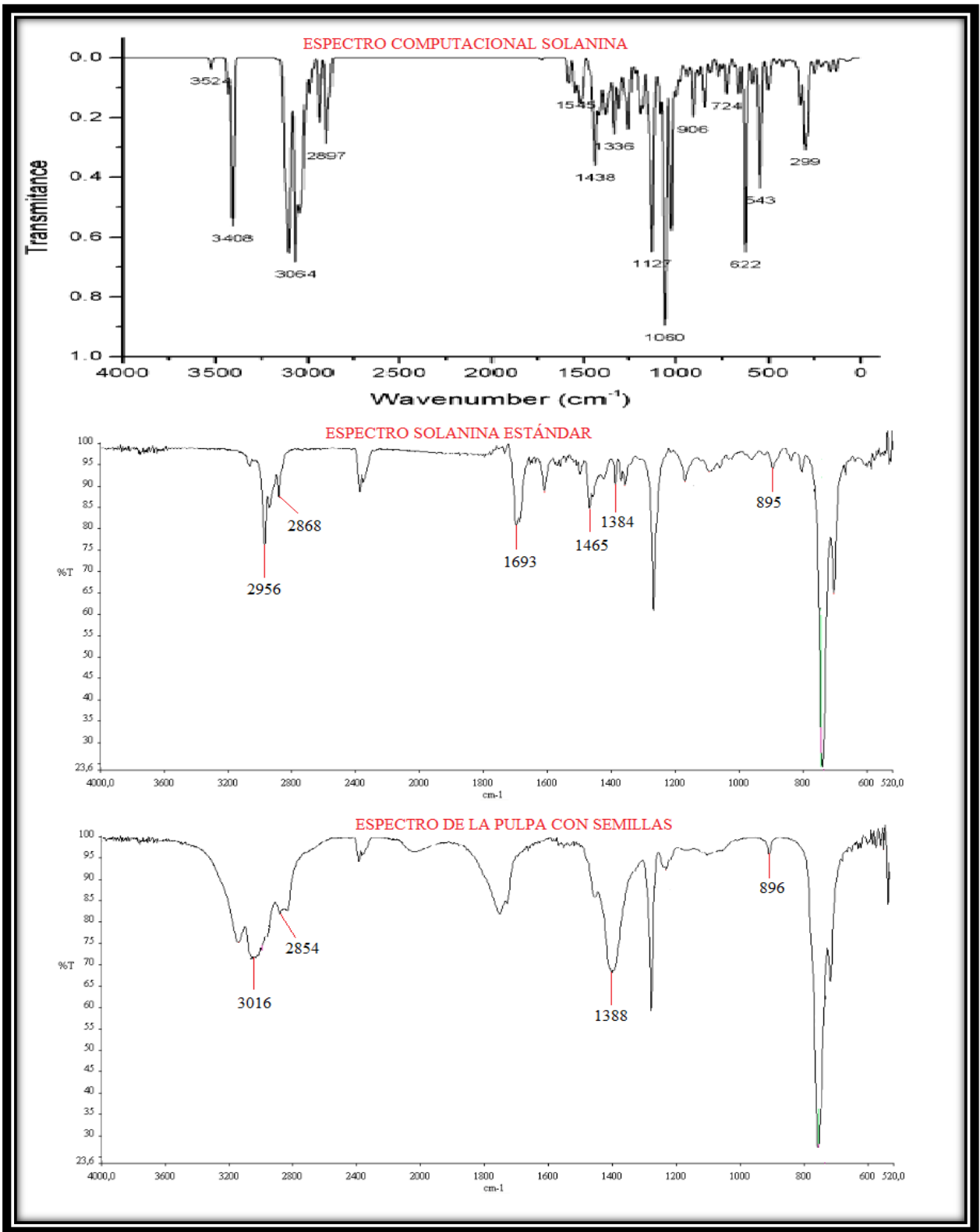


Figura 3.8. Comparación de los espectros IR del computacional y estándar, con el espectro de la muestra extraída de la pulpa con semillas de berenjena

En la Figura 3.8 se observa el espectro del extracto de la pulpa con semillas donde se presentan las bandas a 3016 y 2854 cm^{-1} pertenecientes al enlace C-H, a 896 cm^{-1} del CH_2 y en 1388 cm^{-1} del grupo $-\text{CH}_2\text{-N}$. Estas bandas concuerdan con las del espectro del estándar y del computacional. Sin embargo, no se puede afirmar la presencia de solanina, ya que su espectro no tiene la resolución adecuada para la identificación del mismo y su correlación con el estándar es de 0.6461.

Con el compuesto obtenido del pedúnculo y de la pulpa con semillas, se realizó una redisolución en metanol caliente para eliminar impurezas, sin embargo los espectros mostraron valores de correlación menores a 0.9, por lo que no se identifica la presencia de solanina.

En el análisis comparativo, que se realizó del espectro IR de la cáscara de la Figura 3.9, se puede observar la concordancia de la mayoría de bandas que existe con el espectro IR del estándar y el espectro IR computacional, ya que se aprecian a 2955, 2868 y 1465 cm^{-1} las vibraciones correspondientes al enlace C-H. A 895 cm^{-1} se visualiza la banda correspondiente a $-\text{CH}_2$, a 1696 cm^{-1} del CH_3 y en 1383 cm^{-1} se evidencia la vibración más importante del enlace $-\text{CH}_2\text{-N}$ de la estructura de la solanina como alcaloide. Además el valor obtenido de correlación es de 0.9157, con lo que se puede identificar la presencia de solanina en la muestra de cáscara de berenjena.

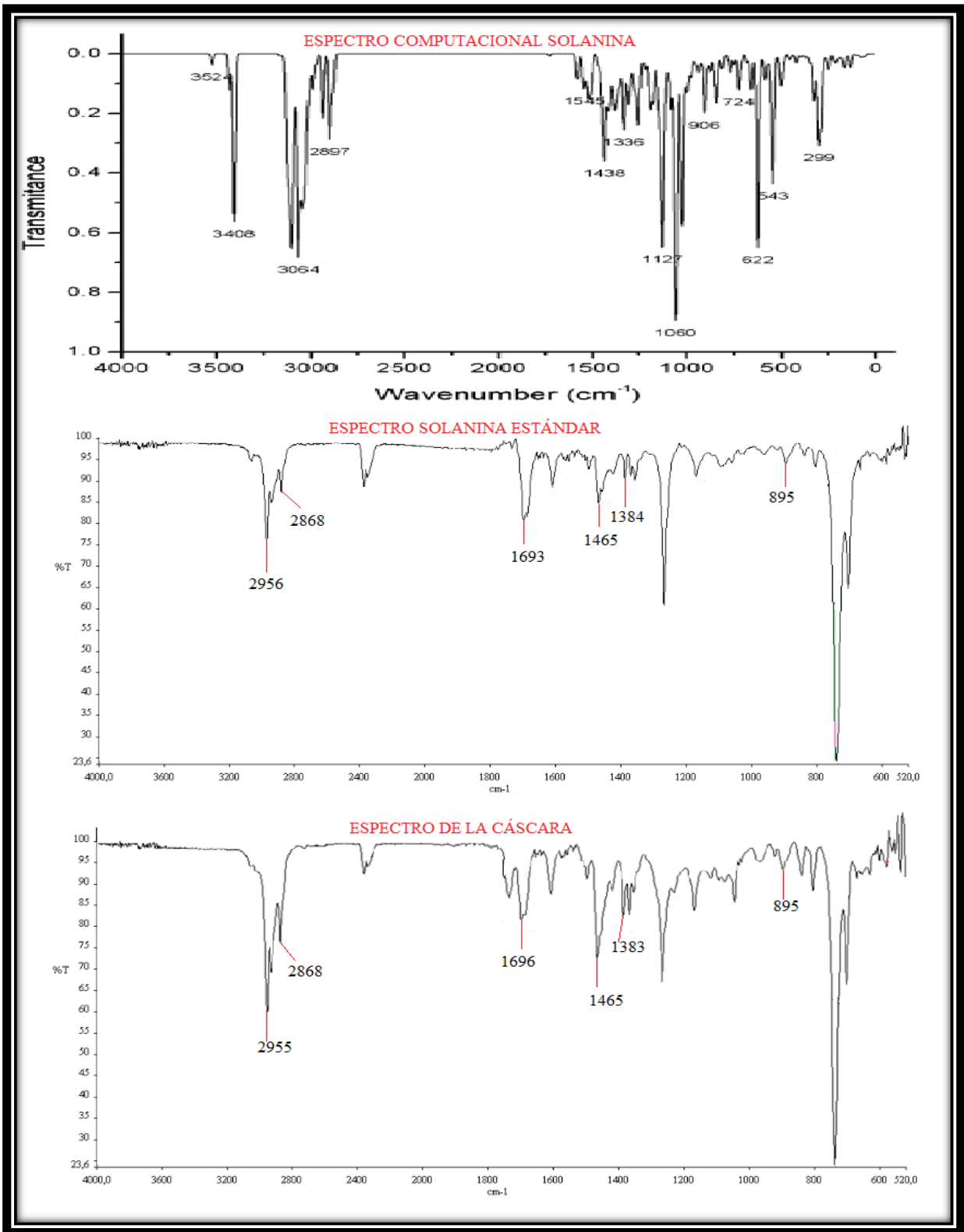


Figura 3.9. Comparación de los espectros IR del computacional y estándar, con el espectro de la muestra extraída de la cáscara de berenjena

3.2.3. OTROS PRUEBAS

3.2.3.1. DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN

Se realizó la determinación del punto de fusión en tres muestras obtenidas de la extracción de cáscara de la berenjena y del estándar, en la Tabla 3.3 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 3.5. Resultados obtenidos del punto de fusión

Muestra	Punto de fusión °C	Punto de fusión °C (estándar)
1	282	285
2	284	
3	282	
Promedio	283	
Desviación estándar	0.94	
% Error	0.70	

Como se puede observar el valor promedio de punto de fusión obtenido de la muestra del extracto de cáscara es de 283 °C con una desviación estándar de 0.94. Al relacionar con el punto de fusión del estándar se tiene un de error de 0.70 %.

3.2.3.2. ENSAYO CUALITATIVO

En la prueba cualitativa que se realizó con por medio del ensayo de Libermann-Burchard, se observó una coloración café oscuro rojizo, lo que nos permitió reconocer la presencia de un esteroide en el extracto del método 3.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Se probaron tres métodos de aislamiento de solanina a partir del fruto homogeneizado de berenjena: extracción con ácido acético al 5% y etanol; extracción con ácido acético al 2% y micro-Soxhlet con metanol al 80% y extracción por maceración con metanol, concluyendo que el método idóneo es el de extracción por maceración.
- Se aplicó el método que se basa en la extracción por maceración para determinar la presencia de solanina en las tres partes del fruto de berenjena: cáscara, pedúnculo y pulpa con semillas.
- Se empleó la técnica de cromatografía de capa fina para comparar los tres métodos de extracción, permitiendo conocer la presencia de solanina en el fruto de la berenjena con un factor de retención (Rf) de 0.12 con una desviación estándar de 0.02.
- Se realizó la caracterización de la solanina obtenida por espectroscopía de infrarrojos con transformadas de Fourier, donde se confirmó la presencia de solanina en el extracto de la cáscara por la presencia de las bandas a 2955, 2868, 1696, 1465 y 895, cm^{-1}

respectivamente. En especial la de 1388 cm^{-1} perteneciente al grupo $-\text{CH}_2\text{-N}$, banda característica de los glicoalcaloides esteroidales.

- Por medio del valor de correlación obtenido en el espectro de la muestra de cáscara fue de 0.9157, se puede identificar que hay la presencia de solanina en el mismo; sin embargo no se puede afirmar que es solanina pura ya que el valor no es mayor a 0.98.
- Se confirmó que el compuesto obtenido fue el esperado, por medio de la determinación del punto de fusión de la solanina aislada que tiene un valor de $283\text{ }^\circ\text{C}$ con una desviación estándar de 0.94. Además, dando un resultado positivo en el ensayo de Libermann-Burchard.

4.2. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio que permita determinar la presencia del compuesto de solanina en otras partes de la planta de berenjena, como hojas, tallos y raíces.
- Se recomienda cuantificar la presencia de solanina en berenjena mediante HPLC (High performance liquid chromatography, por sus siglas en inglés) para verificar si efectivamente con los métodos propuestos 1 y 2 no se detecta la presencia del compuesto en el fruto.
- Estudiar la influencia que tiene el grado de maduración del fruto de berenjena con el contenido de solanina presente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chaparro, A. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de Mucorcircinelloides y evaluación de su actividad microbiana*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.

- [2] Butnaru, C., Vlase, L. y Lazăr, D. (2011). HPLC/MS analysis of solanine in *Physalis alkekengi* and *Solanum dulcamara*, *University of Medicine and Pharmacy*, 59, 2, pp 172-178.

- [3] Martín, I. (2011). *Determinación de glicoalcaloides: α -solanina y α -chaconina en patata mediante cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo*. Trabajo fin de maestría, Universidad de Almería, España.

- [4] Ingeniería agrícola y ganadera (IAGSA), <http://www.iagsa.com/berenjena.html>, 27 de enero de 2014.

- [5] ITIS Report, <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/>, 30 de enero de 2014.

- [6] Laura Carreira, http://lauracarreiravidal.blogspot.com/2009_11_01_archive.html, 27 de enero de 2014.

- [7] Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/BERENJENA.HTM, 19 de febrero de 2013.
- [8] Ministerio de Agricultura, (1976). *Cultivo de la berenjena*. Madrid.
- [9] Universidad de Puerto Rico, Estación Experimental Agrícola, (2006). *Conjunto tecnológico para la producción de Berenjena*. Río Piedras, Puerto Rico.
- [10] Berenjena longpurples, http://semicol.co/semillas/hortalizas/berenjena-long-purple-s/flypage_new.tpl.html, 07 de marzo de 2013.
- [11] Fundación española de la nutrición, (2011). *Berenjena*. España.
- [12] Propiedades de la berenjena, <http://www.botanical-online.com/berengenas.htm>, 07 de marzo de 2013.
- [13] De Lletor, J. (1833). *Repertorio médico extranjero, Química y Botánica*, 5to tomo, Imprenta Real, Madrid, España, pp 124.
- [14] Sigma - Aldrich, https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/COFA/S3/S3757/S3757-BULK_____SLBB4458V_.pdf, 11 de noviembre de 2013.

- [15] Ginzberg, I., Tokuhisa, J. and Veilleux, R. (2009). *Potato Steroidal Glycoalkaloids: Biosynthesis and Genetic Manipulation*, European Association for Potato Research, 52, pp 1-15.
- [16] Enciclopedia Británica, <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/15672/alkaloid>, 29 de enero de 2014.
- [17] WiseGeek, <http://www.wisegeek.com/what-is-solanine.htm>, 07 de noviembre de 2013.
- [18] Hodgman, C, (1957). *Handbook of Chemistry and Physics*. Thirty-ninth Editions. pp 1166 -1167.
- [19] Egg Barceloux, D.(2008). *Medical toxicology of natural substances: food, fung, medical herbs, plants and venomous animals*. Wiley, United States.
- [20] Ji, Y. y Gao, S.(2012). Antihepatocarcinoma Effect of Solanine and Its Mechanisms, *Chinese Herbal Medicines*, 4, 2, pp 126-135.
- [21] Wolf, M. y Duggar, B. (2012). Estimation of Solanine in the potato, *Food and Drugs*, 73, pp 342-343.
- [22] FoodInfo, <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp95.htm>, 03 de marzo de 2013.

- [23] Transferencia de materia, <http://fjarabo.webs.ull.es/Practics/Oba/ObaFiles/AMater.pdf>, 23 de marzo de 2014.
- [24] AOAC (2005). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 18^a edition, USA.
- [25] Lamarque, A. (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica*, 1era Edición, Encuentro Grupo Editorial, Córdoba, Argentina.
- [26] Trease, G. y Evans, W. (1988). *Alcaloides, Tratado de farmacognosia*, 12^{va} edición, Interamericana S.A., México, pp. 495-501.
- [27] Spoladore, D., Teixeira, M, y Feijão, J. (1983). Extração e isolamento de α -Solanina de brotos de batata. *Bragantia, Revista Científica do Instituto Agronômico Campinas*, 42, 5, pp 255-259.
- [28] CaasiLit, M, y Bernardo, E. N.(1990). Mechanism of Resistance of Eggplant (*Solanum melongena* Linn.) to the Cotton Leafhopper, *Amrascabiguttula* (Ishida) II. *Morphological and Biochemical Factors Associated with Resistance*. *Philippine Journal of Crop Science*, 15, 2, pp 79-84.
- [29] Reyes. J. (1983). *Análisis químico e instrumental moderno*, 1era edición, Editorial Reverté, S. A., España, pp 217-218, 323.

- [30] Friedman, M. (2004). Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds, *Journal of Chromatography A*, 1054, pp 143-155.
- [31] Skoog, D. y Leary, J. (2001). *Principios de análisis instrumental*. 5ta edición. Editorial McGrawHill., España, pp 299, 310-317.
- [32] Miranda, M. Cuellar, A. (2001). *Farmacognosia y Productos Naturales* Editorial Félix Varela, Cuba.
- [33] Teagasc Foof Research Centre, (2014). *Recovery of glycoalkaloids from potato peels and effect of storage conditions on the glycoalkaloid content of five Irish grown potato cultivars*. Ashtown, Ireland.
- [34] Zhou, B. Li, Z. Ding, Y. Liu, X and Ye, X. (2009). Extraction Method of α -Solanine in Eggplant Fruit, *Acta horticulturae sinica*, V36 (1), pp 141-146.
- [35] Glossman, D. (2007). "CHIH-DFT determination of the molecular structure and infrared and ultraviolet spectra of γ -solanine", *Spectrochimica Acta Part A*, 66, pp 208-211.
- [36] Han, Y. Li, Ch. Wang, L and Fu, L. (2002). Study on Rutin Content and Heterosis of 17 Eggplant Varieties (Strains). *Acta Agriculturae Universitatis Jilinensis*, 24 (6), pp 39-41.

- [37] Payán, S. Flores, N. Pérez, A. Piñon, M and Glossman, D. (2010). Computational molecular characterization of the flavonoid rutin. *Chemistry Central Journal*, 4 (12), pp 1-8.
- [38] Nikolić, N. Stanković, M and Cakić, M. (2003). Solid-Liquid Systems for the hydrolysis of glycoalkaloids from potato (*Solanum tuberosum L.*) tuber sprouts and solanidina isolation. *Hemjska industrija*, 57 (6), pp 288-292.
- [39] Giral, F. (1946). *Productos químicos y farmacéuticos*, 1^{er} edición, Atlante, S.A., México, D.F.
- [40] Velraj, G. Ramya, R and Nazni, P. (2011). Fourier Transform Infrared spectroscopic Study on Glycoalkaloid Concentration in Varieties of *Solanum tuberosum*. *Journal of Experimental Sciences*, 2 (2), pp 68-71.
- [41] Universidad de Antioquia, (2008). *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Medellín, Colombia.
- [42] Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia fitoquímica plantas medicinales*, 2^{da} edición, Acribia S.A., Chile.
- [43] Meena, A. y Kumar, P.(2011). Effectof tryptophan on growth and β -solamarine content in cultures of *Solanum dulcamara L*, *Journal of Pharmacy*, 4, 7, pp 2366-2367.

ANEXOS

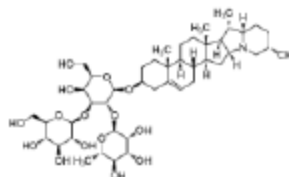
ANEXO I: Certificado de análisis de la Solanina

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@slal.com
 Outside USA: eurtechserv@slal.com

Certificate of Analysis

Product Name:
 α -Solanine - from potato sprouts, $\geq 95\%$

Product Number: S3757
 Lot Number: SLB84458V
 Brand: ALDRICH
 CAS Number: 20562-02-1
 MDL Number: MFCD00077873
 Formula: C₄₅H₇₃NO₁₅
 Formula Weight: 868.06 g/mol
 Storage Temperature: Store at -20 °C
 Quality Release Date: 04 JAN 2012



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50mg/mL, Pyridine		
% Water	≤ 6.5	4.2
Carbon (anhydrous)	58.8 - 65.7 %	62.1 %
Nitrogen (anhydrous)	1.2 - 2.0 %	1.6 %
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (TLC)	≥ 95 %	99 %

Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, PAMELA YEKATERINE VÉLEZ TERREROS, C.I. 060391909-3, autora del trabajo de graduación titulado: “Aislamiento y caracterización de solanina por Espectroscopía de Infrarrojos en berenjena (*Solanum melongena* L)”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

- 1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
- 2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 28 de abril de 2014.

Pamela Yekaterine Vélez Terreros

C.I. 060391909-3