

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS TERPENOS PRESENTES EN LA CORTEZA
DE LA ESPECIE “*Gustavia nana Pittier*”**

**AMALIA MOLINA CHAUX
ALICIA VARGAS MUÑOZ
CLARA PATRICIA MONTEALEGRE SASTRE**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN EDUCACIÓN BÁSICA CON ÉNFASIS EN CIENCIAS
NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
NEIVA - HUILA
2006**

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS TERPENOS PRESENTES EN LA CORTEZA
DE LA ESPECIE “*Gustavia nana Pittier*”**

**AMALIA MOLINA CHAUX
ALICIA VARGAS MUÑOZ
CLARA PATRICIA MONTEALEGRE SASTRE**

**Trabajo presentado como requisito parcial para obtener el título de
Licenciadas en educación básica con énfasis en Ciencias Naturales y
Educación Ambiental**

**Asesor
FRANCO ARTURO IBARRA NARVÁEZ
MG. En dirección y Planeación Universitaria**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN EDUCACIÓN BÁSICA CON ÉNFASIS EN CIENCIAS
NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
NEIVA - HUILA
2006**

Nota de Aceptación

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Neiva, 24 de noviembre de 2006

DEDICATORIA

A todos aquellos para los que el conocimiento no tiene fronteras, los interesados en documentarse sobre el tema de procesos fitoquímicos, a los que no se quedan con lo que reciben en clases sino que se esfuerzan por adquirir nuevos conocimientos y se abren espacios, a todos aquellos que hacen que su labor como futuros docentes sea más digna y gratificante.

A nuestros adorados padres y profesores por su constante apoyo y dedicación para que la realización de este proyecto fuera posible.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan sus más sinceros agradecimientos a:

Todos los profesores que contribuyeron para la realización de los distintos análisis planteados, permitiendo que se adquiriera conocimientos académicos y prácticos.

Y muy especialmente al doctor Rubén Darío Torrenegra; el aspirante a título de doctor, el profesor Oscar Rodríguez, a los profesores Franco Arturo Ibarra, Hilda Dueñas y Carlos Franco por su constante ayuda y orientación.

Al Vicerrector de Investigaciones, doctor Jairo Antonio Rodríguez R., al Decano de la facultad de Educación, profesor Luis Guillermo Moreno Echeverry, al decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, doctor José Miguel Cristancho Fierro, por su gestión para hacer posible este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. ANTECEDENTES	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVOS GENERALES	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. ASPECTOS TEÓRICO CONCEPTUALES	23
5.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA GUSTAVIA NANA PITTIER	23
5.1.1 Familia Lecythydaceae	23
5.1.2 Características de la Lecythydaceae	23
5.1.3 Especies de la Familia Lecythydaceae	24
5.2 Género Gustavia	29
5.2.1 Descripción Botánica	30
5.3 ASPECTOS DE LA FITOQUÍMICA	31
5.4 Metabolitos secundarios presentes en el extracto vegetal	31
5.4.1 ESTEROIDES	32
5.4.2 TERPENOS	32
5.4.2.1 La ruta biogenética	34
5.4.3 Terpenos en las plantas medicinales	35
5.4.3.1 Aplicaciones	36
5.5 Separación cualitativa de metabolitos secundarios contenidos en el extracto vegetal de la especie “Gustavia Nana Pittier“ por cromatografía en capa fina.	37
5.5.1 Técnicas de separación	38
5.5.2 Técnicas cromatográficas	43
5.5.3 Aplicación de la muestra	46
5.5.4 Inmersión de la placa	46
5.5.5 Reveladores	47
5.6 ESPECTRO DE MASAS	50
5.7 INVESTIGACIÓN Y APRENDIZAJE	50
5.8 LABORATORIO Y DOCENCIA	52
6. ENFOQUE METODOLÓGICO	55
7. METODOLOGÍA	57
7.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	57

7.2. ANÁLISIS DE LABORATORIO	57
7.3 MUESTRA	58
7.4 RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE	59
7.5 EXTRACCIÓN	60
7.6 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA	64
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	81
8.1 RESULTADOS DE LOS ESPECTROS DE GASES, MASAS Y SIMULACIÓN DE RESONANCIA MAGNÉTICA	81
8.1.1 ESPECTRO DE MASAS DE ALPHA AMYRIN	82
8.1.2 ESTRUCTURA Y FRAGMENTACIÓN DEL ALPHA AMYRIN	83
8.1.3 ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE C13 JMOD DE ALPHA AMYRIN	84
8.1.4 ESPECTRO DE RESONANCIA DE HIDRÓGENO DE ALPHA AMYRIN	85
8.2 ESPECTRO DE MASAS DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL	86
8.2.1 ESTRUCTURA Y FRAGMENTACIÓN DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL	87
8.2.2 ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE C13 JMOD DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL	88
8.2.3 ESPECTRO DE RESONANCIA DE HIDRÓGENO DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL	89
8.3 ESPECTRO DE MASAS DE UVAOL	90
8.3.1 ESTRUCTURA Y FRAGMENTACIÓN DE UVAOL	91
8.3.2 ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE C13 JMOD DE UVAOL	92
8.3.3 ESPECTRO DE RESONANCIA DE HIDRÓGENO DE UVAOL	93
Espectro de resonancia de hidrógeno de las tres sustancias encontradas en la <i>Gustavia nana Pittier</i>	94
8.4 Aplicaciones de las sustancias encontradas en la corteza de la <i>gustavia nana pittier</i>	94
8.4.1 Amyrin	94
8.4.2 Stigmasterol	95
9. COMPONENTE PEDAGÓGICO	97
9.1 CURSO FITOQUIMICA	97
9.1.1 Introducción	97
9.1.2. Actividades	98
9.1.3 Programa de capacitación en Fitoquímica	99
9.1.3.1 Objetivos	100
9.1.3.1.1 General	100
9.1.3.1.2 Específicos	100
9.1.3.2 Descripción del curso	101
9.2 ASPECTOS TEÓRICOS BÁSICOS	101
9.3 GUÍA PARA LABORATORIO DE FITOQUIMICA	104
9.3.1 SEMINARIO TALLER PARA ALUMNOS SELECCIONADOS DE ALGUNOS COLEGIOS DE NEIVA PARA EL ESTUDIO PRELIMINAR FITOQUÍMICO	104
9.3.2 Justificación	104
9.3.3 Objetivos	105
9.3.3.1 General	105

9.3.3.2 Específicos	105
9.4 ASPECTOS TEORICOS	105
9.5 METODOLOGIA	106
9.6 RESULTADOS DEL CURSO TALLER EN FITOQUÍMICA	108
9.7 RECURSOS	110
9.7.1 Humanos	110
9.7.2 Institucionales	111
<i>10. CONCLUSIONES</i>	<i>113</i>
<i>11. RECOMENDACIONES</i>	<i>115</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>116</i>
<i>ANEXOS</i>	<i>120</i>

LISTA DE TABLAS

Pág.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Categoría en Porcentajes de especies amenazadas	25
Figura 2. Isopreno	32
Figura 3. β -caroteno	33
Figura 4. Algunos principios olorosos	34
Figura 5. Dispositivo para la extracción soxhlet	42
Figura 6. Construcciones Capilares	46
Figura 7. Inmersión de placa	47
Figura 8. Revelado de placa cromatográfica	48
Figura 9. Diagrama de cromatografía de gases y de masas	49
Figura 10. Montaje para la extracción	60
Figura 11. Montaje para concentrar el extracto	61
Figura 12. Montaje para la filtración del extracto.	62
Figura 13. Cámara reveladora	62
Figura 14. Aparato con filtro u.v	62
Figura 15. Vista de la placa al U.V.	63
Figura 16. Revelado en la estufa	63
Figura 17. Placa cromatográfica revelada	63
Figura 18. Campana de vacío	64
Figura 19. Montaje de la columna cromatográfica	64
Figura 20. Inicio de la cromatografía en columna	65
Figura 21. Corrimiento de la columna	65

Figura 22. Toma de muestras en Columna	66
Figura 23. Cromatografía en columna vista al U.V.	66
Figura 24. Aparato colector de fracciones.	67
Figura 25. Fracciones en tubos de ensayo	67
Figura 26. Placa cromatográfica	68
Figura 27. Baño María	69
Figura 28. Cromatografía en columna de la fracción a	70
Figura 29. Cromatografía en columna de la fracción b	70
Figura 30. Fracciones del extracto.	71
Figura 31. Fracción 3a y 6a del extracto	71
Figura 32. Fracción 6a del extracto	71
Figura 33. Cromatografía en silica gel para unir fracciones iguales	72
Figura 34. Campana de vacío	73
Figura 35. Filtrado de la fracción c	73
Figuras 36 y 37. Siembra en la placa preparativa	74
Figura 38. Revelado de una parte de la placa preparativa	75
Figura 39. Raspado de la placa preparativa	75
Figuras 40, 41, 42 y 43. Resultados de las cromatografías en Silica gel de la placa preparativa	76
Figura 44. Prueba de salkoski	78
Figura 45. Fusiómetro	79
Figura 46. Grupo de trabajo.	80
Figura 47. β -Sitosterol.	96

LISTA DE ANEXOS

	pág
ANEXO A. Cronograma de actividades	120
ANEXO B. Mapa de la ubicación de <i>Gustavia nana Pittier</i> en Colombia.	121
ANEXO C. Parque Nacional los Katíos	122
ANEXO D. Especie del genero <i>Gustavia</i> que se encuentran en Colombia	123
ANEXO E. Diagrama de flujo del procedimiento	124
ANEXO F. Prueba Fitoquímica Preliminar	125
ANEXO G. Registro Fotográfico Capacitación en Fitoquímica	128
ANEXO H. Diploma curso-taller en fitoquímica	130

RESUMEN

Se realizó el análisis fitoquímico de la especie *Gustavia nana Pittier*, recolectada durante el 8 y 23 de abril de 2006, en el Centro de Investigaciones y Educación Ambiental “LA TRIBUNA” con una extensión de 127,100 Ha, ubicada a 26 Km de la ciudad de Neiva en la Vereda San Francisco.

La corteza (ritidoma) seca pesó (335 g) a la cual se le realizó la extracción en diclorometano, el extracto se concentró para realizar la cromatografía en columna en sílica gel, eluyendo con mezclas de diclorometano, aumentando polaridad con metanol, hasta elución con diclorometano solamente. El análisis por cromatografía en capa fina de dichas fracciones, permitió su reagrupamiento en fracciones, las que se recromatografiaron en columnas de sílica gel. De esta forma se aislaron 3 productos Amiryn, stigmasterol y uvaol, los cuales fueron identificados por datos espectroscópicos y con muestras patrón o datos de literatura.

Utilizando como estrategia didáctica un curso taller, se realizó la experiencia de articular la fitoquímica en el campo educativo con un grupo de estudiantes de básica secundaria, de la ciudad de Neiva, con el fin de incentivar el estudio por aspectos concernientes al desarrollo de las ciencias al interior del aula de clase, y también como una actividad de proyección social de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad Surcolombiana. Obteniendo como resultado de este reto la participación activa de los asistentes a esta capacitación y la manifestación de su agrado por el trabajo desarrollado en este campo del saber.

SUMMARY

The studied vegetal material corresponded to nana the *Gustavia* species to pittier collected during 8 and 23 of April of 2006, in center of Investigations and Environmental Education "the TRIBUNE", located in the Path San Francisco to 26 km of the city of Neiva, with 127.100 Has.

The stems (1206,2 grams) dry of the plant, were extracted with Dichloromethane and ethanol in cold, until exhaustion of color. The extracts once concentrated (stems: 335 grams) chromatografiaron in chromatographic silica gel column, dissolving with dichloromethane mixtures, increasing polarity with methanol, until dissolved with dicloromethane only. The analysis by CCF of these fractions, allowed their regrouping in fractions, those that were re-chromatographic in silica gel columns. Some final purifications were made in CCP. Of this form 3 Amiryln products, stigmatherol and uvaol were isolated, which was identified by spectroscopic datas and with authentic samples or data of Literature.

Using like didactic strategy a course factory, the realization the experience with a group of students of basic secondary, the city of Neiva, with the purpose of stimulating the study by indícate aspects with the development of sciences to the interior of the classroom and also like an activity of social projection of the Faculty of Exact and Natural Sciences, of the Surcolombiana University. Obtaining as resulting from this challenge the active participation of the assistants to this qualification and the manifestation of its affability by the work developed in this field of the knowledge.

INTRODUCCIÓN

La inexplorada fitoquímica de muchas plantas hace que se pierda la oportunidad de aprovechar especies potenciales, que pueden ser de gran utilidad para el hombre, teniendo en cuenta que la zona de reserva natural La Tribuna contiene dentro de sus innumerables especies vegetales una vulnerable, la *Gustavia nana pittier* la cual se encuentra distribuida a pequeña escala sobre la región del pacífico, en los departamentos del Chocó y el Amazonas, que por factores ambientales ha sido introducida dentro de un ecosistema donde se alberga vegetación característica de bosque húmedo tropical y teniendo en cuenta que esta especie vegetal hasta el momento no presenta ningún estudio que permita evidenciar sus posibles utilidades o los beneficios que puede brindar a nivel medicinal o industrial.

La génesis se dio con el Seminario de Investigación, en donde se desarrolló “El Análisis Preliminar Fitoquímico de la *Gustavia nana Pittier*”, que le abrió las puertas al Grupo de Estudio para incursionar en el campo de la investigación y, particularmente, en el de la fitoquímica y despertó el interés por la indagación en el campo del saber de las Ciencias Básicas. La etapa siguiente se enrumbó a profundizar en esta temática, y es sobre ello que se presenta esta tesis.

Hubo necesidad de enfrentar algunos retos que la cotidianidad planteó: el primero estuvo relacionado con las limitaciones tecnológicas para la extracción de los componentes objeto del trabajo y el segundo referido a la articulación de un conocimiento aparentemente desconocido a la realidad institucional de los establecimientos de Educación Media y Básica del departamento del Huila.

La cooperación ínter universitaria le permitió al grupo sortear el primero de los retos, la Universidad Javeriana y, concretamente el Departamento de Química, ofreció su colaboración con el préstamo de sus laboratorios de Fitoquímica y, algo muy importante, con la asesoría del Grupo de Investigación en fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ), en esta área, liderado por el doctor Rubén Darío Torrenegra; además la Universidad Tecnológica de Pereira participó en el análisis cromatográfico de las muestras.

Obtenidos los resultados y mejoradas las técnicas inherentes a este saber, se procedió a socializarlas con un grupo de estudiantes de instituciones educativas de Neiva, provenientes de las diferentes comunas de la ciudad. Fue una experiencia gratificante en la medida en que se validó el conocimiento, se interesó a un grupo de jóvenes por el estudio de esta disciplina y, fundamentalmente, se vinculó a directivos y docentes en un proyecto de investigación a largo plazo asociado al desarrollo curricular en el área de Ciencias.

Particular comentario merece el hecho de que la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales acogió el proyecto como suyo y, a partir de él, trazó un programa en Convenio con la Universidad Javeriana que incluye el ofrecimiento de cursos en Fitoquímica conducentes a diplomado, en una primera fase, y posteriormente a la titulación como especialistas en esta área. Esta nueva realidad le posibilitará a la región el impulso en un campo en donde, como se mostrará en el texto de este trabajo, existe un potencial inmenso en el área del desarrollo industrial y farmacológico.

El trabajo que se presenta incluye la parte referente a los antecedentes que dieron pie a la realización del tema escogido. El componente teórico conceptual está presentado de manera didáctica, de tal manera que el lector pueda entender el significado de los hallazgos, igualmente se incluyen las técnicas empleadas con una descripción breve del soporte tecnológico.

La metodología se presenta secuencialmente, desde el momento en que se recogen las muestras, pasando por el trabajo de laboratorio, hasta la interpretación de los resultados obtenidos. Se incluye, además, la utilidad, entendida como la potencialidad del empleo de las sustancias extraídas, lo cual conduce a mirar a futuro la importancia que tiene esta área en el desarrollo de los pueblos, en el mejoramiento de la calidad de vida de sus habitantes y en el desarrollo sostenido de su región.

Finalmente, se incluyen conclusiones y recomendaciones, pues se considera que este trabajo es el comienzo de una labor permanente asociada a los procesos académicos de la Universidad.

El componente bibliográfico es el resultado de la indagación en diferentes fuentes e instituciones; por ser un tema poco tratado en el entorno, recabar información actualizada y pertinente no fue tarea fácil. La Universidad Nacional de Colombia prestó su servicio en esta parte y diferentes páginas de la Internet citadas en la bibliografía.

1. ANTECEDENTES

En el año 2004, en la realización del Inventario Florístico de la Tribuna, trabajo realizado como actividad extracurricular con el Grupo de Investigación del programa de Ciencias Naturales, de la facultad de educación de la Universidad Surcolombiana, se identificaron ciento cincuenta especies de plantas con flores*; de ellas al grupo le interesó, la especie *Gustavia nana pittier*, debido inicialmente a su aspecto llamativo, de flores blancas vistosas, el fruto grande y carnoso, y, además, luego de una revisión bibliográfica se llegó a la conclusión que a la especie se le ha realizado estudio botánico pero no fitoquímico. Al indagar a la comunidad de los alrededores del centro de investigación, se encontró que desconocen esta especie, por lo tanto no se reportó ningún uso.

Los pasos siguientes estuvieron orientados a la revisión bibliográfica que posibilitase contar con un acervo teórico que diera mayor profundidad al conocimiento de esta especie. Los resultados arrojaron que en Colombia esta especie fue reportada, por primera vez, en el Chocó y en el Amazonas, y también permitió corroborar que en el Huila no se había reportado a la fecha. En la Universidad Nacional se halló una Tesis de Grado basada en el estudio bromatológico de una especie perteneciente a la familia de las Lecythidaceas: Estudio Bromatológico de la Especie *Gustavia superba* (H.B.K.) Berg¹. Este estudio muestra, además, que la especie en su fruto contiene grandes cantidades lipídicas.

El trabajo de tesis mencionado le sirvió al grupo como guía para determinar los usos y características que orientaran la búsqueda posterior de componentes de la planta.

En el desarrollo curricular de la asignatura Seminario de Investigación, se realizó el análisis fitoquímico preliminar de la especie *Gustavia nana Pittier*, estudio que se presentó como primera etapa para la tesis de grado objeto de este informe.

Este análisis permitió:

* Rincón, L. Obando, S. Inventario Florístico Preliminar de la Reserva La Tribuna, Municipio de Neiva, Huila. Universidad Surcolombiana, Neiva. Huila, 2004. 39 p.

¹ Guerrero, R. Jorge H. Estudio Preliminar de la Especie *Gustavia superba* (H.B.K.) Berg. Análisis de su extracto lípido, trabajo de grado (Químico) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, departamento de Química. Bogotá 1983

- Identificar resultados que corresponden a nuevo conocimiento científico, proyectado hacia una aplicación en el campo de la investigación, la medicina y la industria.

- La aplicación y verificación de la determinación de la probable actividad biológica mediante el análisis microbiológico que permitió evidenciar que hay mínima inhibición para microbiota específica de la cepa de estreptococos frente al extracto de la *Gustavia nana Pittier*.

- La morfología encontrada en la lectura de las placas mostró que predominaban los cocos y diplococos Gram. Positivos, hongos, levaduras, bacilos grandes y cocos en cadena. Permitiendo evidenciar que el microorganismo presenta leve sensibilidad al extracto de la *Gustavia nana Pittier* y que a mayor concentración del extracto vegetal hay más inhibición del microorganismo.

- El análisis fitoquímico preliminar y perfil cromatográfico del extracto etanólico de hojas y corteza de la *Gustavia nana Pittier*, permitió detectar la presencia de flavonoides, esteroides, clorofila, terpenos y triterpenos en alta proporción especialmente en la corteza.

- La prueba para alcaloides dio negativa, lo cual evidencia que el extracto de la planta no contiene este tipo de sustancias y/o compuestos.

El estudio, recomendó, continuar con esta exploración, y de ello hace parte el tema escogido para la tesis que se orientó a la profundización en la identificación de los terpenos presentes en la corteza de la especie en mención.

2. JUSTIFICACIÓN

La *Gustavia nana pittier* es un especie encontrada en el centro de investigación “La Tribuna”, finca que cuenta actualmente con 150 hectáreas pertenecientes a HOCOL(Empresa Colombo-Americana para la explotación de hidrocarburos) en convenio con la Universidad Surcolombiana. Después de múltiples visitas y recorridos de toda la zona se descubrió que alberga diversos microclimas con vegetación característica de bosque húmedo y seco tropical, encontrándose esta especie en el bosque húmedo tropical.

La especie fue colectada por primera vez en el departamento del Huila, a finales del año 2004, por el grupo de investigación en flora dirigido por la profesora de la Universidad Surcolombiana Leyla Marleny Rincón y la especialista en botánica de la Universidad Nacional Sandra Obando, con el apoyo de las estudiantes Amalia Molina Cháux y Clara P. Montealegre como auxiliares de investigación, se llevo a cabo el Inventario Florístico de la Reserva Ambiental “La Tribuna”. Este estudio permitió afirmar que es la única especie perteneciente a la familia de las Lecythidaceas que hay en este lugar. Además, cuando se encontró esta especie llamaron la atención aspectos como: su fruto, que es de agradable sabor y su flor, muy vistosa. Posteriormente, se encontró en el Libro Rojo del instituto Humbolt, que en Colombia la *Gustavia nana ssp. rhodantha* (Standley) S. A. Mori está en la categoría vulnerable (VU) y la *Gustavia nana ssp. nana Pittier* está bajo la categoría de preocupación menor (LC).

Considerando que a la especie se le ha realizado estudio botánico pero no fitoquímico, este hecho se considera razón suficiente para realizar un estudio más profundo de la temática en cuestión, por ello después de hacer la revisión bibliografica pertinente, tanto en la Internet como en las bibliotecas de las Universidades Surcolombiana, Nacional y Javeriana. Se encontró que hasta el momento sólo se ha realizado el estudio bromatológico a la especie *Gustavia superva*, perteneciente a la familia de las Lecythidaceas, en la Universidad Nacional presentada como tesis de grado con unos resultados interesantes para el campo de la investigación. Con base en esta información se puede afirmar que la *Gustavia nana Pittier* no ha sido estudiada, pues hasta la fecha no se encontraba literatura sobre ella.

Partiendo de lo anterior se planteó la monografía como primera etapa para la tesis de grado, basada en un análisis preliminar fitoquímico y el perfil cromatográfico del extracto etanólico de hojas y corteza de la *Gustavia nana Pittier*. La monografía

permitió detectar la presencia de flavonoides, esteroides, clorofila y, en alta proporción terpenos y triterpenos encontrados en la corteza.

El apoyo académico recibido por los profesores, tanto de la Universidad Surcolombiana, como de la Universidad Javeriana, sirvió como acicate para emprender este trabajo. Ante las limitaciones de laboratorios de la Universidad Surcolombiana, la Universidad Javeriana ofreció los suyos, allanando el camino para la fase experimental.

El hecho de constituirse en un tema de interés investigativo, desconocido en el medio, el haber realizado pruebas que capacitaron e incentivaron al grupo a profundizar en los estudios fitoquímicos, el interés en los potenciales usos industriales, medicinales o de orden académico, se constituyen en razones suficientes para enfrentar el reto de explorar la existencia de compuestos terpénicos en la *Gustavia nana* Pittier.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

Aislar e Identificar algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto de la corteza de la especie *Gustavia nana Pittier*, recolectada en el centro investigación La Tribuna.

Difundir, mediante actividades pedagógicas, el conocimiento adquirido en el campo de investigación fitoquímica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mediante extracción tipo soxhlet obtener los extractos en diclorometano de la corteza de la especie vegetal *Gustavia nana Pittier*.

Obtener las fracciones de diferente polaridad de los extractos mediante separación rápida en columna cromatográfica.

Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la corteza de la especie vegetal *Gustavia nana Pittier* mediante pruebas químicas preliminares.

Caracterizar las sustancias extraídas y aisladas en el extracto vegetal de la corteza de la especie *Gustavia nana Pittier* e identificar sus posibles usos.

Purificar algunos metabolitos secundarios presentes en las fracciones de media y baja polaridad de corteza, obtenidas en mayor cantidad, de la especie vegetal *Gustavia nana Pittier* mediante técnicas cromatográficas (CC y CCD).

Identificar los metabolitos secundarios purificados mediante propiedades físicas (Rf y punto de fusión) y métodos espectroscópicos RMN1H, RMN13C y MS.

Capacitar estudiantes de instituciones educativas de la ciudad de Neiva, en el campo de la investigación fitoquímica.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Partiendo de la realización del análisis preliminar fitoquímico y perfil cromatográfico del extracto etanólico de hojas y corteza de la *Gustavia nana* Pittier, el cual permitió detectar la presencia de flavonoides, esteroides, clorofila, terpenos y triterpenos en alta proporción, ¿Mediante pruebas físicas, soporte en espectrofotometría de masas y cromatografía de gases, es posible caracterizar el tipo de terpenos presentes en la corteza de la *Gustavia nana* Pittier?

5. ASPECTOS TEÓRICO CONCEPTUALES

5.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA GUSTAVIA NANA PITTIER

5.1.1 Familia Lecythydaceae

Es un grupo netamente tropical, distribuidos en el Viejo y el Nuevo Mundo que consta de cuatro subfamilias: Planchonioideae, Foetidiodeae, Napoleonaoideae y Lecythydoideae con 20 géneros y 284 especies². Presenta dominancia en América tropical la subfamilia correspondiente a la Lecythydaceae, se ha descrito aproximadamente 200 especies y diez géneros: Lecythis, Escheweilera, Corythophora, Allantoma, Couratari, Cariniana, Bertholletia, grias, Couroupita y Gustavia³.

En Colombia se distribuyen principalmente en bosques húmedos tropicales de tierras bajas, sobre zonas de tierras firmes e inundables, se encuentran en todo el territorio aunque en la zona andina es poco común. Dentro de las colecciones del Herbario Nacional Colombiano (COL), existe un registro de 13 especies entre 2000 y 2700 metros, en los departamentos de Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Chocó, Huila, Meta, Magdalena, Nariño, Putumayo, Risaralda y Valle.

5.1.2 Características de la Lecythydaceae

Son árboles de excelente follaje con una altura de 1 a 2 metros de alto, con crecimiento leptocaulo. Corteza casi lisa o profundamente fisurada, la corteza más externa, frecuentemente laminada. Las hojas deciduas o perennes, medianas (2.5) 5- 25 (-40) x (1.5-) 3-15 (-19) cm, van de forma alterna, dispuestas en fascículos terminales, simples, enteras o dentadas; algunas presentan estipulas.

Las flores zigomorfas, relativamente largas (1.5-) 3-8(-11) cm de diámetro, de inflorescencia racemosa o espigada, no ramificada o una vez ramificada, terminal, en las axilas de las hojas más altas, o de los tallos jóvenes debajo de las hojas. Presenta diferentes formas (solitarias o en racimos o panículas terminales) de manera perfecta. Dentro de sus propiedades físicas se encuentra el perianto, formado por el cáliz con 4-6 sépalos; corola con 4-6 pétalos o en algunas es ausente.

¹Zuloaga y Morrone, 1999. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II, Dicotyledoneae. Monogr. in Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 74:1-1269. <http://www.uns.edu.ar/inbiar/campos.htm> Recuperado 23/11/05

³ MABBERLEY, D.J. The plant-book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press, 1993. pp.707. Recuperado 23/11/05

El siguiente verticilo es el androceo, agrupa varios estambres (10-∞), dispuestos en series; libres o soldados entre sí y a la corola, con disco nectarífero intraestaminal. En el verticilo más interior es el gineceo, el cual presenta un ovario ínfero con carpelos de 2-6 soldados; lóculos en igual número al de carpelos; con un número de óvulos 1-∞ en los axilares.

Unas de las riquezas curiosas de esta familia es el fruto, debido a su forma capsular de gran tamaño, con opérculo distal; o drupáceo de color verde oscuro. Al abrir el fruto en la mitad, se observa las semillas de color blanco, formas ovaladas, de mediano tamaño, leñosas. De éstas los más conocidos son las nueces del Brasil de las cual se extrae un aceite fino.

La familia de las Lecythidaceae presenta una biología reproductiva variada, dentro su diversidad de especies con flores esta las actinomorfas (como *Gustavia*), se caracteriza por que posee muchos estambres, que producen en las anteras el polen necesario para las abejas que la visitan (*Trigonidae*). Las especies que tienen menos estambres y sustituyen el polén por el néctar son las cigomorfas, éstas son visitadas por abejas más especializadas; unos de los ejemplos citados por Ribeiro son: *Bombus*, *Xylocopa* y especialmente *Euglossinae*. *Lechitos poiteaui* y *L. barnebyi*, debido a que son polinizadas por murciélagos. Las semillas son dispersadas por murciélagos, el agua o el viento⁴.

5.1.3 Especies de la Familia Lecythidaceae

La familia Lecythidaceae es un elemento muy importante de la flora Amazónica Colombiana. Se encuentra en los bosques húmedos tropicales de tierras bajas, donde goza de buena calidad climática y ocupan estratos superiores siendo abundantes y diversas. Su distribución a más de 1000 metros es escasa, para Colombia Según Bernal Garzón, 2000 “registró 13 entre 1000 y 2700 m”⁵. Se halla preferiblemente sobre suelos bien drenados de tierra firme, aunque también en planos de inundación de ríos, quebradas.

En su mayoría son exclusivas de bosques antiguos, con buena estructura y buen estado de conservación; muy pocas especies son capaces de reproducirse en hábitat perturbados. Además de su abundancia y diversidad, las Lecythidaceae

⁴ RIBEIRO, J.E.L Da S. *Flora da Reserva Ducke*. Instituto Nacional de Pesquisas de Amazonia, Manaus. Pereira, 1999.

⁵ GARZÓN, Bernal. Estudio botánico y del potencial de uso de la familia Lecythidaceae para la Amazonia. 2000

tienen un papel ecológico importante como fuente de alimento para polinizadores (principalmente insectos) y dispersores (aves, mamíferos y peces que consumen la pulpa o la semilla de gran valor alimenticio y energético).

Su importancia económica (tanto a nivel industrial y medicinal) proviene de diferentes fuentes: las semillas de algunas especies, particularmente de “la nuez de Brasil” son un producto de comercio mundial, extraído de *Bertholetia excelsa* de la Amazonía brasileña, peruana y boliviana y constituyen un renglón económico importante para estas regiones. La pulpa y/o semilla de otras especies, tienen también alto valor nutricional y se emplean para la alimentación a nivel local. Los frutos y semillas de muchas especies son utilizados para diversos fines en la medicina tradicional. La madera es en general fuerte y en muchas especies tiene altos contenidos de sílice que las hacen importantes fuentes de madera para construcciones resistentes a la intemperie y construcciones navales. La corteza es fibrosa y es aprovechada ampliamente por las comunidades rurales para cordelería y diversos tipos de amarres.

En Colombia se han registrado 75 especies en nueve géneros, en su gran mayoría están distribuidas en las tierras bajas y húmedas de la Amazonía, la planicie del Pacífico y el valle del río Magdalena y sólo unas pocas especies se encuentran en zonas de bosque andino, lo que representa el 52% de todas las especies del país. El género *Eschweilera*, tiene mayor número de especies, se registraron 38 para Colombia y 21 para la Amazonía, seguido por *Gustavia* con 20 en Colombia y 7 para la Amazonía. Sin embargo, hay veintiséis especies (ca. 34%) y dos subespecies se encuentran en alguna categoría de amenaza *sensu* UICN (2001); de éstas, once especies y una subespecie son exclusivas de Colombia y la mayoría de ellas están restringidas en el Valle del río Magdalena y/o en el Chocó Biogeográfico.

La Figura 1 muestra los porcentajes de especies en cada una de las categorías de amenaza, así como la proporción de especies amenazadas (VU + EN + CR) *versus* no amenazadas o en duda (NT + LC + DD).

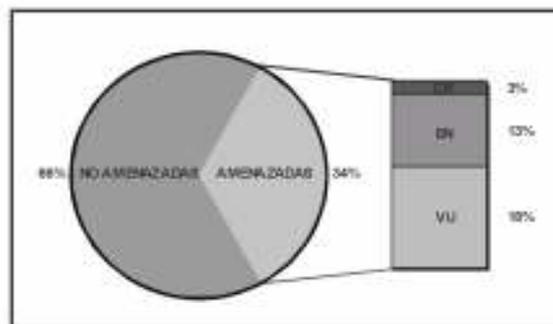


Figura 1. Porcentaje de especies en cada categoría de amenaza (Lecythidaceae)

Dos especies de Lecythidaceae se encuentran en peligro crítico (CR), una de ellas es exclusiva de Colombia (*Gustavia latifolia*, del Valle Medio del río Magdalena). Diez especies y una subespecie se encuentran en la categoría en peligro (EN), de las cuales seis especies y una subespecie son exclusivas de Colombia, y en su mayoría tienen una distribución restringida en el Valle del río Magdalena y en el Chocó Biogeográfico. En la categoría vulnerable (VU) se encuentran 14 especies y una subespecie y sólo tres de las especies son exclusivas de Colombia. En su mayoría fueron categorizadas en este nivel por ser conocidas de pocas localidades (criterio D2). Quince especies y una subespecie han sido consideradas bajo la categoría de casi amenazadas (NT), ninguna de ellas exclusiva del territorio colombiano y en su mayoría con amplia distribución en la Cuenca Amazónica. Cerca del 43% de las especies de Lecythidaceae de Colombia se consideraron bajo la categoría de preocupación menor (LC), sólo una de las cuales es exclusiva del país (*Grias haughtii*).

Las principales causas o amenazas que presentan las Lecythidaceae en Colombia se debe a la mala manipulación del ser humano con el medio ambiente provocando deforestación y la tala indiscriminada de grandes áreas boscosas, aunque es de resaltar que algunas especies están en peligro por ser maderables valiosos que han sido objeto de sobreexplotación.

Sólo el 15% (4 especies) de las Lecythidaceae que se encuentran en alguna categoría de amenaza, se han encontrado con certeza en algún área protegida, y aunque se presume la presencia de otras especies en áreas protegidas, es claro que las medidas de conservación actuales son insuficientes para asegurar la preservación de las Lecythidaceae amenazadas en Colombia. En términos de esta familia es de resaltar la necesidad del establecimiento de áreas de reserva en sectores del Valle Medio del río Magdalena.

Tabla N° 1 Lecythidaceae Exclusivas de Colombia

TAXÓN	DEPARTAMENTOS	UNIDADES GEOGRÁFICAS	ALTITUD	CAT.	* Grado de Endemismo
<i>Gustavia Latifolia</i>	Cundinamarca	Valle del río Magdalena		CR	MR
<i>Gustavia longifuniculata</i>	Santander	Valle del río Magdalena	100 - 700	EN	MR
<i>Eschweilera bogotensis</i>	Cauca, Cundinamarca, Valle del Cauca	Cordillera Occidental Cordillera Oriental Chocó Biogeográfico	10 – 2000	EN	R
<i>Eschweilera Cabrera</i>	Meta	Serranía de la Macarena	50 – 1900	EN	R
<i>Gustavia Excelsa</i>	Chocó, Santander	Valle del río Magdalena Chocó Biogeográfico	0 - 700	EN	R
<i>Gustavia Romeroi</i>	Antioquia, Santander	Valle del río Magdalena	100 – 800	EN	R
<i>Gustavia Sessilis</i>	Chocó	Chocó Biogeográfico	0 – 200	EN	R
<i>Gustavia speciosa</i> <i>Ssp. occidentalis</i>	Valle del Cauca	Chocó Biogeográfico Cordillera Occidental	50 - 1400	EN	R
<i>Eschweilera integricalix</i>	Chocó, Valle del Cauca	Chocó Biogeográfico	0 – 300	VU	R
<i>Eschweilera praealta</i>	Putumayo, Vaupés	Cuenca del Amazonas	100 - 300	VU	R
<i>Gustavia gracillima</i>	Antioquia, Caldas, Nariño	Chocó Biogeográfico Valle del Magdalena	330 - 1200	VU	R

Como se observa en la Tabla N° 2 “Lecythidaceae exclusivas de Colombia”, ordenadas por categorías de riesgo, indicando su presencia por departamentos y unidades geográficas, su intervalo altudinal, la categoría de riesgo aquí asignada y su grado de endemismo. (*) El grado de endemismo se refiere a la distribución, así: **MR**= Muy Restringido (distancia máxima entre localidades hasta 30 km), **R** = Restringido (distancia máxima entre localidades 30 a 300 km). Como especies de distribución muy restringida, y en categorías altas de amenaza, se destacan *Gustavia latifolia* (**CR**) y *Gustavia longifuniculata* (**EN**), cuyos reales se encuentran

en jurisdicción exclusiva de las Corporaciones Autónomas Regionales CAR y CAS, respectivamente.

A continuación se presenta una lista de chequeo de las Lecythidaceae Exclusivas de Colombia y su categoría de riesgo asignada en este trabajo.

Tabla N° 2. Lista de chequeo de las Lecythidaceae exclusivas de Colombia y su categoría de riesgo

<i>Asteranthos brasiliensis</i> Desfontaines	NT(VU)
<i>Bertholletia excelsa</i> H. & B.	VU
<i>Cariniana decandra</i> Ducke	NT(VU)
<i>Cariniana domestica</i> (Mart.) Miers	NT(VU)
<i>Cariniana integrifolia</i> Ducke	NT(VU)
<i>Cariniana multiflora</i> Ducke	LC
<i>Cariniana pyriformis</i> Miers	CR
<i>Couratari guianensis</i> Aubl.	LC
<i>Couratari oligantha</i> A.C. Sm.	LC
<i>Couratari stellata</i> A.C. Sm.	NT(VU)
<i>Couroupita guianensis</i> Aubl.	LC
<i>Couroupita nicaraguarensis</i> DC.	VU
<i>Eschweilera alata</i> A.C. Sm.	LC
<i>Eschweilera albiflora</i> (DC.) Miers	LC
<i>Eschweilera amplexifolia</i> S.A. Mori	DD
<i>Eschweilera andina</i> (Rusby) J.F. Macbr.	LC
<i>Eschweilera antioquiensis</i> Dugand & Daniel	LC
<i>Eschweilera bracteosa</i> (Poepp. ex O. Berg) Miers	EN
<i>Eschweilera caudiculata</i> R. Knuth in Engler	LC
<i>Eschweilera chartaceifolia</i> S. A. Mori	LC
<i>Eschweilera coriacea</i> (DC.) S. A. Mori	LC
<i>Eschweilera gigantea</i> (R. Knuth) J.F. Macbr.	VU
<i>Eschweilera integrifolia</i> (Ruiz & Pav. ex Miers) R. Knuth	LC
<i>Eschweilera itayensis</i> R. Knuth	NT(VU)
<i>Eschweilera juruensis</i> R. Knuth	NT(VU)
<i>Eschweilera laevicarpa</i> S.A. Mori	DD
<i>Eschweilera longipedicellata</i> S.A. Mori	NT
<i>Eschweilera microcalyx</i> S. A. Mori	VU
<i>Eschweilera neei</i> S. A. Mori	VU
<i>Eschweilera pachyderma</i> Cuatrec.	LC
<i>Eschweilera panamensis</i> Pittier	LC
<i>Eschweilera parvifolia</i> Mart. ex DC.	LC
<i>Eschweilera pittieri</i> R. Knuth	VU
<i>Eschweilera punctata</i> S. A. Mori	NT(VU)
<i>Eschweilera revoluta</i> S.A. Mori	VU

<i>Eschweilera rimbachii</i> Standley	LC
<i>Eschweilera rufifolia</i> S.A. Mori	NT
<i>Eschweilera sclerophylla</i> Cuatrec.	NT
<i>Eschweilera sessilis</i> A. C. Smith	LC
<i>Eschweilera tessmannii</i> R. Knuth	EN
<i>Grias colombiana</i> Cuatrec.	LC
<i>Grias multinervia</i> Cuatrec.	LC
<i>Grias neuberthii</i> J.F. Macbr.	NT(VU)
<i>Grias peruviana</i> Miers	EN
<i>Gustavia angustifolia</i> Benth.	LC
<i>Gustavia augusta</i> L.	VU
<i>Gustavia dubia</i> (Kunth) Berg.	EN
<i>Gustavia foliosa</i> Cuatrec.	VU
<i>Gustavia gentryi</i> S. A. Mori	VU
<i>Gustavia grandibracteata</i> T. Croat & S. A. Mori	LC
<i>Gustavia hexapetala</i> (Aubl.) Sm.	CR
<i>Gustavia longifolia</i> Poepp. ex O. Berg	EN
<i>Gustavia macarenensis</i> ssp. <i>macarenensis</i> Philipson	VU
<i>Gustavia nana</i> ssp. <i>nana</i> Pittier	LC
<i>Gustavia nana</i> ssp. <i>rhodantha</i> (Standley) S. A. Mori	VU
<i>Gustavia petiolata</i> S. A. Mori	LC
<i>Gustavia poeppigiana</i> O. Berg	EN
<i>Gustavia santanderensis</i> R. Knuth in Engler	EN
<i>Gustavia speciosa</i> ssp. <i>speciosa</i> (Kunth) DC.	LC
<i>Gustavia superba</i> (Kunth) O. Berg	NT
<i>Gustavia verticillata</i> Miers	

5.2 Género Gustavia

Comprende 41 especies neotropicales, de las cuales 21 se encuentran en Colombia, ver anexo Tabla N° 3. En Colombia está distribuido geográficamente en el norooccidente y un área adyacente de Panamá, con Categoría VU D2⁶.

Gustavia nana pittier

Nombre científico: *Gustavia nana* ssp. *nana* Pittier

Nombre vernáculo en Colombia: Membrillo

⁶ E. R.: *Duke 15739*, MO. Lecythidaceae. *Gustavia nana* subsp. *nana* Pittier., Contr. US Nat. Herb. 26(1): 5-6, 1927. Categoría nacional. VU D2. Citado por GALEANO, Gloria; CALDERÓN, Edardo, DUEÑAS, Hilda; TOBÓN, Isabel; www.humboldt.org.co/conservacion/libros_rojos/descargas_lr/lr_plantas/08_octava_parte.pdf. Recuperado 26/11/05

5.2.1 Descripción Botánica

Su ecología es de arbusto del sotobosque, con una altura que varía de 1 a 2 m de alto; crecen como un solo tronco o poco ramificados con agrupaciones de hojas largas al final de las ramas engrosadas (paquicaulo), o con un único tronco dominante y una copa muy ramificada con pequeñas hojas al final de las ramas delgadas (leptocaulo). Las ramas tienen de cinco a diez mm de diámetro, son arqueadas hacia arriba con las hojas hacinadas en racimos hacia sus extremos. La corteza es de color café y un poco agrietada.

Las hojas son alternas, terminales, oblanceoladas de tamaño 25 a 128 por 6-25 cm, con 16-32 pares de venas laterales, largas, estrechándose en el envés, los ápices son acuminados y con los bordes serrados. Inflorescencia suprafoliar, axilar o caulinar, pedicelos subtendidos por una bráctea solitaria, con dos bractéolas opuestas variadamente insertas a lo largo del pecíolo. Su flor se diferencia de las otras Lecythidaceae por su vistosidad, son simétricas y alcanza un diámetro de hasta 20 cm, de cáliz entero con 4 o 6 lobulado; contiene 6 a 8 pétalos, el androceo agrupa varios estambres (500 a 1210), las cuales se encuentran listas para fertilizar, fusionados en sus bases en un anillo simétrico, están adnados a la base de los pétalos y a la punta del ovario, los filamentos algo dilatados y luego agudamente contraídos en el ápice. Las anteras son de 2-5 mm de largo aproximadamente; ovario ínfero, con 4 o 6 locular, cada lóbulo con 7-93 óvulos anatópodos. Placentación axilar donde ocupa la mitad superior del septo.

Los frutos son parecidos a un trompo aunque en la parte superior es de forma chata, algunas veces se vuelven leñosos, generalmente globosos, a veces cilíndricos u obcónicos, los lóbulos del cáliz son persistentes o ausentes, con o sin costilla; el mesocarpo es de color blanco o a veces anaranjado, generalmente se vuelve blando al madurar. Se encuentran semillas de dos tipos, uno sin funículos bien desarrollados u otros con funículos concortos, expandidos y amarillos. El embrión con cotiledones planoconvexos, carnosos, largos e hipocótilo y plúmula. Plántulas con catáfilos.

En Colombia se encuentra principalmente en el occidente y noroccidente región del río Truandó, afluente del río Atrato, en el departamento del Chocó, a 40 m sobre el nivel del mar, este terreno es apropiado para la especie **Gustavia nana Pittier**, debido a que crecen en bosques inundables de agua dulce, en las orillas de humedales y lagunas, usualmente en pantanos, asociado con la palma "pángana" (*Raphia taedigera*), o en "cativales" (áreas pantanosas donde domina *Prioria copaifera* como lo afirman Prance & Mori, (1979)⁷. (Ver en anexo B Mapa N° 1)

⁷ PRANCE, G.T. & S.A. Mori. 1979. Lecythidaceae – Part I: The actinomorphic-flowered New World Lecythidaceae (*Asteranthus*, *Gustavia*, *Grias*, *Allantoma* and *Cariniana*). *Flora Neotropica* Monograph 21 (I). 270pp. www.unep-wcmc.org/species/tree_study/americas/esp/2-13.htm - 35k Recuperado 26/11/05

La especie Lecythidaceae se encuentra amenazado por la deforestación y la conversión de tierras para la ganadería. En Colombia se conoce en una sola localidad y por lo tanto califica como vulnerable según el criterio D2, aunque no existe evidencia de reducción poblacional o de la declinación continua. La única localidad conocida para Colombia es en el Parque Nacional Natural Los Katíos (data de 1968); catalogada previamente como “Vulnerable” a nivel global por Walter & Gillet, (1998)⁸. (Ver en anexos C Mapa N° 2).

Las medidas que han tomado para conservar esta especie es la exploración y monitoreo de la población conocida. La subespecie hermana (*G.nana* Subs. *Rhodantha*), también presente en Colombia, es mucho más común, con una distribución más amplia, considerándose fuera de peligro⁹.

5.3 ASPECTOS DE LA FITOQUÍMICA

La palabra fito proviene de “planta”, y química estudio de la materia. La fitoquímica estudia los principios activos de las plantas, especialmente de los llamados metabolitos secundarios que son como “artículos de lujo” que se encuentran en determinadas plantas. Estos artículos de lujo sirven de materia prima para fabricar productos con aplicación en la medicina y/o industrial; algunas pueden presentar determinado grado de toxicidad, dependiendo de los componentes químicos que posean¹⁰.

El **metabolismo primario** compromete aquellos procesos químicos que cada planta debe llevar a cabo diariamente para sobrevivir y reproducir su actuación, como son: fotosíntesis, glicólisis, síntesis de aminoácidos, entre otros.

Los vegetales producen una diversidad de sustancias, producto del **metabolismo secundario**, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores.

5.4 Metabolitos secundarios presentes en el extracto vegetal

⁸ Walter & Gillet (1998) IUCN Red List of Threatened plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Center. IUCN-Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Bdv + 862 pp. http://www.uprm.edu/publications/cjs/Vol36a/36_31-39.pdf. Recuperado 26/11/05.

⁹ E. R.: *Duke 15739*, MO. Op. cit., p. 189

¹⁰ Rafael Humberto Ramírez Gil. La Fitoquímica y su Incidencia en la Enseñanza de la Química. <http://www.pedagogica.edu.co/index.php?inf=266>. Recuperado 22/06/06

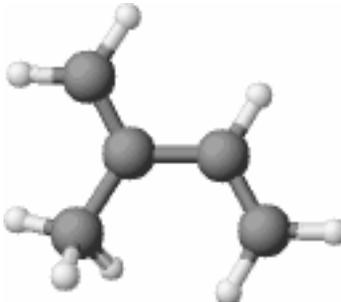
5.4.1 ESTEROIDES

Esteroides, grupo extenso de lípidos naturales o sintéticos, o compuestos químicos liposolubles, con una diversidad de actividad fisiológica muy amplia. Dentro de los esteroides se consideran determinados alcoholes (esteroles); presentes en el colesterol, en numerosas hormonas que son precursores de ciertas vitaminas (en la piel la vitamina D resulta de la exposición a la luz solar), ácidos biliares.

5.4.2 TERPENOS

Terpenos, denominación genérica de una serie de compuestos naturales que formalmente se pueden considerar polímeros del isopreno.

Figura 2. Isopreno (2-metil-1,3-butadieno) = (C₅H₈)

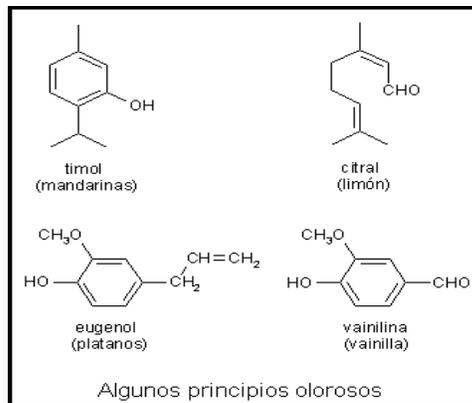


Tomando como unidad de terpeno la de 10 átomos de carbono (dos unidades de isopreno), se distingue entre monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀)...

Dentro de los terpenos se clasifica a los carotenoides que son tetraterpenos muy importantes en los mamíferos, especialmente el β-caroteno (ver figura 3) que es precursor de la vitamina A (11-cis-retinal). También las vitaminas liposolubles D (colecalfiferol) y K son consideradas como terpenos¹¹.

¹¹ <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/terpenos.html>. Recuperado 22/06/06

Figura 4. Algunos principios olorosos¹³



5.4.2.1 La ruta biogénica

Procedimiento que permite la manipulación directa del material genético para alterar la información hereditaria de una célula, organismo o población. La ruta biogénica además permite producir cantidades ilimitadas de productos biológicos por medio de técnicas genéticas, identificando y transportando los genes que codifican con el fin de obtener nuevos sistemas biológicos de mayor eficiencia.

El proceso inicia con la condensación de dos moléculas de AcCoA, dando como resultado acetoacetil-CoA, el cual a su vez se condensa con otra molécula de AcCoA originando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Este compuesto se reduce para convertirse en ácido mevalónico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriánico) y posteriormente por fosforilación y descarboxilación, en isopentenilpirofosfato (IPP), el cual, por isomerización da lugar a dimetilalil-pirofosfato (DAMPP), compuesto altamente reactivo.

La condensación se da mediante unión “cabeza-cola” de estos dos últimos compuestos, originando geranil-pirofosfato (GPP) con una proporción de 10 átomos de carbono, precedente de un gran número de principios activos vegetales (monoterpenos, iridoides, algunos alcaloides, entre otros).

El acoplamiento a este GPP (geranil-pirofosfato) de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco en cinco: sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30).

¹³ <http://www.um.es/molecula/lipi06.htm>. Recuperado 19/09/06

Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos constituyentes de los **aceites esenciales**, derivados de monoterpenos correspondientes a los **iridoides**, **lactonas sesquiterpénicas** que forman parte de los principios amargos, algunos **diterpenos** que poseen actividades farmacológicas de aplicación a la terapéutica y por último, triterpenos y esteroides entre los que se encuentran las **saponinas** y los **heterósidos cardiotónicos**¹⁴.

Como se puede observar en la tabla 3 los aceites esenciales se encuentran en partes específicas de plantas que son de uso frecuente en la sociedad.

Tabla 3. Plantas Medicinales. Terpenos¹⁵

Aceites esenciales en vegetales	Familias
• Pelos glandulares	Labiatae (menta, lavanda)
• Células modificadas del parénquima	Piperaceae (pimienta)
• Tubos oleíferos ó vitas	Lauraceae (canela)
• Tubos esquizógenos	Umbelliferae (anis, hinojo)
• Canales lisígenos	Pinaceae (pinos)
• Canales esquizógenos	Rutaceae (ruda)

5.4.3 Terpenos en las plantas medicinales

Los terpenos son uno de los grupos más numeroso entre los fitonutrientes. Básicamente son antioxidantes*, en el ser humano este proceso se refleja en

¹⁴ http://natureduca.iespana.es/med_sustanc_esencias.htm. Recuperado 22/05/06

¹⁵ http://natureduca.iespana.es/med_sustanc_esencias.htm. Recuperado 5/05/06

* Sustancia cuya acción consistiría en inhibir la tasa de oxidación de los nocivos radicales libres (disminuyen las defensas, producen daño celular con la posibilidad de producir cáncer, arteriosclerosis y envejecimiento).

evitar el envejecimiento prematuro. La mayoría de vegetales y verduras son fuente abundante de presencia de estos compuestos¹⁶.

Según el orden de clasificación de los terpenos, los monoterpenos son tóxicos para los insectos, se encuentran en las plantas que tienen actividades antibacterianas y antifúngicas como valeriana, harpagofito, genciana, trébol de agua, verbena oficial, ortiga muerta y alcanfor, entre otras.

Los sesquiterpenos son antimicrobianos, otros tienen actividad farmacológica. Se encuentran el bisaboleno (mirra), Zingibereno (aceite de gengibre), guayol (aceite de madera de guayabo), el cedrol (de la madera de cedro), artemisinina producida por la *Artemesía annua*, lactona con potente actividad antimalárica.

Los aceites esenciales en las plantas presentan variedad de funciones, dentro de sus actividades están: polinización, atrayentes de insectos, defensa contra depredadores (irritantes), sustancias de reserva de la planta, protectores en fenómenos de cicatrización (resinas y bálsamos) y actividad antimicrobiana, regulación de los procesos de evaporación de agua, deshechos del metabolismo vegetal y como mecanismo de defensa contra otros vegetales (alelopatía). Se encuentran plantas como la menta, lavanda, pimienta, canela, anís, hinojo, pinos y ruda.

Entre los triterpenos está el escualeno, constituye hasta el 90% de los aceites de hígado de ciertas especies de tiburones (familia de los escualidos), otros son el ácido oleanólico, de las hojas de olivo, corteza de guayaco y remolacha azucarera; también la hidra, caléndula, alfalfa, ginseng.

Los carotenoides son los pigmentos amarillo-rojizos que se encuentran en las plantas y en los animales. Se clasifican principalmente como compuestos tetraterpénicos, entre estos están: el licopeno, pigmento rojo del tomate maduro y de la sandía y el caroteno de la zanahoria¹⁷.

5.4.3.1 Aplicaciones

No existen moléculas con tan múltiples propósitos, tanto en la economía de la naturaleza como en la economía del hombre, que puedan equipararse a los terpenos; por ello existe un gran número de aplicaciones para estos productos como son:

¹⁶ Martha Magnin - Fitoterapeuta: consultas - hierbas, tinturas madres, tratamientos naturistas. Fitonutrientes Fitoterapia Salud BuenaSiembra.com.arp (2). Recuperado 2/05/06

¹⁷ <http://www.guia-digital.com/infociencia/arb/arb-ficha.cfm?rama=3&ID=230230>. Recuperado 3/06/06

- Terpenos para amilanar insectos o microbios: Las quemas de incienso, mirra y otras fuentes de fragancias, permiten ahuyentar microorganismos causantes de la propagación de virus y enfermedades.
- Terpenos alelopáticos^{*}: El cineol o eucalipto y alcanfor actúan como alelopáticos, inhibiendo la germinación y el crecimiento de gramíneas. Ambos terpenos son liberados por las hojas de varias plantas y arrastrados por las lluvias hasta el suelo. La conocida pobreza ecológica relativa de los pinares y eucaliptales, en insectos, vertebrados y vegetación secundaria, revela el papel defensivo de los terpenos, que estas plantas sintetizan profusamente.
- Varios monoterpenos son los responsables del agradable aroma del cilantro (*Coriandrum sativum*), el eugenol o esencia de clavos no solo es un excelente saborizante, sino un analgésico muy útil, utilizado en odontología. El anetol, la esencia del anís (*Pimpinella anisum*), le comunica el sabor agradable al aguardiente; el mentol de la yerbabuena o *Mentha piperita* y la pulegona, la esencia del poleo (*Mentha pulegium*) empleado para aromatizar las morcillas, son monoterpenos muy afines que difieren únicamente en un oxígeno; el nombre de la pulegona proviene de pulgas, por su reconocido efecto como pulgucida de uso popular.
- El pineno como feromona^{**} sintética en el hombre: El pineno es el aroma básico de la loción pinofragante y otros perfumes con olor a maderas; muchos otros terpenos integran una amplia gama de fragancias que nosotros utilizamos como feromonas sintéticas para atraer a nuestros congéneres o consortes; aunque, como suele ocurrir también en el mundo de los insectos y las plantas.

5.5 Separación cualitativa de metabolitos secundarios contenidos en el extracto vegetal de la especie "Gustavia Nana Pittier" por cromatografía en capa fina.

Para poder apartar cualitativamente los metabolitos secundarios contenidos en el

* Es el de las relaciones entre las plantas afines y las plantas que se rechazan, utilizando las feromonas para evitar el ataque de las diferentes plagas y enfermedades a las que pueden ser susceptibles.

** Son sustancias químicas oloras que nuestro cuerpo produce y tienen como única misión afectar nuestro comportamiento sexual y atraer al sexo opuesto.

extracto vegetal de la especie "***Gustavia nana pittier*** ", se debe encontrar el solvente o mezcla de solvente (eluyente) que mejor separe a través de la cromatografía en capa fina.

La cromatografía es un procedimiento físico-químico que permite separar los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en: movimiento, por adsorción o separación diferencial de estos compuestos sobre una superficie inmóvil.

Dentro del proceso cromatográfico, incluye fenómenos de absorción, el cual permite la retención selectiva de sustancias sobre la superficie de sólidos finamente divididos. Se da porque siempre existe una tendencia a la disminución de la energía libre en cualquier superficie: en la superficie de un líquido por encontrarse en estado de no saturación, y en la de un sólido por existir en ella un campo residual de fuerza.

Es posible que la absorción tenga lugar sobre toda las superficies, (aún el vidrio) pero los efectos sólo se hacen evidentes cuando el material absorbente es poroso y tiene una superficie muy grande para una masa dada.

El aumento de presión y la disminución de temperatura aumentan la magnitud de la adsorción.

El grado de separación está determinado por diferencias en los coeficientes de distribución, es decir que la separación se basa en el reparto de los componentes entre dos fases: la fase móvil o eluyente, fluido que porta la mezcla, y después de la separación puede continuar o no, realizando la misma función con los componentes separados; y la fase estacionaria: que puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido, que ejerce retenciones diferentes sobre los distintos componentes de la mezcla que se va a separar.

Las retenciones de los componentes pueden tener origen en dos fenómenos que interactúan entre las dos fases: la retención de una especie química por parte de los puntos activos de la superficie de un sólido, y la retención, de una especie química, por parte de una masa, y debido a la tendencia de ésta a formar mezcla con la primera.

5.5.1 Técnicas de separación

- Extracción

Antes de empezar un proceso extractivo, se debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine,

se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica. En el primer caso, normalmente se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el etanol o el metanol. En el segundo caso se emplea un solvente selectivo, de menor polaridad, como el éter de petróleo que sólo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares. La escogencia del solvente de extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal representan dos aspectos de suma importancia.

El material vegetal seco se pone en contacto con el solvente y se inicia un proceso opuesto al proceso de secado que tiende a reconstituir el estado original de la célula. Inicialmente el solvente penetra en la célula vegetal y expulsa el aire contenido en el citoplasma, dándose inicio de esta forma al proceso extractivo. La penetración del solvente en la célula induce un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. Es de esta manera como las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente. La capacidad de asociación puede expresarse en términos de la constante dieléctrica (ϵ). Cuanto más polar sea un solvente mayor será su respectiva constante dieléctrica. Compuestos ionizables y/o altamente polares se disuelven en solventes de elevada constante dieléctrica; al igual que compuestos apolares se disolverán en solventes de baja constante dieléctrica.

La salida del complejo "materia vegetal – solvente", en el caso de células enteras, depende del equilibrio entre la concentración de este complejo en el interior y en el exterior de la célula. Los procesos extractivos interfieren en la constante de equilibrio desplazándolo hacia el exterior de la célula.

En el aislamiento de metabolitos secundarios, los solventes más utilizados son los hidrocarburos, los hidrocarburos clorados, los alcoholes, los ésteres, los éteres, las cetonas y los aceites.

En el proceso de escogencia de un solvente determinado es necesario considerar aspectos relacionados con la selectividad, la facilidad de manipulación, el precio, la seguridad, los riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental y el grado de toxicidad del solvente. En el caso de aislamiento de productos naturales puros, pueden usarse otros solventes orgánicos, incluso mezclas azeotrópicas. Estas mezclas mantienen la misma concentración relativa de sus componentes cuando alcanzan su punto de ebullición, y el punto de ebullición de la mezcla es inferior al del componente cuyo punto de ebullición es más alto, por lo cual pueden ser usados en procesos extractivos del tipo Soxhlet, ya que no se presenta la separación de los componentes de la mezcla.

El agua utilizada en los procesos extractivos no necesita ser desmineralizada o destilada, puesto que la materia prima vegetal contiene sustancias minerales en

diferentes concentraciones. Por consiguiente, es suficiente que el agua pase por las pruebas que la clasifican apta para el consumo humano, es decir que sea potable, y será utilizada siempre y cuando no posea dureza excesiva y tenga pureza microbiológica compatible.

Durante el proceso de extracción ocurren dos fenómenos paralelos: la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas y la disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas. Mientras la lixiviación de las sustancias de las células rotas es rápida, la difusión de las sustancias a través de la membrana de células intactas es lenta y requiere etapas de humedecimiento y ablandamiento para aumentar la permeabilidad de la membrana. Este proceso comprende tres etapas: la penetración del solvente en la célula, la disolución de las sustancias extraíbles y la difusión de la solución fuera de la célula vegetal.

Las variables que interfieren en el proceso extractivo, son: el estado de división del material vegetal, la agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y el tiempo de extracción.

Teóricamente, la eficiencia del proceso extractivo sería mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas, ya que así se obtiene una mayor área de contacto con el solvente. En la práctica, la presencia de partículas muy finas dificulta los procesos de percolación; pues se presenta compactación y formación de falsas vías, y los procesos de maceración, en donde las partículas pasan al extracto, haciendo necesaria la realización de la etapa adicional de filtración, la cual no siempre es de fácil ejecución. Por otro lado, la penetración del solvente en fragmentos mayores del material vegetal es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil. Por esta razón, se recomienda emplear polvos moderadamente gruesos para la gran mayoría de los materiales vegetales.

La eficiencia del proceso extractivo es función del equilibrio de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado. El movimiento del líquido, en un equipo soxhlet por recirculación del solvente, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficiencia del proceso.

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura; de la misma manera que la agitación, la temperatura contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente, a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles, como por ejemplo, los componentes de aceites esenciales.

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales. La obtención de alcaloides constituye un ejemplo clásico de la influencia del pH en el proceso de extracción.

Dependiendo de la finalidad deseada el solvente utilizado extrae, selectivamente o no cierta clase de compuestos. Entre los solventes generales los más utilizados son los alcoholes alifáticos de hasta 3 carbonos o mezclas de éstos con el agua. Estos solventes logran extraer gran mayoría de las sustancias naturales de interés como los alcaloides, los flavonoides, los glicósidos cardiotónicos y los terpenos. Debido a su poder extractivo, estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente el material vegetal. El alcohol etílico y sus mezclas con agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas. Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar una mezcla de alcohol - agua 7: 3 ó 8: 2 para la extracción de las partes leñosas de la planta, raíces y semillas, mientras la proporción de 1: 1 es recomendada para extraer las hojas o las partes aéreas verdes, ya que en esta concentración se evita la extracción de la clorofila y de las sustancias polimerizadas o resinoides que, generalmente no presentan actividad terapéutica pero complican las etapas siguientes de purificación, por el hecho de presentar precipitados viscosos.

El tiempo de extracción se determina experimentalmente en función del solvente y del equipo seleccionado. Esta variable es resultante de todos los factores mencionados previamente. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario, no influye en el proceso negativamente pero sí influye en los costos.

- Extracción Soxhlet

La extracción de muestras sólidas con disolventes, generalmente conocida como extracción sólido-líquido o lixiviación, es un método muy utilizado en la separación de analitos de muestras sólidas.

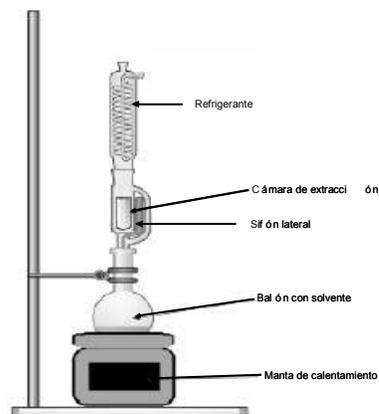
Los métodos tradicionales de extracción sólido-líquido pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos que necesitan un aporte de calor, extracción Soxhlet y métodos que no requieren un aporte de calor.

La extracción Soxhlet ha sido el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción.

El equipo soxhlet consta de un balón, una cámara de extracción conectada al balón por un sistema de sifón y un refrigerante. En este procedimiento la muestra sólida pulverizada se coloca en la cámara del extractor (Fig. 5). Se calienta el disolvente extractante, situado en el balón, sus vapores se condensan y caen gota a gota sobre el material vegetal, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del solvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al balón de ebullición vaciándose la cámara por completo. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el solvente.

Esta es una extracción por recirculación pero también por etapas ya que el proceso no se da de forma continua puesto que la operación es una secuencia de llenados y vaciados de la cámara.

Figura 5. Dispositivo para extracción Soxhlet



Este tipo de extracción presenta las siguientes ventajas:

- La muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente.
- La extracción se realiza con el disolvente caliente, así se favorece la solubilidad de los analitos.
- No es necesaria la filtración después de la extracción.
- La metodología empleada es muy simple.
- Es un método que no depende de la muestra.
- Se obtienen excelentes recuperaciones, existiendo gran variedad de métodos oficiales cuya etapa de preparación de muestra se basa en la extracción con Soxhlet.

Por otra parte, las desventajas más significativas de este método de extracción son:

- El tiempo requerido para la extracción es prolongado.
- La considerable cantidad de solvente orgánico requerido.
- La descomposición térmica de los analitos termolábiles, ya que la temperatura del disolvente orgánico está próxima a su punto de ebullición.
- No es posible la agitación del sistema, la cual podría acelerar el proceso de extracción.
- Es necesaria una etapa final de evaporación del disolvente para la concentración de los analitos.
- Esta técnica no es fácilmente automatizable.

5.5.2 Técnicas cromatográficas

La cromatografía puede definirse como la técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos, que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida.

Para explicar el fenómeno cromatográfico es necesario establecer dos tipos de fundamentos: uno remoto y otro próximo.

El fundamento remoto se encuentra en alguna o algunas de las propiedades físicas o físico – químicas de los analitos: solubilidad (tendencia a disolverse), adsorción (tendencia a ser retenidos los sólidos finamente divididos), volatilidad (tendencia a pasar a estado gaseoso), tamaño, carga, reactividad química o bioquímica, entre otros. La mezcla de sustancias a separar se coloca en una situación experimental dinámica donde exhiben dos de estas propiedades, o bien una de ellas pero por duplicado, tal como la solubilidad en dos líquidos diferentes, como ocurre en cromatografía líquido – líquido.

Para efectuar este proceso debe cumplirse que, los componentes de los sistemas empleados deben estar en íntimo contacto entre sí, y que, el equilibrio establecido entre estos componentes debe estar lo mas completo posible.

El fundamento próximo se encuentra en el hecho que es muy improbable que dos especies presente cuantitativamente el mismo par de propiedades físicas o físico – químicas frente a un sistema cromatográfico dado. Por tanto, en estas diferencias, que pueden ser muy pequeñas se basa la separación cromatográfica.

Si se transforma la idea del equilibrio estático establecido entre las dos fases en un equilibrio dinámico, se tiene la realidad del fenómeno cromatográfico. Como se ha indicado anteriormente, una de las fases, denominada móvil fluye a través de la otra, a la que se denomina fase estacionaria, que permanece inmóvil y que, al menos en alguna extensión esta en equilibrio con la fase móvil.

Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su “movilidad” entre sí y con respecto a la fase móvil. Se eligen las condiciones experimentales y las fases cromatográficas para que los componentes de la mezcla se muevan a distinta velocidad. La base de la separación cromatográfica será, por tanto, la diferencia de la velocidad de migración de los mismos.

La cromatografía es probablemente la más versátil de las técnicas de separación: es aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil. De hecho, las técnicas de separación suelen dividirse en dos grandes grupos: cromatográficas y no cromatográficas. La elección de una técnica cromatográfica concreta dependerá de la naturaleza y cantidad de muestra, del objetivo de la separación y de las limitaciones del tiempo y equipo asequible.

Según la forma de llevar a cabo la separación cromatográfica, es decir, según el dispositivo utilizado para conseguir el contacto entre la fase móvil y la estacionaria cabe distinguir dos grandes tipos de técnicas cromatográficas: plana y en columna.

- Cromatografía plana

La cromatografía plana es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria está extendida sobre la superficie de un plano y la fase móvil fluye a través de ella. La fase móvil siempre es un líquido, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido soportado en un sólido (cromatografía de partición) o un sólido sorbente (cromatografía de adsorción, cambio iónico o exclusión). El flujo de la fase móvil se produce por capilaridad (cromatografía horizontal y ascendente) y por capilaridad y gravedad (cromatografía descendente).

La diferencia principal con la cromatografía en columna es de tipo técnico, es decir, difieren en la forma de soportar la fase estacionaria. En lo que se refiere al fenómeno en que se fundamenta la separación es el mismo para ambas técnicas.

En la cromatografía plana la disolución de la muestra a separar se sitúa sobre el plano que contiene la fase estacionaria en forma de mancha, o a veces de banda, a corta distancia de uno de los extremos de dicho plano. Una vez seca la mancha o banda, el extremo del plano próximo a la misma se pone en contacto con la fase móvil, manteniendo todo el sistema cromatográfico en una cámara cerrada. La separación se produce por la migración diferencial de los componentes de la muestra en la dirección en la que se mueve la fase móvil.

Generalmente, en cromatografía plana el analito no abandona el lecho cromatográfico, de forma que el proceso se detiene cuando la fase móvil ha alcanzado una determinada zona del plano.

En cromatografía plana es posible calcular el factor de retención de una sustancia en un determinado sistema cromatográfico, denominado Rf. El factor de retención (Rf) es obtenido por medición de la distancia desde el origen al centro de la mancha producida por la sustancia, y dividiendo ésta por la distancia entre el origen y el frente del solvente.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Cabe distinguir dos tipos de cromatografía plana:

- Cromatografía en papel

La cromatografía en papel es particularmente aplicable a constituyentes hidrófilos, a saber carbohidratos, aminoácidos, bases de ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, glicósidos, entre otros. Es una combinación de la cromatografía de adsorción y de reparto, puesto que el medio es una matriz de celulosa empapada en agua; el papel retiene el agua (fase estacionaria), sirviendo al mismo tiempo tanto de medio de separación como de soporte. Una de las ventajas más sobresalientes es la considerable reproducibilidad de los valores Rf de gran importancia en la descripción y distinción de los diferentes metabolitos.

- Cromatografía en capa delgada

La cromatografía en capa delgada consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa delgada de adsorbente retenida sobre una superficie plana de vidrio o aluminio.

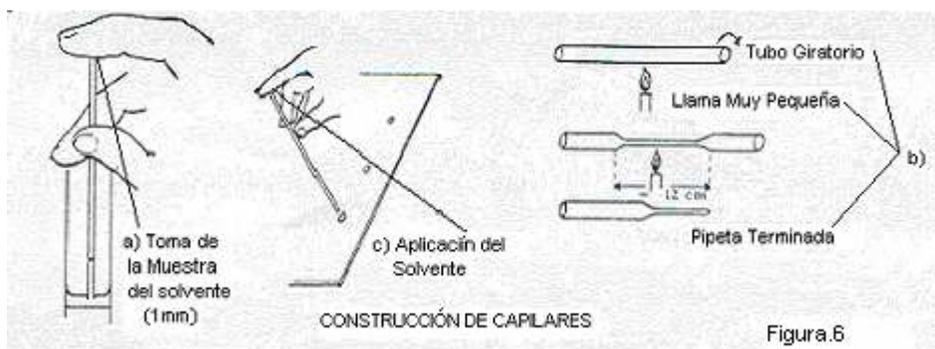
El gran desarrollo de esta técnica se debe a las múltiples ventajas que ella ofrece, entre las cuales podemos citar: su fácil comprensión y rápida ejecución, la versatilidad, su reproducibilidad y el bajo costo. En el mercado se pueden encontrar diferentes tipos de adsorbentes entre los cuales se pueden citar: el sílica gel (SiO₂), la celulosa (para cromatografía de reparto) y la poliamida. También ha sido bastante utilizada la incorporación de reactivos a los adsorbentes, con lo cual se busca la separación de las sustancias muy relacionadas. La sílica también puede ser modificada dando como resultado la cromatografía en fase reversa. Esto ocurre cuando mediante procedimientos químicos se enlaza la sílica a grupos tales como C₁₈, C₈, C₂, CN y NH₂. Cuando utilizamos la cromatografía de fase reversa, se usa un adsorbente apolar o de

polaridad media y una fase móvil polar, mientras que en la cromatografía en fase normal, se utiliza un adsorbente polar y una fase móvil apolar. De esta forma, el número de sustancias diferentes que pueden ser analizadas utilizando la cromatografía de capa delgada aumenta considerablemente.

5.5.3 Aplicación de la muestra

Como la sustancia que se desea tomar cromatografía es con un concentrado, requiere que se disuelva la cantidad que quepa en la punta de una micro-espátula o capilar, en un mililitro del disolvente adecuado (Figura N° 6 –Imagen a-).

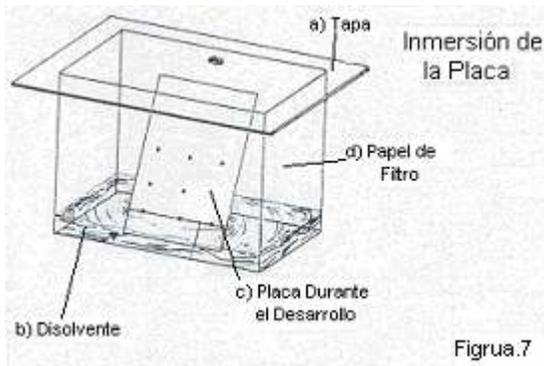
La aplicación se hace con una micro pipeta; si se carece de micro pipeta, se estira por calentamiento un tubo capilar de vidrio (Figura N° 6 –Imagen b-) para lograr una tubuladura más fina que servirá de aplicador. Se introduce el capilar por su parte más delgada en la solución de la muestra y se transfiere así la muestra a la placa, aplicándola en un solo punto. La aplicación se hace delicadamente, para no romper la capa del material absorbente. El punto de la muestra debe quedar mínimo a medio centímetro del borde inferior de la placa y en la mitad de su anchura (Figura N° 6 –Imagen c-). Cuando se trata de una placa angosta (como en nuestro caso) y de una sola muestra. Cuando se trata de varias muestras corridas en una misma placa, entre los puntos de la muestra y muestra, debe quedar una separación de 2 cm. como mínimo, y todos a la misma distancia del borde inferior de la placa.



5.5.4 Inmersión de la placa

La cromatoplaquea con su muestra debe sumergirse parcialmente en la cubeta y recostarse en una de sus paredes, de tal forma que el nivel del eluyente no quede por encima del punto donde se colocó la muestra. De lo contrario, la muestra no ascenderá por adsorción sino que se disolverá en el eluyente y quedará en el fondo de la cubeta. La cubeta se tapa y se deja que el eluyente ascienda por la

cromatoplaca hasta medio cm. antes de llegar al borde superior, fenómeno que recibe el nombre de elusión de la placa(figura N° 7). Es importante tener en cuenta que no se debe permitir que el eluyente llegue hasta el borde superior de la cromatoplaca, por que no se podría asegurar la precisión de la medida de distancia recorrida por el eluyente, y el Rf sería inexacto.



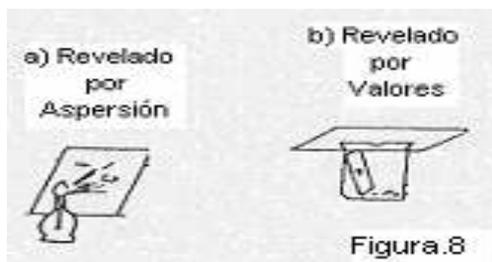
Una vez el eluyente haya recorrido la placa, se retira de la cubeta y se deja secar por dos o tres minutos. Cada soluto deberá haber quedado como una mancha compacta, redonda u ovalada.

Es frecuente que las manchas presenten zonas con colas o porciones difusas o distorsionadas; esto se debe a muchas causas; ejemplo concentración excesiva de la muestra, irregularidad en la superficie de la cromatoplaca, movimiento del eluyente durante el desarrollo del cromatograma. Sin embargo, aunque las manchas no tengan el tamaño y la forma ideal, el sistema cromatográfico puede ser útil si la producibilidad proporciona separaciones deseadas.

5.5.5 Reveladores

Es útil para la cromatografía de capa fina ya que es un compuesto que produce con el soluto depositado en la placa, un nuevo compuesto químico coloreado, sensible a nuestro sistema ocular. De esta forma, el revelador nos muestra la zona en que se depositó el soluto en el cromatograma.

Hay varias formas para aplicar el agente cromogénico, entre los cuales trabajamos fue por aspersion del revelador sobre la placa y en especial la exposición de la cromatoplaca a la luz ultravioleta. Desde luego que este revelado solo permanece durante el tiempo de exposición y sólo es aplicable a solutos que den señales en ese rango del espectro (Figura N° 8).



La naturaleza química del revelador, dependerá de la naturaleza química del compuesto que se va a detectar, ya que reaccionará con él.

Los siguientes factores causan variaciones en el valor del R_f no permitiendo que sea un valor absoluto: las variaciones de temperatura del medio ambiente, el grado de pureza de los solventes utilizados y las variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa delgada. Debido a estos factores, el uso de una sustancia de referencia (patrón) para garantizar la identificación, es muy importante, principalmente cuando se trata de extractos de plantas.

- Cromatografía en columna

Esta técnica es llevada a cabo convencionalmente introduciendo la fase estacionaria dentro de un cilindro de vidrio, provisto de una llave de paso inferior, obteniéndose una columna de material retenedor a través de la cual se hace pasar la fase móvil. El flujo de la fase móvil (líquido o gas) a través de la estacionaria se consigue por presión, por capilaridad o por gravedad, su velocidad puede controlarse fácilmente dependiendo del tipo del gradiente de presión mantenido a través de la columna.

La separación de las muestras se realiza de forma secuencial, es decir, cada una de ellas debe someterse individualmente al mismo proceso de introducción en la columna, separación y colección, además se equilibra la columna antes de introducir la siguiente muestra. Esta separación se realiza por tiempos o por volúmenes.

La fase móvil debe elegirse de forma que eluya todos los componentes de la muestra para que no se produzca el “envenenamiento” de la columna, este envenenamiento puede suponer una pérdida de tiempo considerable hasta que se logra eluir completamente aquellos componentes que hayan podido quedar acumulados.

En la cromatografía clásica, las dimensiones de la columna deben ser escogidas de acuerdo a la cantidad de muestra a separar y al tipo de adsorbente a utilizar. Por lo general, se acepta que entre más delgada y larga sea una columna es

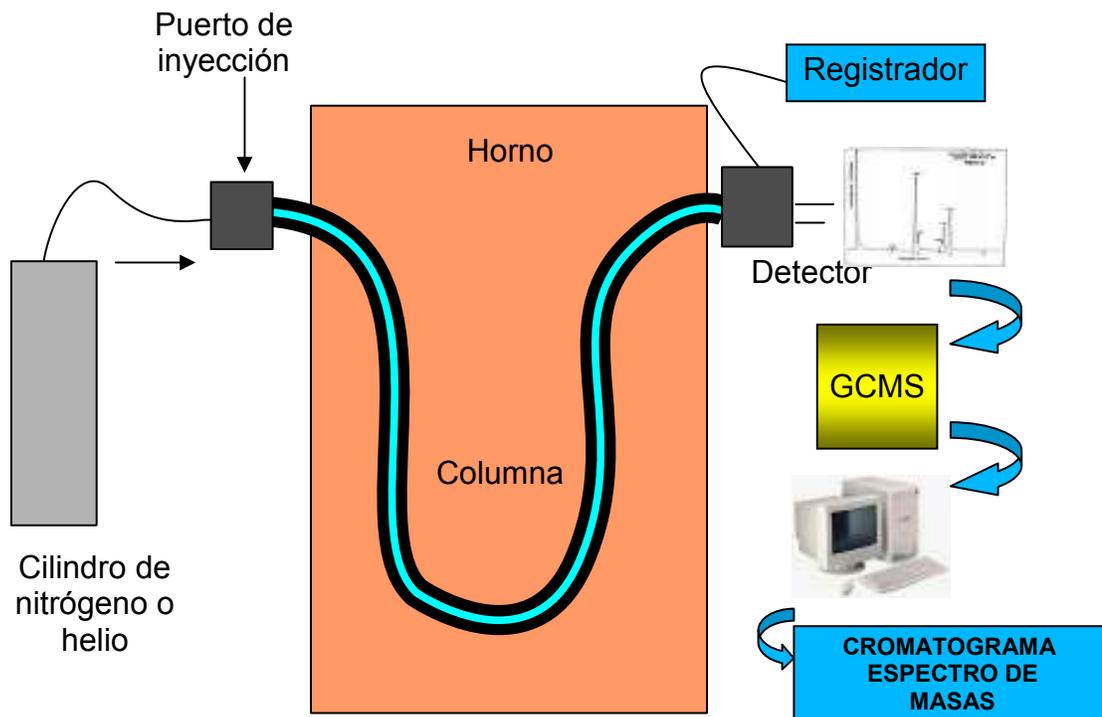
mucho mas eficiente ya que el camino recorrido por la muestra es mas largo, y por consiguiente, la distribución y separación de cada uno de los componentes será más nítida. De la mezcla a separar, cada soluto debe atravesar completamente la longitud de la columna, por lo que el tiempo que dura la separación esta determinado por el tiempo que tarda el componente mas lento en llegar al frasco colector.

- Cromatografía de gases

Aquí la fase móvil es un gas inerte (por ej. Nitrógeno) que fluye por la columna y la fase estacionaria es un líquido o un sólido no volátil. El liquido (fase estacionaria) se enlaza a una matriz sólida inerte.

En la práctica la columna está contenida en un horno termostático, un microlitro de muestra líquida es inyectado a la entrada de la columna. Como cada componente alcanza el final a diferentes tiempos es detectado y registrado sobre un papel (cromatograma) en función de concentración versus tiempo. El tiempo de retención es característico de una sustancia particular (para la misma columna, la temperatura, el gas de arrastre, etc.). El área debajo de cada pico representa las cantidades relativas de cada sustancia en la mezcla (ver figura 9).

Figura 9. Diagrama de cromatografía de gases y de masas



5.6 ESPECTRO DE MASAS

Dado que en un espectro de masas (EM) convencional cada pico indica solo la masa total del fragmento, éste puede contener distintos tipos de átomos y diversas estructuras. Por esto, el análisis de un espectro de masas consiste en seleccionar primero los picos principales y en interpretarlos simultáneamente.

Con frecuencia se intenta primero localizar el ión molecular y, luego caracterizar las distintas rupturas a base de los picos más intensos presentes. Dada una estructura probable deben analizarse sus rupturas principales y buscarlas, luego, en el espectro. La comparación con el espectro de una muestra auténtica es en general la prueba final de la elucidación estructural

5.7 INVESTIGACIÓN Y APRENDIZAJE

Desde el punto de vista de su etimología, investigar proviene del latín *in* (en) y *vestigare* (hallar, inquirir, indagar, seguir vestigios) lo que conduce al concepto elemental de <descubrir o averiguar alguna cosa, seguir la huella de algo, explorar>¹⁸. De esta manera se podría considerar a un investigador, como aquella persona que se dedica a alguna actividad de búsqueda, independiente a su metodología, propósito e importancia. La investigación surge de la misma necesidad del hombre por conocer, comprender el mundo que lo rodea, los cambios y fenómenos que ocurren en dicho hábitat. La curiosidad es una de las facultades del hombre, lo impulsa a explorar, descubrir nuevas cosas.

En este proceso de descubrimiento, el hombre desarrolla funciones cognitivas con el fin de discernir lo significativo, relacionando los conocimientos previos con los nuevos, adquiriendo nuevas conductas en su diario interactuar.

Investigar y aprender son pilares fundamentales para el desarrollo íntegro del ser humano, por ello es importante implementarlo en las aulas escolares a través de planes estratégicos (laboratorios, talleres), teniendo en cuenta el tipo de estudio que se va a ejecutar.

Según el tema a trabajar en el aula de clase, el docente tiene la facilidad de planear estrategias, actividades didácticas para desarrollarlas en conjunto con los estudiantes, alcanzando un conocimiento claro, concreto y aplicándolo en el diario interactuar. A continuación se plantean algunas de ellas:

¹⁸ Tevni Grajales G. recuperado. file:///A:/invesdefin.htm (1 of 3) [27/03/2000 04:38:37 p.m.]

- Para vincular al educando a una investigación en ciencias naturales y educación ambiental, se debe relacionar el entorno que rodea al estudiante (casa, barrio, colegio) con el fin de asociar las experiencias cotidianas.
- El estudiante comienza a despertar curiosidad por conocer las propiedades de la planta a medida que indaga sobre los beneficios y perjuicios que causa a la humanidad. Para que tipos de enfermedades sirve, quien la utilizó (tío, vecino, compañero).
- Buscar información que sirva de provecho para la investigación (periódicos, noticias, revistas, la internet), encontrando antecedentes y argumentos claros sobre la especie en cuestión.
- Relaciona los conceptos previos con el lenguaje científico, identificando el nombre común con el nombre científico de la especie, trazando una línea de la columna A (nombre común) al nombre científico ubicado en la columna B otra con un color o lapicero.
- Teniendo en cuenta las propiedades de la planta de estudio con sus respectivas funciones y beneficios. El estudiante puede narrar una historia sobre la especie investigada, profundizando sobre ésta (origen, composición química, hábitat, servicios).
- Armar sopa de letras con palabras alusivas de la especie vegetal, nombres de metabolitos secundarios, pruebas para identificar, reactivos a trabajar, etc.
- Después de hacer el afianzamiento de términos o lenguaje científico, se desarrolla una practica de laboratorio con el fin de interactuar con los reactivos, instrumentos que requiere cada prueba para la identificación del metabolito secundario.
- Socialización de resultados, dando a conocer los metabolitos secundarios presentes en cada especie vegetal. Para ello presentaran un informe descriptivo de la práctica desarrollada.
- Para ello se hizo la puesta en común entre los grupos para hallar diferencias en la composición química, el desarrollo de cada prueba, identificando las especies con mayor cantidad de metabolitos secundarios.

Al afianzar estos conceptos en el educando; éste mejora su mejorar la calidad de vida, la dinámica social, el mejoramiento y conservación de su entorno natural (ecosistema o medio ambiente), donde el buen uso de los recursos naturales prolonga la vida humana y los seres vivos que hacen parte de este planeta.

5.8 LABORATORIO Y DOCENCIA

En el marco del nuevo Sistema Educativo, el aprendizaje de las Ciencias no ha de concebirse como la mera acumulación de conocimientos científicos¹⁹; sino, como un proceso a través del cual el estudiante adquiere una capacidad de razonamiento y una metodología coherente con el quehacer científico- que le ayuden a analizar y resolver problemas de distinta índole, no sólo en el ámbito estrictamente científico²⁰. En este sentido, la educación científica ha de proveer al educando de una serie de actitudes, valores y normas, que le permitan aplicar el método científico de un modo adecuado y satisfactorio en diferentes contextos y situaciones de su entorno más próximo²¹.

La realización de experiencias ha de ser uno de los elementos esenciales a la hora de plantear la enseñanza/aprendizaje de las Ciencias²². Mediante los procedimientos adecuados, estas experiencias han de estar orientadas a simular y/o reproducir ciertos fenómenos, estudiados en clase de manera teórica, con idea de que el estudiante asimile los conceptos y, consecuentemente, logre un aprendizaje significativo de los mismos²³. Por tanto, el laboratorio de prácticas se presenta como uno de los elementos imprescindibles en la educación científica a todos los niveles.

El laboratorio es un lugar estratégico de aprendizaje, donde el ser humano explora sus habilidades y destrezas para verificar, comprobar e enriquecer el potencial intelectual. El centro de investigación, se caracteriza por contar con diversos instrumentos de medida o equipos, facilitando la experiencia práctica y desarrollo de la misma.

¹⁹ POZO, J. I. y GÓMEZ CRESPO, M. A. (1998): *Aprender y enseñar Ciencia. Del conocimiento cotidiano al conocimiento científico*

²⁰ ROSADO, L. y AYENSA, J. M. (1999): *La enseñanza de la Física en el nuevo Sistema Educativo. Base didáctica y nuevos medios tecnológicos en la ESO y el Bachillerato*. Madrid: UNED.

²¹ ROSADO, L. y GARCÍA CARMONA, A. (2001): Diseño de un programa-guía de actividades en el estudio de la Estática de Fluidos para la ESO. En Rosado, L. y Cols., *Didáctica de la Física y sus Nuevas Tendencias*. Madrid: UNED, pp. 622-667. <http://contexto-educativo.com.ar/2004/3/nota-08.htm>

²² GIL, D. et al (1991): *La enseñanza de las Ciencias en la Educación Secundaria*. Barcelona: ICE / Horsori.

²³ GARCÍA CARMONA, A. (2002): El termómetro de Galileo como instrumento didáctico en el aula de Física. *Revista Española de Física*, 16 (2), pp. 46-49.

También es el medio para estimular la creatividad, la curiosidad que domina desde temprana edad en el ser humano, debido a la relación con el medio natural. Es esencial definir el problema, plantear objetivos concretos sobre lo que se piensa hacer, formular hipótesis con el fin de comprobar su aproximación científica o encontrar nuevos acontecimientos diferentes a lo pensado.

La ciencia con sus diversas ramas, facilita al hombre la capacidad de conocer, comprender sus cambios, y a la vez profundizar sus inclinaciones para ser un ente hábil dentro de su campo de acción social. Por ello, la práctica docente ha de convertirse en un medio de construcción intelectual, social, donde el aprendizaje se hace significativo a medida que el educando interpreta, argumenta, relaciona lo conocido con lo nuevo y lo aplica en las experiencias diarias.

En el proceso de enseñanza-aprendizaje hay que tener en cuenta:

- Lo que un alumno es capaz de hacer y aprender en un momento determinado, dependiendo del estadio de desarrollo operatorio en que se encuentre²⁴. La programación curricular debe planificar actividades de aprendizaje, de forma que se ajusten a las peculiaridades de funcionamiento de la organización mental del alumno.
- El conjunto de conocimientos previos que ha construido el alumno en sus experiencias educativas anteriores -escolares o no- o de aprendizajes espontáneos. El alumno que inicia un nuevo aprendizaje escolar lo hace a partir de los conceptos, concepciones, representaciones y conocimientos que ha construido en su experiencia previa, y los utilizará como instrumentos de lectura e interpretación que condicionan el resultado del aprendizaje.
- Se ha de establecer una diferencia entre lo que el alumno es capaz de hacer y aprender sólo y lo que es capaz de hacer y aprender con ayuda de otras personas, observándolas, imitándolas, siguiendo sus instrucciones o colaborando con ellas²⁵. La distancia entre estos dos puntos, llamada *Zona de Desarrollo Próximo (ZDP)* porque se sitúa entre el nivel de desarrollo efectivo y el nivel de desarrollo potencial, delimita el margen de incidencia de la acción educativa. En efecto, lo que un alumno en principio únicamente es capaz de hacer o aprender con la ayuda de otros, podrá hacerlo o aprenderlo posteriormente él mismo. La enseñanza eficaz es pues, la que parte del nivel de desarrollo efectivo del alumno, pero no para acomodarse, sino para hacerle progresar a través de la zona de desarrollo próximo, para

²⁴ Teorías de J. Piaget. <http://www.xtec.es/~cdorado/cdora1/esp/psicolog.htm>. Recuperado 18/10/06

²⁵ Vigotsky, aprendizaje por imitación modelaje. http://html.rincondelvago.com/aprendizaje_12.html. Recuperado 18/10/06

ampliar y para generar, eventualmente, nuevas zonas de desarrollo próximo.

- La clave no se encuentra en si el aprendizaje escolar ha de conceder prioridad a los contenidos o a los procesos, lo que sugiere, es asegurarse que sea significativo. La distinción entre aprendizaje significativo y aprendizaje repetitivo, afecta al vínculo entre el nuevo material de aprendizaje y los conocimientos previos del alumno: si el nuevo material de aprendizaje se relaciona de manera sustantiva y no aleatoria con lo que el alumno ya sabe, es decir, si es asimilado a su estructura cognitiva, nos encontramos en presencia de un aprendizaje significativo; si, por el contrario, el alumno se limita a memorizarlo sin establecer relaciones con sus conocimientos previos, nos encontraremos en presencia de un aprendizaje repetitivo, memorístico o mecánico.

La repercusión del aprendizaje escolar sobre el crecimiento personal del alumno es más grande cuanto más significativo es, cuanto más significados permite construir. Así pues, lo realmente importante es que el aprendizaje escolar -de conceptos, de procesos, de valores- sea significativo.

Por lo anterior se demuestra que el aprendizaje significativo se destaca como instrumento esencial para el desarrollo del proceso de enseñanza- aprendizaje, logrando en los estudiantes una formación integral reflejándose en los aspectos sociales, culturales, políticos en su diario interactuar.

6. ENFOQUE METODOLÓGICO

El conocimiento detallado de los posibles métodos de investigación que cabe seguir es muy conveniente cuando se emprende la resolución de un problema en forma de pensar reflexivo. Los métodos y tipos de investigación pueden clasificarse de acuerdo con las fases psicológicas del proceso de resolución, del objetivo adoptado, del área de investigación efectuada, la situación del proyecto, las relaciones de causa – efecto, las clases de datos aportados como pruebas, las materias utilizadas, los procedimientos seguidos, los valores de tiempo implicados y otros criterios. Las clasificaciones estrictamente lógicas son difíciles de hallar, y cabe que no sean en absoluto necesarias para el éxito de la investigación.

Sin embargo, el método que se ajusta a los requerimientos del proyecto es el método **descriptivo de investigación**, el cual equivale al hallazgo de hechos representados en el trabajo de laboratorio realizado, seguido de interpretación mediante la revisión bibliográfica pertinente consecuente con el tema tratado “fitoquímica”, y particularmente con un tipo de compuesto: los terpenos.

Procedimientos lógicos del proyecto de investigación: la justificación de este procedimiento múltiple se halla en su concomitancia en que la mente del estudiante investigador se produce en esta forma.

Se encuentra que el impulso del proyecto lo suministra:

a). la sensación general de dificultad y necesidad que el investigador posee al comienzo y el cual es repetido, aumentado y dirigido por los necesarios canales de actividad a medida que avanza el estudio de la investigación. Representada esta en el esfuerzo realizado para la consecución de dos pasantías en la Universidad Javeriana.

b). Allí se encuentra la definición del problema. Entendida como la identificación de algunos de los componentes de la especie *Gustavia nana pittier*.

c). la explicación conjeturada, toma la forma de un objetivo fundamental. La identificación de los terpenos y triterpenos como principales constituyentes de la *Gustavia nana Pittier*.

d). Para la solución del problema planteado y su corroboración deductiva. Los resultados obtenidos después de la realización de los procesos de laboratorio fueron enviados a la Universidad de Pereira donde se realizaron las pruebas de espectros de gases y de masas para cada una de las sustancias, comprobándose con los resultados que la planta esta constituida en un gran porcentaje por terpenos y tripterpenos.

f). se perfila el examen predictivo prolongado de las generalizaciones conclusivas, que puede reseñarse en sus correspondientes párrafos o capítulos de la memoria final.²⁶ Finalmente se concluye al respecto con unas bases teórico practicas bien fundamentadas.

²⁶ WHITNEY, Frederick Lamson. Elementos de Investigación. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1970.

7. METODOLOGÍA

El diseño metodológico partió de un sustento bibliográfico sobre la ausencia de estudios fitoquímicos de la especie referenciada. Se fundamentó en los siguientes aspectos:

7.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Inicialmente se realizó la búsqueda bibliográfica referente con los Terpenos, clases de terpenos y todos sus derivados, para identificar los encontrados en la especie *Gustavia nana Pittier*.

Esta parte se realizó en dos fases, la primera que condujo a la exploración de fuentes regionales, entre las cuales cabe citar la Universidad Surcolombiana, la Biblioteca Departamental; en la segunda fase hubo necesidad de recabar información de las universidades Javeriana, Nacional y biblioteca Luis Ángel Arango; con esta información base se continuó con la búsqueda en la Internet.

Es importante aclarar que en la región no se encontraron escritos que soportaran los requerimientos de la investigación, existía un trabajo desarrollado en la Universidad Surcolombiana denominado Estudio Florístico Centro Investigación La Tribuna. Además se encontró parte de la información en el libro rojo del instituto Humboldt.

7.2. ANÁLISIS DE LABORATORIO

Para la realización del análisis fitoquímico se realizó una pasantía durante quince días en la Universidad Javeriana sede Bogotá, que cuenta con la infraestructura, los equipos necesarios y el personal capacitado para llevar a cabo las distintas pruebas que este tipo de estudio requiere; esta pasantía estuvo dirigida por el doctor Rubén Torrenegra y el aspirante al título de doctor el profesor Oscar Rodríguez.

Se obtuvo registros fotográficos que permitió la observación del proceso de obtención de las sustancias, sistematización de datos de los resultados y elaboración de productos.

7.3 MUESTRA

El material vegetal estudiado correspondió a la especie *Gustavia nana pittier* colectada durante el 8 y 23 de abril de 2006, en El Centro de Investigaciones y Educación Ambiental “LA TRIBUNA”.

El Centro de Investigaciones y Educación Ambiental “LA TRIBUNA”, se encuentra ubicado en la Vereda San Francisco a 26 Km de la ciudad de Neiva, que cuenta con 127,100 Ha, distribuidas así: Bosque natural secundario 43.5 Ha (34.2%), Matorral alto: 38.3 Ha (30.2%), Matorral bajo: 25.5Ha (20%), Pasto natural: 61. (4.8\$), Pasto con sinusia arbustiva; 3.5 Ha. (2.8%), Rocas expuestas: 8 Ha. (6.3%) con una infraestructura petrolera de 2.2 Ha (1.7%). Presenta cotas mínimas de 480 msnm y máxima de 800 msnm, cuyas características climatológicas muestran un comportamiento bimodal con dos periodos de precipitación anual febrero- abril y octubre-diciembre.

Por la zona discurren dos quebradas de importancia como El Neme y El Chimbila, cuatro cascadas con alturas máximas de 17 metros: Las Lajas, Lajitas, El Chispiadal y la de la Cueva del Chimbilo,. Cuatro lagos, dos permanentes y dos intermitentes regulado por las aguas de escorrentías.

El Centro abarca 127.100 Ha, distribuidas así:

1. Hábitat con predominancia de coberturas arbóreas/arbustiva, con pendientes mayores del 12%, representadas en 76.39 Ha (60.11%), compuesto por Bosque natural secundario (43.5 Ha - 34.2%) y Matorral alto (38.3 Ha - 30.2%), los cuales representan mayor grado de protección de la flora y fauna silvestre.
2. Hábitat con predominancia de coberturas arbustivas o presencia de árboles, compuesto por matorrales bajos (25.5 Ha - 20%), y pastos con sinucia arbórea/arbustiva (3.5 Ha - 2.8%) ubicado en zonas quebradas muy escarpadas, con pendientes mayores de 12%, menos susceptibles de intervención humana, para la protección de la flora y fauna silvestre.
3. Hábitat con predominancia de Pastos naturales, con una cobertura de 6.1 Ha (4.8%), y Rocas expuestas, con 8 Ha. (6.3%).
4. También presenta una infraestructura petrolera de 2.2 Ha (1.7%).

Según el Inventario Florístico Preliminar de la Reserva La Tribuna, Municipio de Neiva, Huila, realizado por (Rincón, L. Obando, S 2004), se reporta que la flora de Pteridófitos (Helechos) y Angiospermas (Monocotiledóneas y Dicotiledóneas) está distribuida en 58 familias, 119 géneros y 150 especies.

La familia más diversificada a nivel de géneros y especies fue Poaceae con 11 géneros (9.24 %) y 12 especies (8.63 %), Asteraceae con 11 géneros (9.24%) y 11 especies (7.91%). Le siguen Fabaceae con 9 géneros (7.56 %) y 12 especies (8.63%), Mimosaceae con 5 géneros (4.20 %) y 6 especies (4.31%) y las familias Euphorbiaceae, Malpighiaceae, Malvaceae, y Sapindaceae, cada una con 4 géneros (3.36 %) y 5 especies cada una (14.38%) del total de especies. La familia Sterculiaceae con 4 géneros (3.36 %) y 4 especies (2.87 %).²⁷

7.4 RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE

La recolección de la muestra para el análisis se efectuó con base en las características físicas externas del árbol (ritidoma en buen estado), factores (hongos) de los que depende la resistencia a tratamientos térmicos a los que se le someta.

Se recogió 1 kilogramo de corteza de muestra de tres arbustos, in situ, seleccionada de la especie vegetal, se transportó por vía terrestre a Neiva donde se lavó con agua a chorro y con esponja suave para despojarla del polvo y otras suciedades que la cubrían; el exceso de humedad se eliminó dejando escurrir en un trozo de tela blanca limpia y luego sometiendo las muestras a un proceso de secado, se expusieron a temperatura ambiente durante ocho días hasta que quedaran totalmente secas, posteriormente trituraron en el molino eléctrico, de tal manera que facilitarían el análisis en el laboratorio.

El trabajo de laboratorio se realizó en las instalaciones de la Universidad Javeriana de Bogotá y en la Universidad Tecnológica de Pereira, habida cuenta de las limitaciones tecnológicas presentes en el departamento del Huila.

Para iniciar el trabajo de laboratorio se requirió de 1 kilogramo de muestra seca; como no se contaba con mucho tiempo para secar la muestra, se consiguió el permiso pertinente en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Surcolombiana para utilizar un horno en el cual se colocaron las muestras en un rango de temperatura entre 25-35°C, durante tres noches - dos días. Es de destacar que el material durante el proceso de secado se caracterizó por presentar un olor desagradable (parecido al mal olor que producen los pies).

²⁷ Inventario de Flora y Fauna del CENTRO DE INVESTIGACIONES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL "LA TRIBUNA" Convenio Hocol - Usco - Fase II

El material vegetal seco de la *Gustavia nana* Pittier, representado en la corteza pesó 256.2 g., ésta se llevó al molino eléctrico para ser triturado y cortado en pedacitos muy pequeños, los que posteriormente se utilizaron en el proceso de extracción (ver figura 5).

7.5 EXTRACCIÓN

Para realizar el proceso se utilizó el Soxhlet, que permitió obtener el extracto de la corteza. El Soxhlet está integrado por un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz. El condensador está provisto de una chaqueta de 100 mm de longitud, con espigas para la entrada y la salida del agua de enfriamiento. El extractor tiene una capacidad hasta la superficie del sifón, de 10 ml; el matraz utilizado es de 500 ml de capacidad. Este montaje con el material seco, se coloca en la estufa a una temperatura de 30°C (figura 10) durante 24 horas.

Figura 10. Montaje para la extracción



Fuente: Grupo de Trabajo

El solvente utilizado para realizar la extracción fue diclorometano (CH_2Cl_2), debido a su bajo punto de ebullición éste se evapora con facilidad permitiendo obtener el extracto. Posteriormente, se desconectó la estufa, se desmontó el aparato, se sacó el extracto y se dejó enfriar.

Luego, se colocó el extracto en el rotavapor para concentrarlo, a éste no se le dio vacío debido a que contiene diclorometano y éste en el rotavapor es altamente explosivo (figura 11). Después de concentrar, procedimiento que se conoce con el nombre de floculación y tiene una duración de aproximadamente 1 día, se dejó el

extracto en un frasco de compota que fue previamente lavado, secado y pesado (88.1067 g.), hasta que se evaporó totalmente el solvente.

Figura 11. Montaje para concentrar el extracto



Fuente: Grupo de trabajo

Después del proceso de floculación se bajó el balón del rotavapor y lo que estaba adherido en las paredes del balón era de muy baja polaridad, lo que se disolvió era de mediana y alta polaridad. A medida que se enfrió se fue formando un precipitado y lo que quedó adherido al balón se disolvió con éter de petróleo, lo que quedó se guardó en un frasco pesado previamente, se dejó secar al ambiente y se pesó nuevamente.

Luego de dejarse enfriar se filtró para que el sólido se separara (figura 12). Cuando se obtuvo el extracto filtrado, éste se volvió a colocar en el rotavapor y se sacó el solvente que en este caso es la acetona, con el fin de dejar sólo el extracto.

Figura 12. Montaje para la filtración del extracto.



Fuente: Grupo de Trabajo

Luego con la pipeta se sacó el extracto, se dejó en un frasco previamente pesado y se dejó evaporar, finalmente se pesó. El extracto quedó listo para realizar cromatografía y observar sus componentes; en este orden se siguió el procedimiento requerido para correr la primera placa en benceno-acetona 9:1 (relación muy cercana al cloroformo), se sacó de la cámara (figura 13) y se miró al ultravioleta (U.V.) (figura 14), se revelaron puntos fluorescentes de distintos colores (figura 15), se aplicó el revelador vainillina en la cabina con la ayuda de un compresor, luego se reveló la placa en la estufa (figura 16).

Figura 13. Cámara reveladora



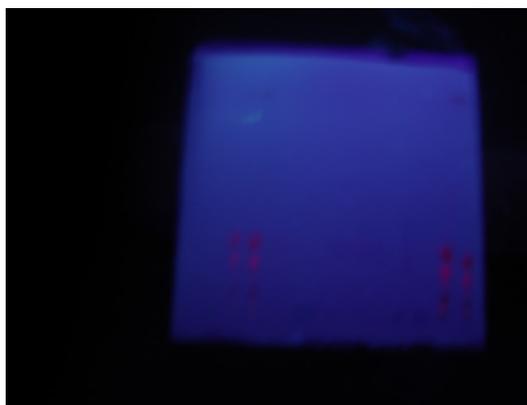
Fuente: Grupo de trabajo

Figura 14. Aparato con filtro u.v



Fuente: Grupo de trabajo

Figura 15. Vista de la placa al U.V.



Fuente: Grupo de trabajo

Figura 16. Revelado en la estufa



Fuente: Grupo de trabajo

Luego se realizó el mismo procedimiento y se corrió una placa éter-acetona 8:2 (figura 17).

Figura 17. Placa cromatográfica revelada



Fuente: Grupo de trabajo

Se tomó un poco del extracto y se le adicionó etanol, dejándolo evaporar hasta el día siguiente.

Los procedimientos se realizaron con el fin de quitar las grasas del extracto, aunque quedaron pero en menor proporción.

En la placa el color morado indicó que eran sustancias de alta polaridad afines con el solvente utilizado, los de la mitad eran de mediana polaridad y los últimos (amarillos) de baja polaridad. Se colocaron dos montajes en rotavapor con el fin de destilar el etanol a utilizar en los procedimientos, esto tardo un día completo.

Se le adicionó con una pipeta éter-acetona 9:5-0.5 al frasco que contenía el extracto, luego se colocó en la campana al vacío (figura 18) para que se secase totalmente y de esta manera trabajar una sustancia con calidad.

Figura 18. Campana de vacío



Fuente: Grupo de trabajo

7.6 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Para el aislamiento e identificación de compuestos presentes en la corteza de la *Gustavia nana Pittier*, se emplearon fundamentalmente técnicas de separación y purificación cromatográfica en columna y en placa preparativa, empleando como soporte Sílica gel. La cromatografía se preparó previamente como se muestra en la figura 19.

Figura 19. Montaje de la columna cromatográfica



Fuente: Grupo de trabajo

1. El solvente que se utilizó para la cromatografía fue Éter – Acetona. 180ml de éter y se completó con 20 ml de acetona hasta completar 200ml, relación 9:1.
2. Se le adicionó 100 g de silica gel, evitando que se hicieran burbujas.
3. Se golpeó con un tapón de caucho para que se fuera sedimentando bien.
4. Para este tipo de cromatografía se dejó correr; es decir, se abrió la llave de la columna para que bajara el solvente, lo que permitió seguir con la adición del solvente recogido.
5. A la columna se le adicionó el extracto de peso 3.7705 g con una pipeta, después de haber dejado correr hasta que el solvente quedara a 1cm de la silica gel (fraccionamiento liquido -liquido) (figuras 20,21).

Figura 20. Inicio de la Cromatografía



Fuente: Grupo de trabajo

Figura 21. Corrimiento de la columna



Fuente: Grupo de trabajo

Nota: La columna se llenó con el solvente, se colocó un colector con un frasco que contenía solvente, éste tenía que pasar por el tubo que iba conectado a la columna cuando el solvente ascendió, el extracto bajó y se empezaron a tomar muestras en los tubos de ensayo, las cuales quedaron bien tapadas (se utilizó papel aluminio que posibilitó que estos quedaran cerrados herméticamente) (figura 22).

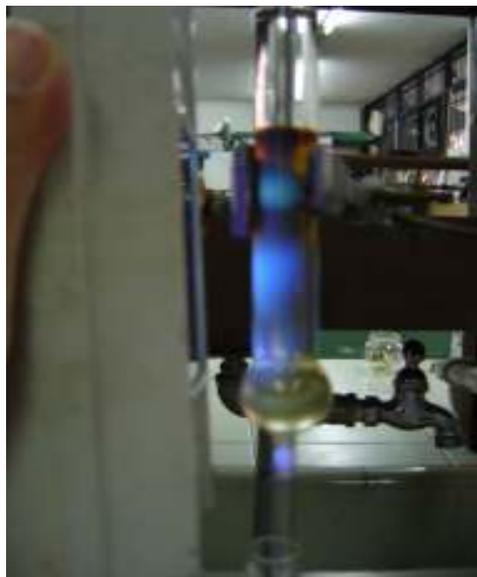
Figura 22. Toma de muestras en Columna



Fuente: Grupo de trabajo

La columna tenía que quedar solo con el solvente transparente hasta que salieran todas las fracciones del extracto. Cuando se pasó el ultravioleta (UV) por la columna se observaron fracciones de carotenos (color amarillo) y clorofilas (color rojo); sin embargo, en la parte superior se observó una fracción más grande de color morado, la fracción que se tenía que identificar (figura 23).

Figura 23. Cromatografía en columna vista al U.V.



Fuente: Grupo de trabajo

De la columna cromatográfica se sacaron 18 fracciones en tubos de ensayo; como este proceso fue dispendioso requirió de 12 horas, por lo tanto se dejó

programado el aparato colector cada 15 minutos para recoger las fracciones. De estas se realizó una placa cromatográfica en silica gel con el objetivo de juntar lo igual y tratar de separar lo que estaba solo (Figura 24).

Figura 24. Aparato colector de fracciones.



Fuente: Grupo de trabajo

La cromatografía se realizó con las primeras nueve (9) fracciones de la columna. (Como se observa en la figura 25.)

Figura 25. Fracciones en tubos de ensayo



Fuente: Grupo de trabajo

Se procedió a preparar la cámara cromatográfica la cual contenía 5ml de cloroformo. Dicha placa se reveló con Vanillina (0.5%) /H₂SO₄:H₂O (1:1)

Se encontró que al correr la placa en cloroformo y al observar en la cámara ultravioleta (UV) colores verdes, rojos y en la parte superior tres puntos de color morado (figura 26).

Figura 26. Placa cromatográfica



Fuente: Grupo de Trabajo

Con las otras nueve (9) fracciones se realizó cromatografía en capa delgada o de silica gel. La placa se corrió con cloroformo acetona 9:1. 4.5 de cloroformo y 0.5 acetona.

La cromatografía de este tipo se realizó para reunir las fracciones que resultaban iguales, y así poder observar las fracciones que quedaban solas para poderlas separar.

Al unir dichas fracciones se paso a trabajar con 12 de ellas a las que se les realizó cromatografía en capa delgada o de silica gel y se corrió la placa con diclorometano 5 ml. De estas 12 fracciones solo se trabajaron 10.

Como cada fracción se encontraba en frascos numerados del 1 al 10. De los cuales se unieron los frascos que tenían la numeración 5-6, 7-8, 9-10.

Se pesaron tres Erlenmeyer y se marcaron como **a**, **b**, **c**.

a: 32.2510

b: 49.0020

c: 91.5904

Luego se puso a secar en baño maría las fracciones, como se observa en la Figura 27.

Figura 27. Baño María

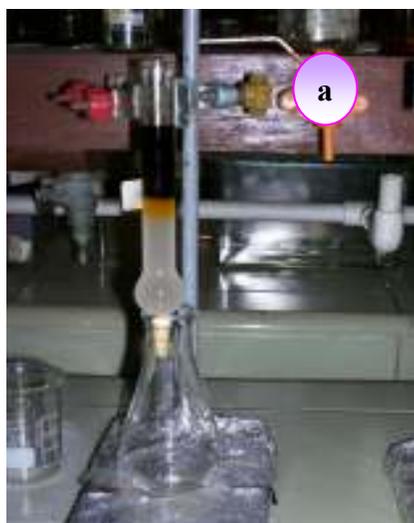


Fuente: Grupo de trabajo

Nota: Estas fracciones se obtuvieron de la cromatografía en columna realizada por primera vez.

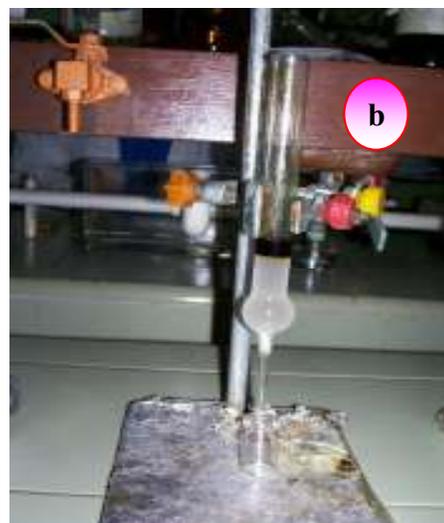
Para cada una de las fracciones a, b, c, se preparó una cromatografía en columna (figuras 28,29).

Figura 28. Cromatografía en columna de la fracción a



Fuente: Grupo de trabajo

Figura 29. Cromatografía en columna de la fracción b



Fuente: Grupo de trabajo

La Columna **a** se corrió con Diclorometano y metanol anhidro 99.9% en diferentes concentraciones, inicialmente 9.8:0.2 ml; luego 9.5: 0.5ml; 9:0 – 1.0 ml; hasta 8.0: 0.2 ml, respectivamente, disminuyendo el dicloro y aumentando la cantidad de metanol, esto para separar la parte más polar de la no polar. Posteriormente, para correr la columna se sacaron fracciones en frascos previamente pesados y secados. De este proceso quedaron como producto 50 frascos que se unieron con las fracciones que eran iguales, las fracciones que quedaron se unieron, para ello se realizó cromatografía en silica gel, de modo que al revelar la placa los puntos que corrieron iguales se unieron, quedaron 9 fracciones (figura 30).

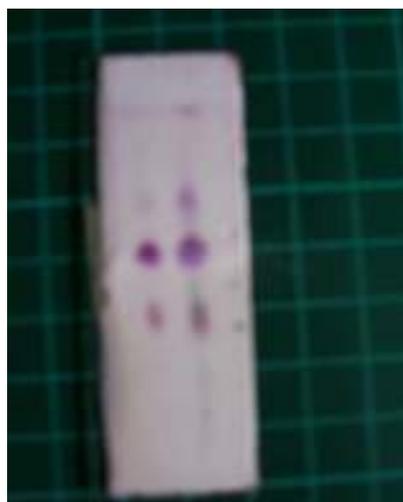
Figura 30. Fracciones del extracto.



Fuente: Grupo de trabajo

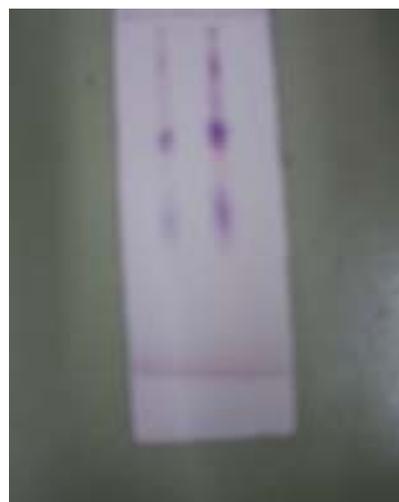
Las cromatografías realizadas en total fueron 10 en placas grandes, al revisar los frascos y los resultados de las cromatografías previamente elaboradas se unieron las tres primeras fracciones, realizando nuevamente cromatografía en silica gel de las muestras 3a y 6a (figura 31), luego estas fracciones se dejaron, de un día para otro, en los frascos tapados con papel aluminio perforado con el fin de obtener el extracto puro; se revisaron los frascos al día siguiente, se encontró en el frasco 6a un pequeño sedimento de color verde oscuro al cual se le realizó cromatografía en silica gel (figura 32) para evaluar los resultados.

Figura 31. Fracción 3a y 6a del extracto



Fuente: Grupo de trabajo

Figura 32. Fracción 6a del extracto



Fuente: Grupo de trabajo

La Columna **b** al igual que la **a** se corrió con diclorometano y metanol anhidro 99.9% en diferentes concentraciones, inicialmente 9.8:0.2 ml; luego 9.5:0.5ml; 9:1 ml; hasta 8:2 ml respectivamente disminuyendo el dicloro y aumentando en la cantidad de metanol, esto para separar la parte más polar de la no polar.

Posteriormente se corrió la columna se sacaron fracciones en frascos previamente pesados y secados. De este proceso quedaron como producto 41 frascos que se unieron con las fracciones que eran iguales, las fracciones que quedaron se unieron posteriormente, para ello se realizó cromatografía en silica gel (figura 33) de modo que al revelar la placa los puntos que corrieron igual se unieron; quedaron 7 fracciones, las cromatografías realizadas en total fueron 8, luego estas fracciones se dejaron en los frascos dentro de la campana de vacío (figura 34) con el fin de que el solvente se evaporara con más facilidad, situación que agilizó el proceso.

Figura 33. Cromatografía en silica gel para unir fracciones iguales



Fuente: Grupo de trabajo

Figura 34. Campana de vacío



Fuente: Grupo de trabajo

Para la fracción **c**, se disolvió en metanol anhidro 99.9% para separar la parte más polar de la no polar, por su contenido amplio de grasa y haber flocculado mucho se filtra como se observa a continuación (figura 35).

Figura 35. Filtrado de la fracción **c**



Fuente: Grupo de trabajo

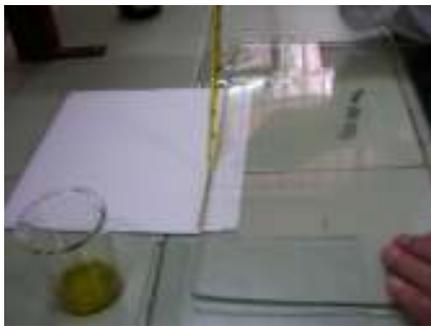
Lo que se observó en la parte superior de color verde se disolvió con diclorometano para la cromatografía en columna, y la parte inferior, de color amarillo, se guardó en un frasco.

Cuando ya se hubo filtrado con metanol, se pesó de nuevo en un erlenmeyer (91.5889) y dicho extracto se dejó precipitar.

Se realizó cromatografía en columna para esta fracción, se corrió con éter acetona 9.5:05.

El filtrado se utilizó para correr la cromatografía y el precipitado se disolvió en cloroformo y se dejó secar en baño maría. (Lo mejor es dejarlo secar en el ambiente) para luego ser utilizado en una placa preparativa. (Figuras 36, 37)

Figuras 36 y 37. Siembra en la placa preparativa



Fuente: Grupo de trabajo

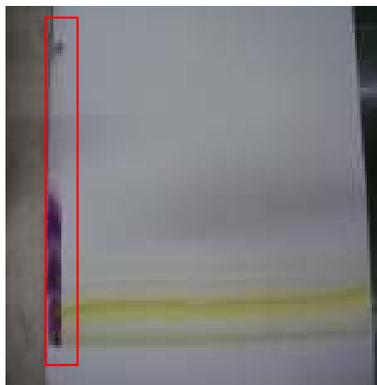


Fuente: Grupo de trabajo

La placa preparativa se dejó correr tres veces en una cámara que contenía cloroformo para que los compuestos se observaran mejor y se lograran separar.

Luego que se pasaron las tres veces en la cámara, se reveló solamente un borde para observar en donde estaban los compuestos (figura 38)

Figura 38. Revelado de una parte de la placa preparativa.



Fuente: Grupo de trabajo

En este revelado se observó separado un compuesto que es el que se detalló en la parte superior de la placa, éste se cree podría tratarse de un terpeno.

Después se reveló la placa y se observó en la cámara ultravioleta (UV), se separaron mediante una línea cada uno de los colores con el propósito de realizar un raspado. (Figura 39).

Figura 39. Raspado de la placa preparativa

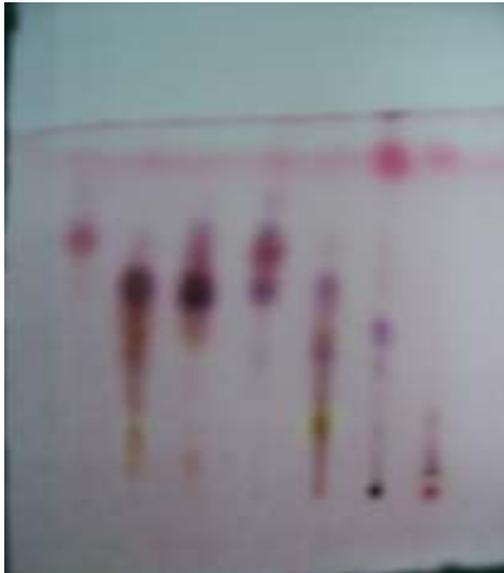


Fuente: Grupo de trabajo

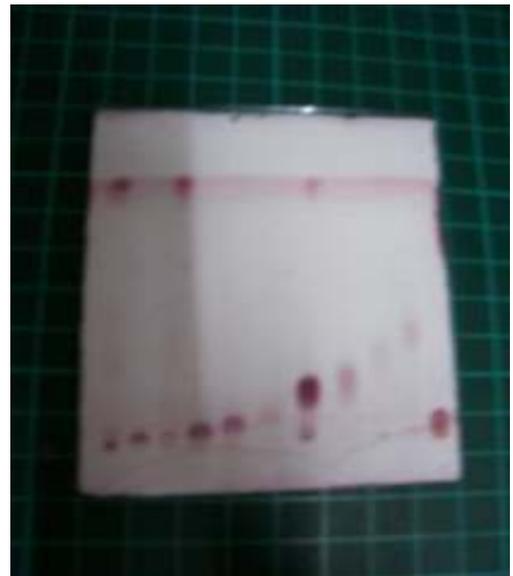
Cuando se realizó el raspado se pasó a filtrar para separar los compuestos, se adicionaron 15ml acetona de 5 en 5, hasta completar los sugeridos, se guardó el precipitado.

Se concentraron en el rotavapor los extractos encontrados en la placa preparativa y se realizó cromatografía en silica gel (figuras 40, 41, 42 y 43) lo que arrojó resultados excelentes, se identificaron terpenos, lo que prueba la eficacia del proceso.

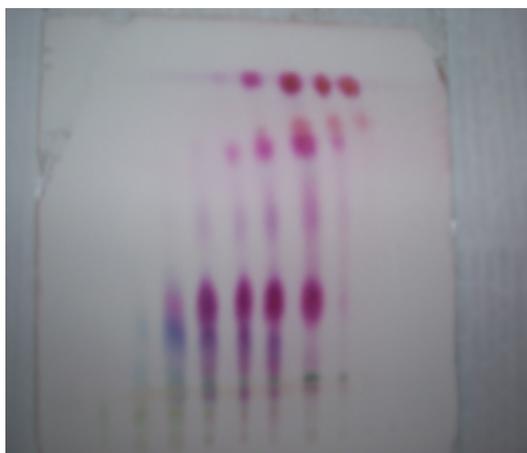
Figuras 40, 41, 42 y 43. Resultados de las cromatografías en silica gel de la placa preparativa



Fuente: Grupo de trabajo



Fuente: Grupo de trabajo



Fuente: Grupo de trabajo



Fuente: Grupo de trabajo

Cuando se realizó la cromatografía en columna para cada una de las fracciones (a,b,c), por cada fracción se utilizaron frascos pequeños para coleccionar, a medida que se iba corriendo la columna se coleccionaron pequeñas porciones del extracto; cada frasco se encontraba debidamente lavado, secado en horno, pesado y con su respectiva numeración para la columna **a**, **b**, **c** ejemplo 1a, 2a, 3a; 1b, 2b, 3b; 1c, 2c, 3c y de esta manera con cada uno de los frascos de cada columna. Como productos finales de las columnas **a** y **c** se encontraron en los frascos numerados como **6a**, **6c** que al secarse el extracto en el 6a se observó un pequeño sedimento de color verde oscuro, en el 6c se formaron pequeños cristales al que se le realizo prueba cualitativa de Salkoski (figura 44); los resultados fueron positivos para triterpenos.

Figura 44. Prueba de salkoski



Fuente: Grupo de trabajo

La prueba se realizo así:

Se tomaron pocos cristales y se disolvieron en cloroformo, se le adicionaron 0.3 ml de H_2SO_4 , se mezclaron bien (ver anexo F). En el vidrio de reloj se observó que a medida que transcurría el tiempo dicha mezcla adquiriría un color amarillo, lo que daba indicios de la presencia de triterpenos.

También se realizaron pruebas cualitativas como Lieberman Burchard, para esteroides. Además, a cada porción se le halló el punto de fusión con ayuda del fusiómetro (figura 45), el aparato tenía espacio para ubicar dos muestras a la vez, en un capilar se colocó la fracción 6a y en otro capilar la fracción 6c, el punto de fusión se halló cuando la muestra empezó a fundirse, el aparato constaba de un termómetro en el cual se midió la temperatura de las muestras, arrojando los siguientes resultados:

Para **6a** 155-158 °C y para **6c** 191-192 °C.

Figura 45. Fusiómetro



Fuente: Grupo de trabajo

La muestra que quedó en los frascos se empacó en capilares, luego éstos se sellaron a calor, se empacaron en una cajita y se enviaron a la Universidad Tecnológica de Pereira para hacerles el espectro de masas.

El grupo de trabajo estaba conformado por el director del Grupo de Investigación GIFUJ de la Universidad Javeriana el Dr. Rubén Darío Torrenegra, los aspirantes a título de doctor, el profesor Oscar Rodríguez, Solangie Sánchez y Antonio Guzmán y las estudiantes Amalia Molina Chaux, Alicia Vargas Muñoz y Clara Patricia Montealegre (figura 46).

Figura 46. Grupo de trabajo.



Fuente: Grupo de trabajo

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

- Los resultados de los Rf de las placas cromatográficas fueron los siguientes:

$$R_f = 7 \text{ cm} / 9.5 \text{ cm} = 0.736 \text{ cm}$$

$$R_f = 6.5 \text{ cm} / 7.5 \text{ cm} = 0.866 \text{ cm}$$

En los resultados obtenidos los Rf están cerca de uno, lo que permite evidenciar que las sustancias son muy solubles en el líquido (solvente), en este caso el diclorometano utilizado para realizar la extracción de las sustancias y para correr algunas placas cromatográficas.

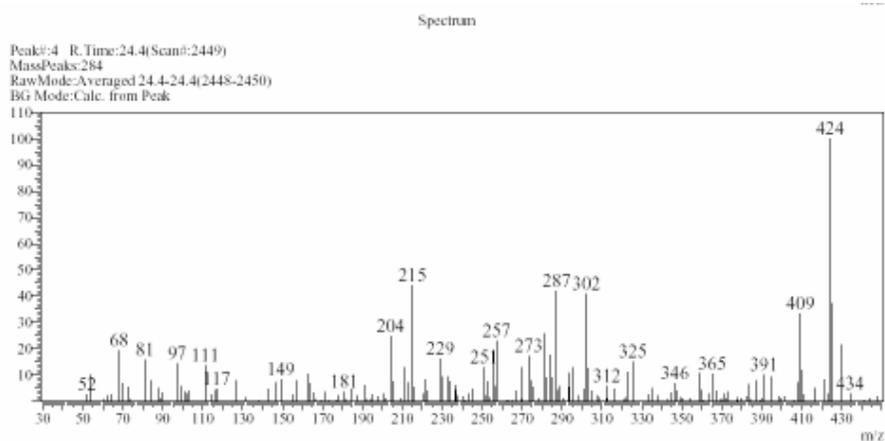
- El análisis cromatográfico de la *Gustavia nana Pittier*, se llevó a cabo mediante columna cromatográfica, cromatografía en capa delgada y placa preparativa, mediante las cuales se lograron caracterizar y separar tres sustancias (alpha amiryn, stigmasta - 5, 23-dien- 3-beta-ol y uvaol) por la comparación de sus datos espectrales con sustancias patrón o datos de literatura.
- Las pruebas cualitativas que muestran un resultado positivo para terpenos y esteroides fueron la reacción de Liebermann – Burchard y reacción de Salkowski.
- La determinación del punto de fusión para las muestras son respectivamente (6a 155-158 °C) y (6c 191-192 °C) determinadas en un equipo electrotérmico VA 9000 con el empleo de capilares.

8.1 RESULTADOS DE LOS ESPECTROS DE GASES, MASAS Y SIMULACIÓN DE RESONANCIA MAGNÉTICA

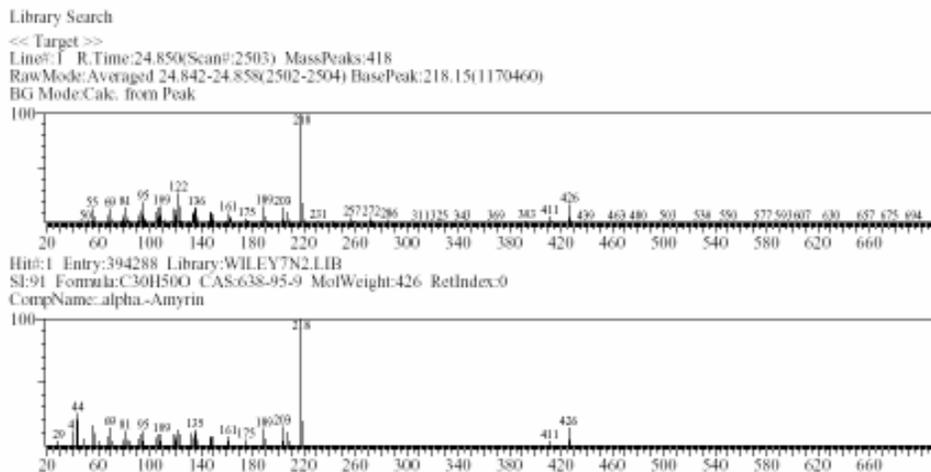
De la especie *Gustavia nana pittier* se aislaron varios compuestos desconocidos, entre ellos dos triterpenos (Alpha Amyrin – Uvaol), y un esteroide (Stigmasta-5,23-dien-3-beta-ol).

Las estructuras se determinaron basadas en sus datos espectroscópicos.

8.1.1 ESPECTRO DE MASAS DE ALPHA AMYRIN

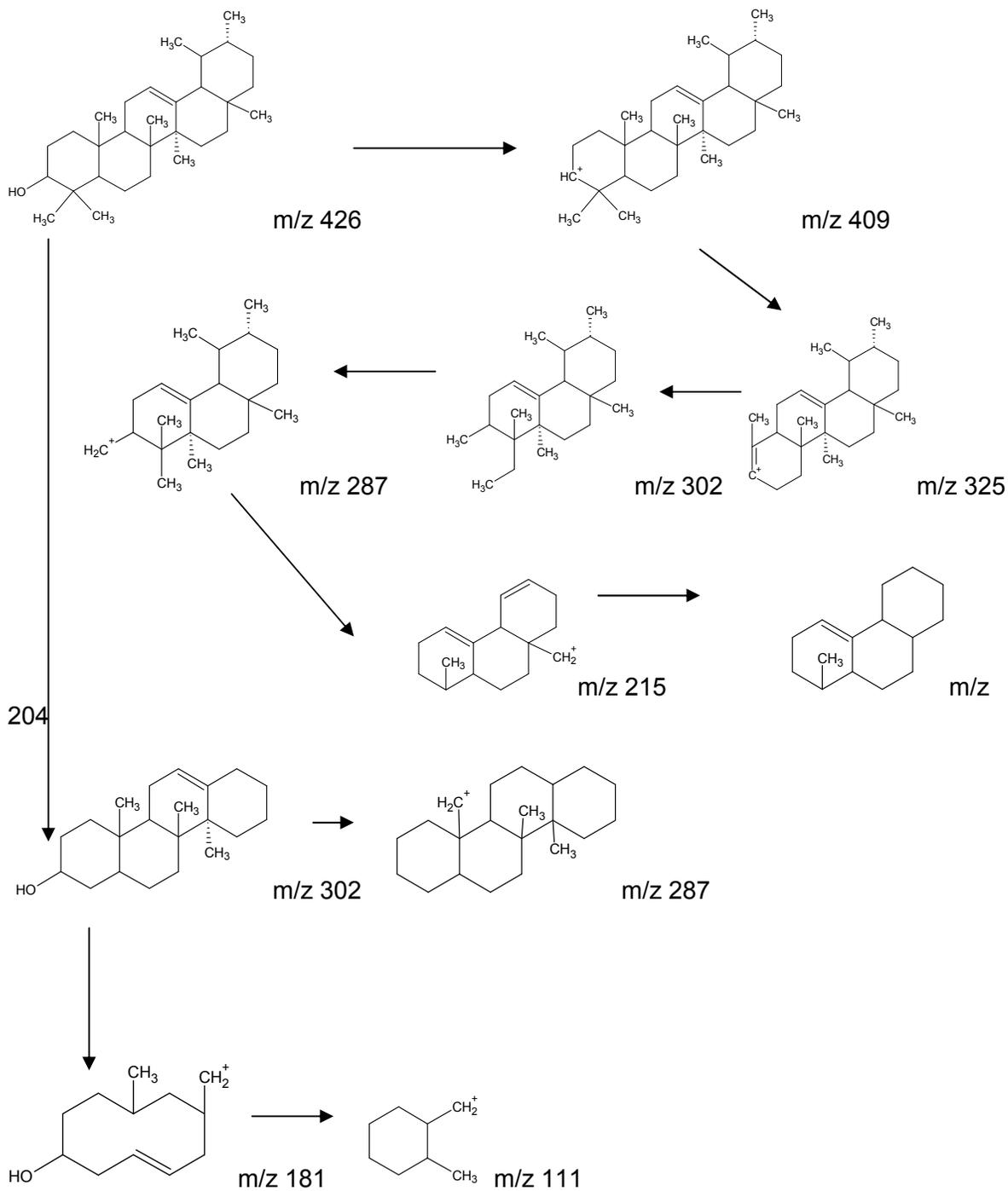


ALPHA AMYRIN

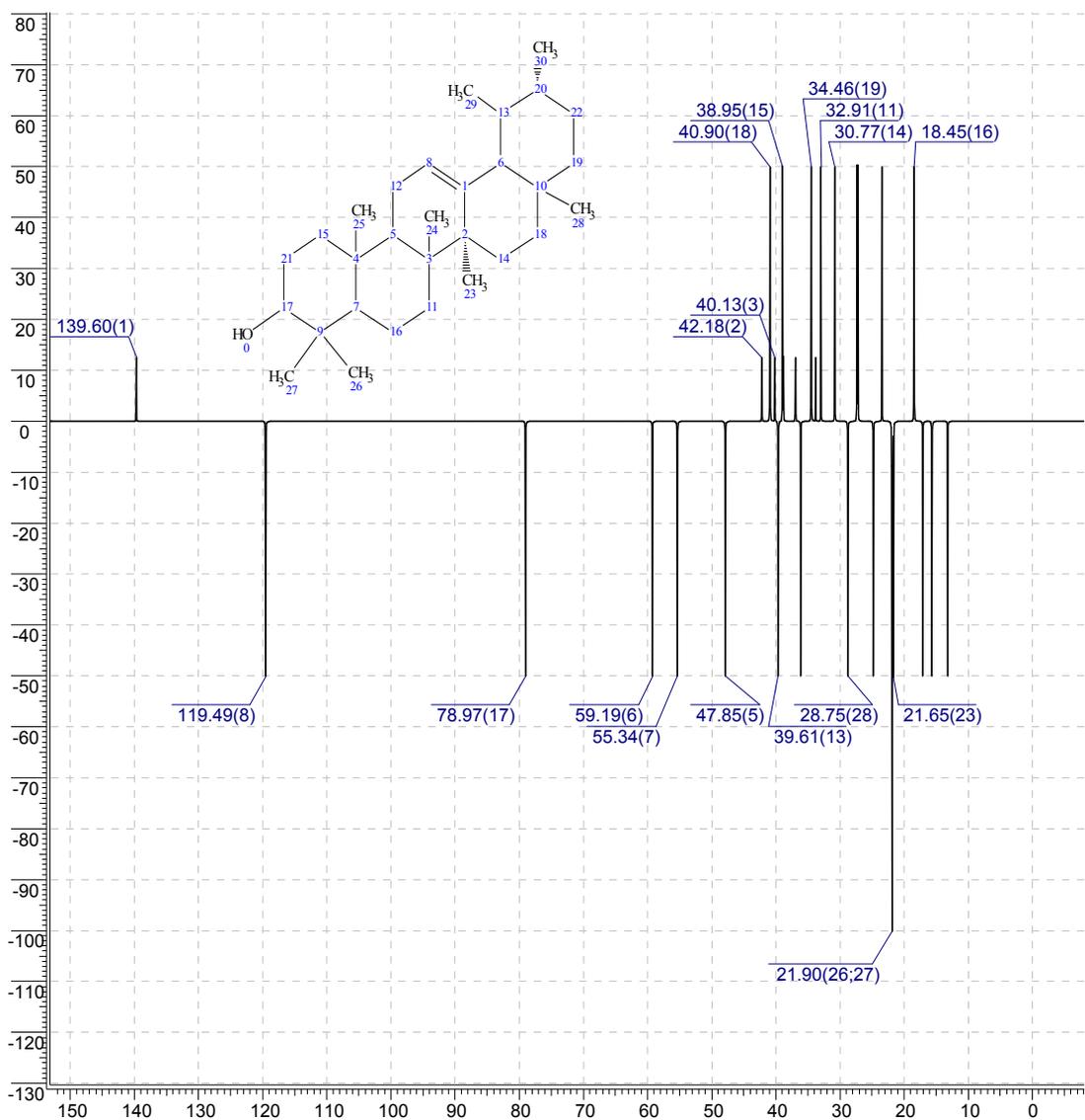


MS, m/z 426 (M⁺), 218, 203, 189, 175, 161, 135, 95, 69

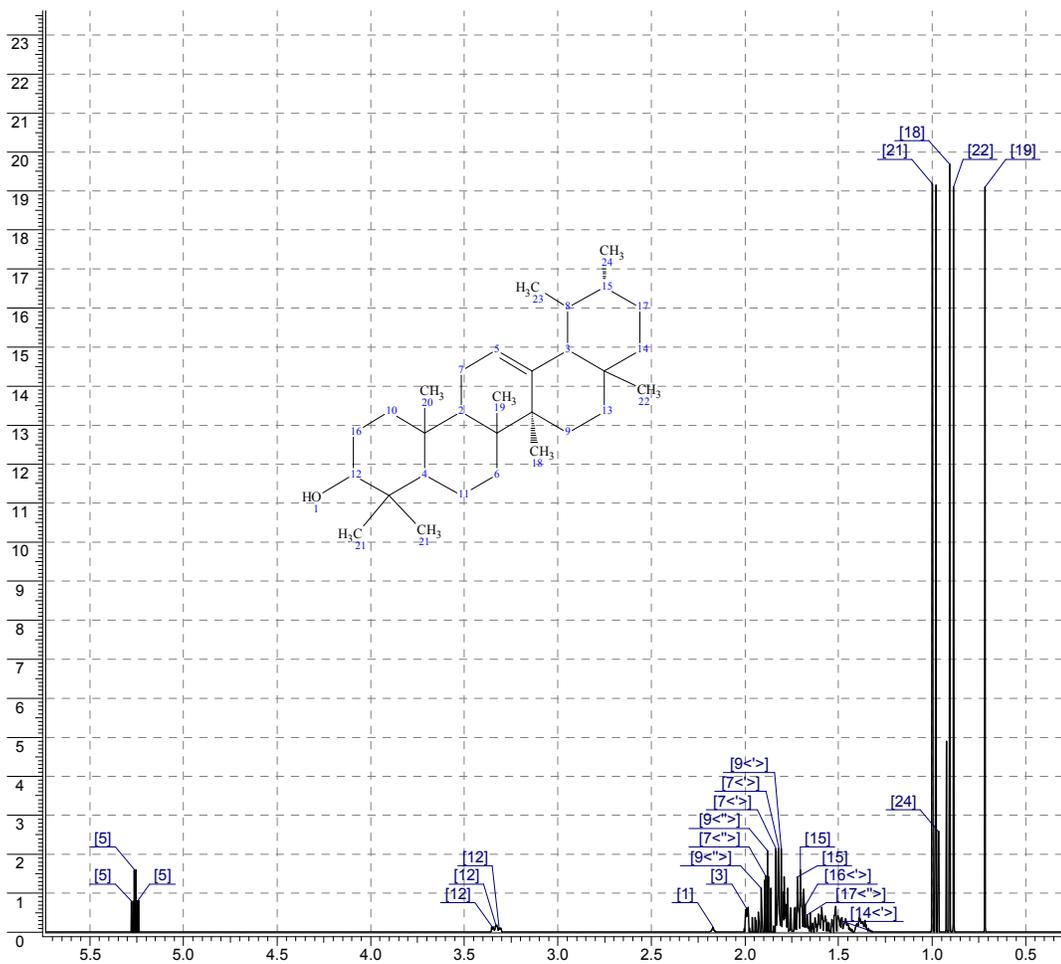
8.1.2 ESTRUCTURA Y FRAGMENTACIÓN DEL ALPHA AMYRIN



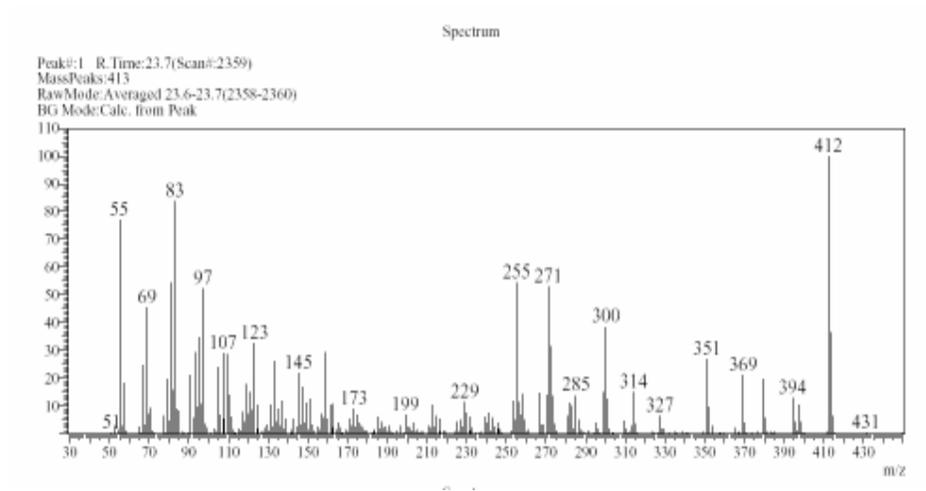
8.1.3 ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE C13 JMOD DE ALPHA AMYRIN



8.1.4 ESPECTRO DE RESONANCIA DE HIDRÓGENO DE ALPHA AMYRIN



8.2 ESPECTRO DE MASAS DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL



STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL

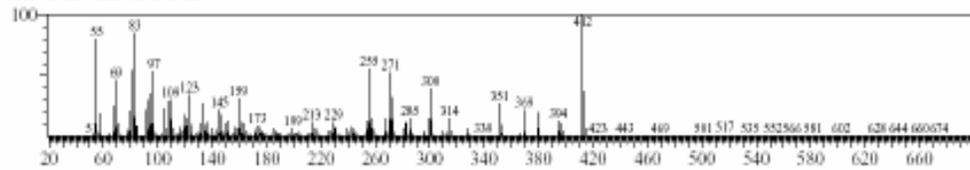
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:23.650(Scan#:2359) MassPeaks:410

RawMode:Averaged 23.642-23.658(2358-2360) BasePeak:412.35(84196)

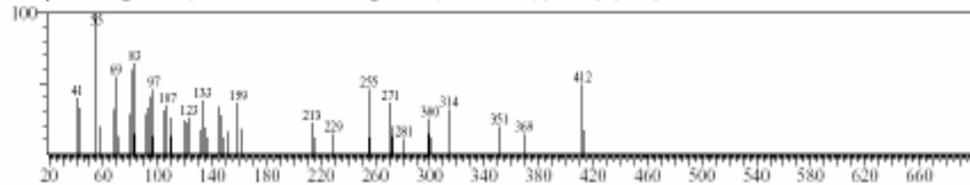
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:387004 Library:WILEY7N2.LIB

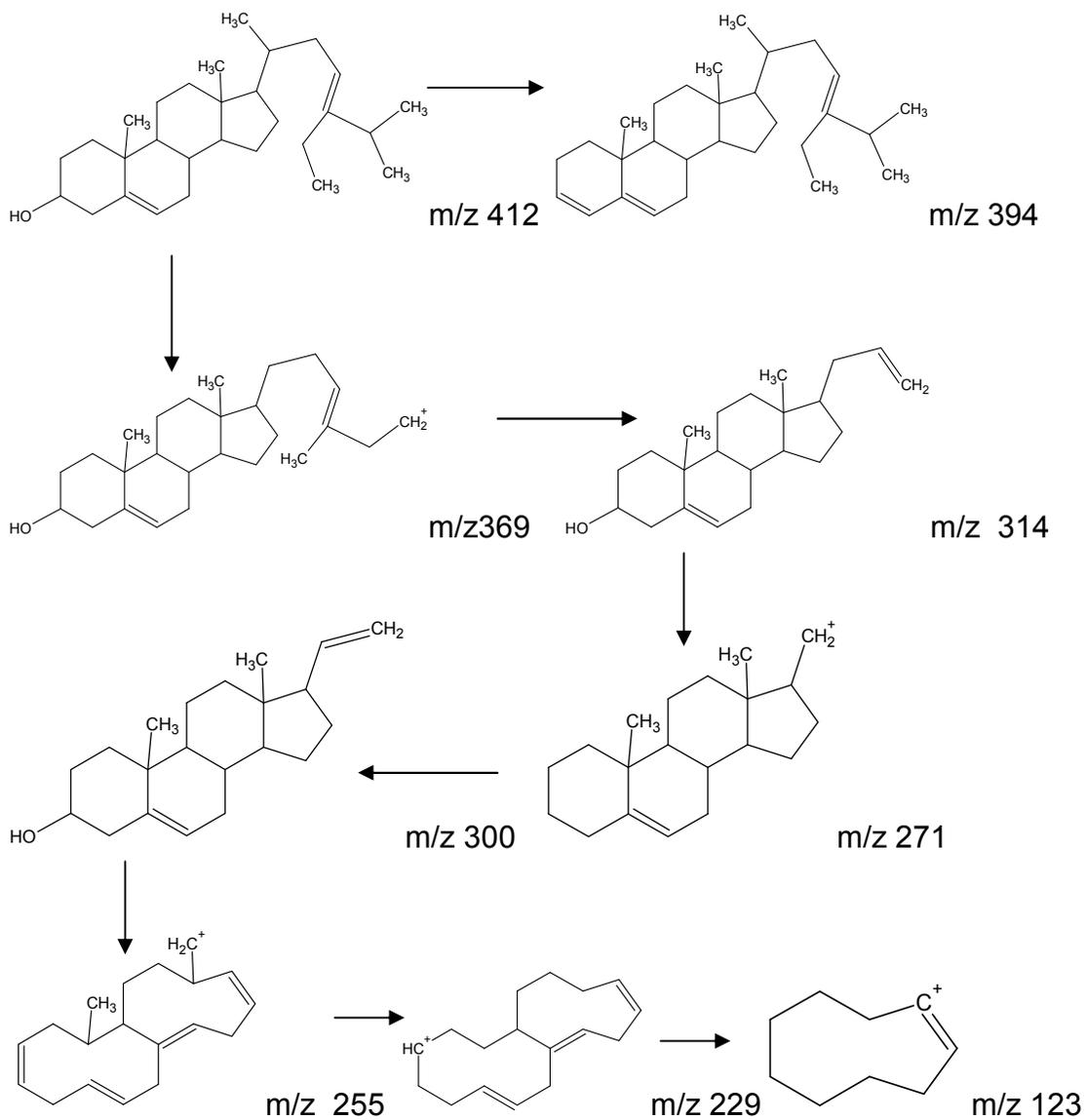
SI:86 Formula:C₂₉H₄₈O CAS:38485-29-9 MolWeight:412 RefIndex:0

CompName:Stigmasta-5,23-dien-3.beta.-ol 55 Stigmasta-5,23-dien-3-ol, (3.beta.)- (CAS)

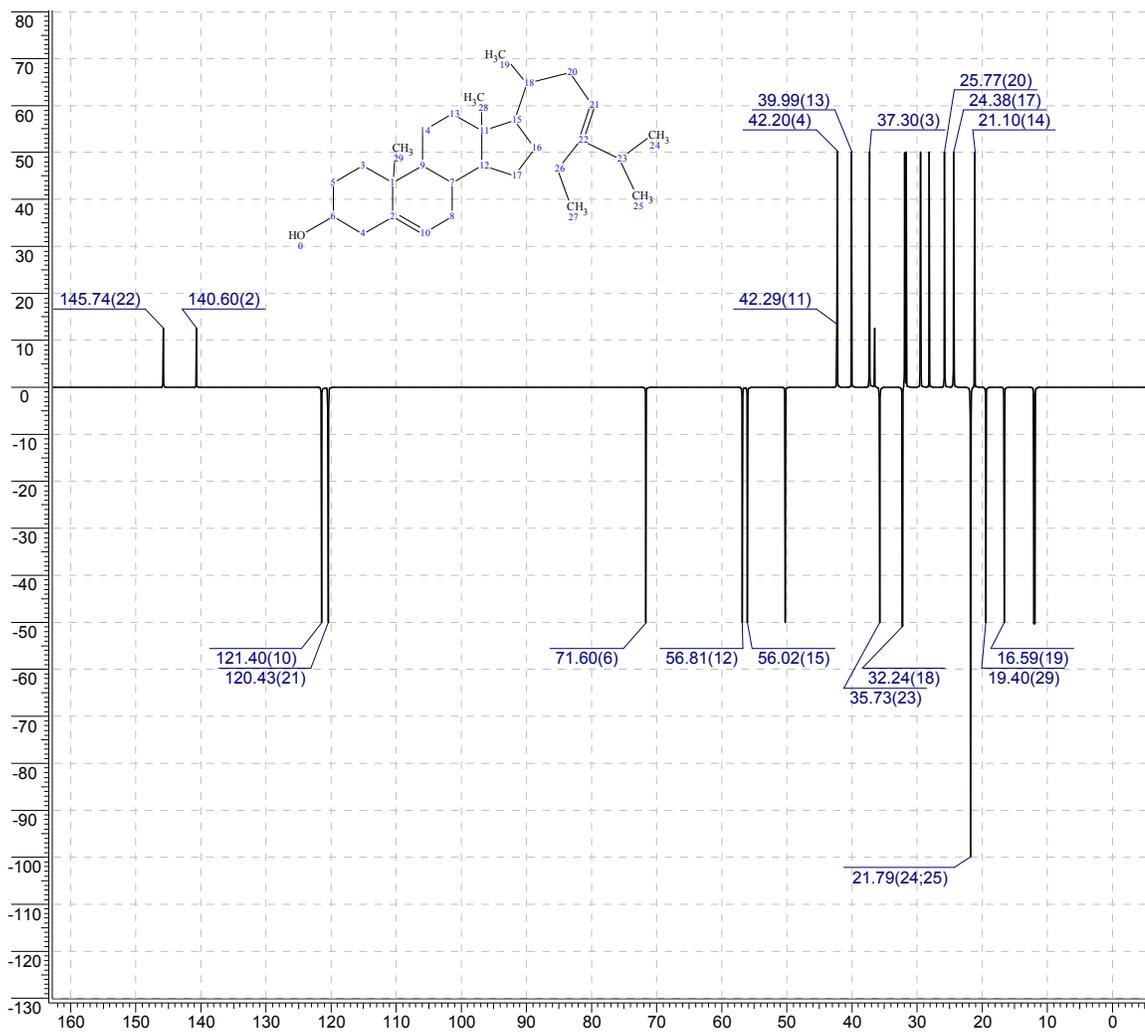


MS, m/z 412 (M⁺), 394, 369, 351, 300, 271, 255, 213, 83, 69

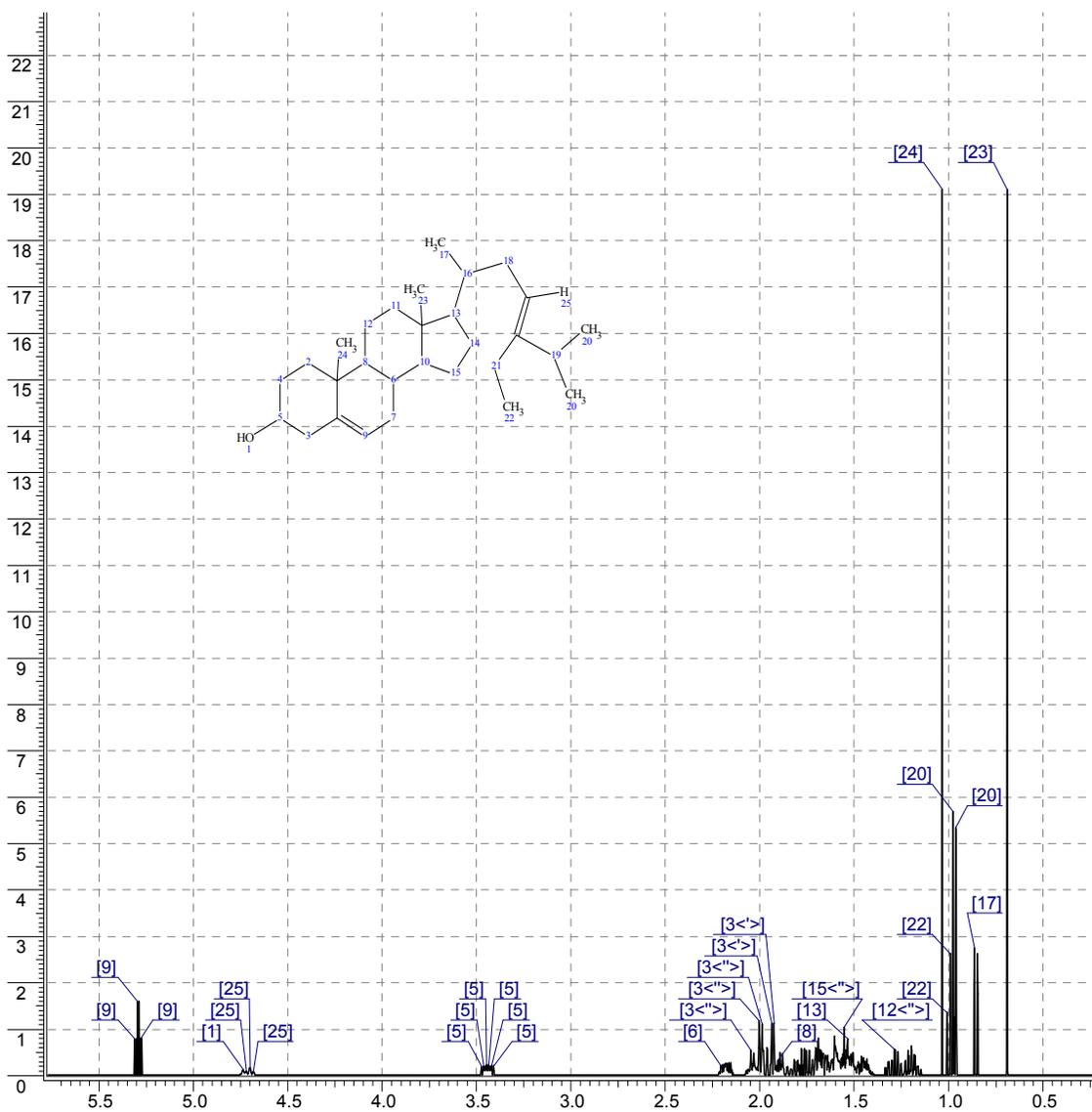
8.2.1 ESTRUCTURA Y FRAGMENTACIÓN DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL



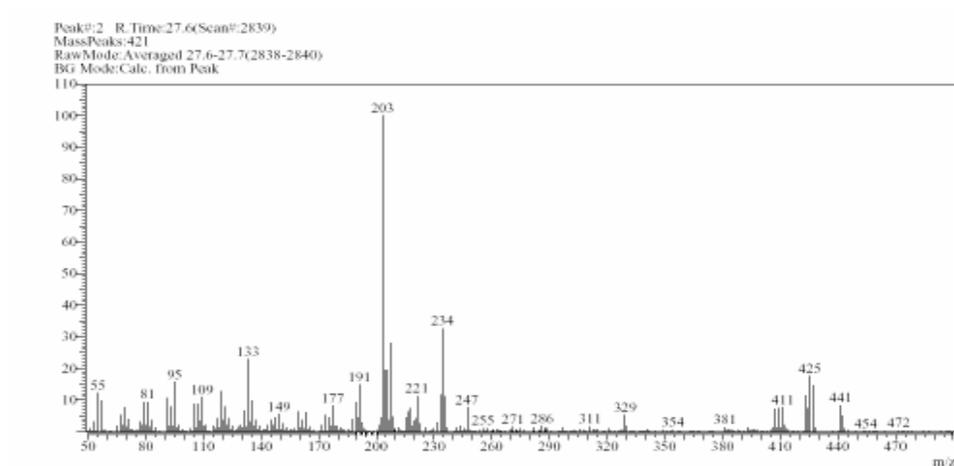
8.2.2 ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE C13 JMOD DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL



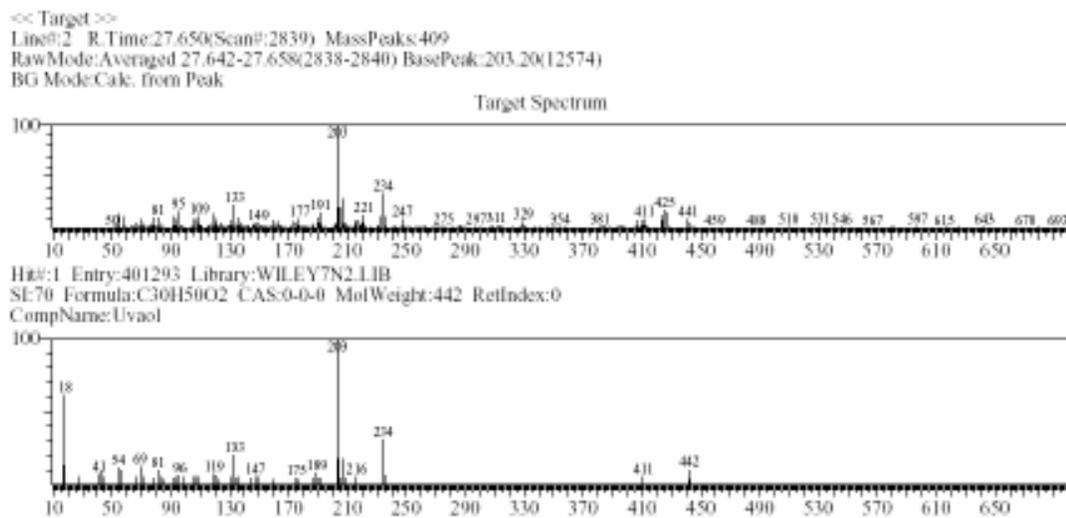
8.2.3 ESPECTRO DE RESONANCIA DE HIDRÓGENO DE STIGMASTA-5,23-DIEN-3-BETA-OL



8.3 ESPECTRO DE MASAS DE UVAOL

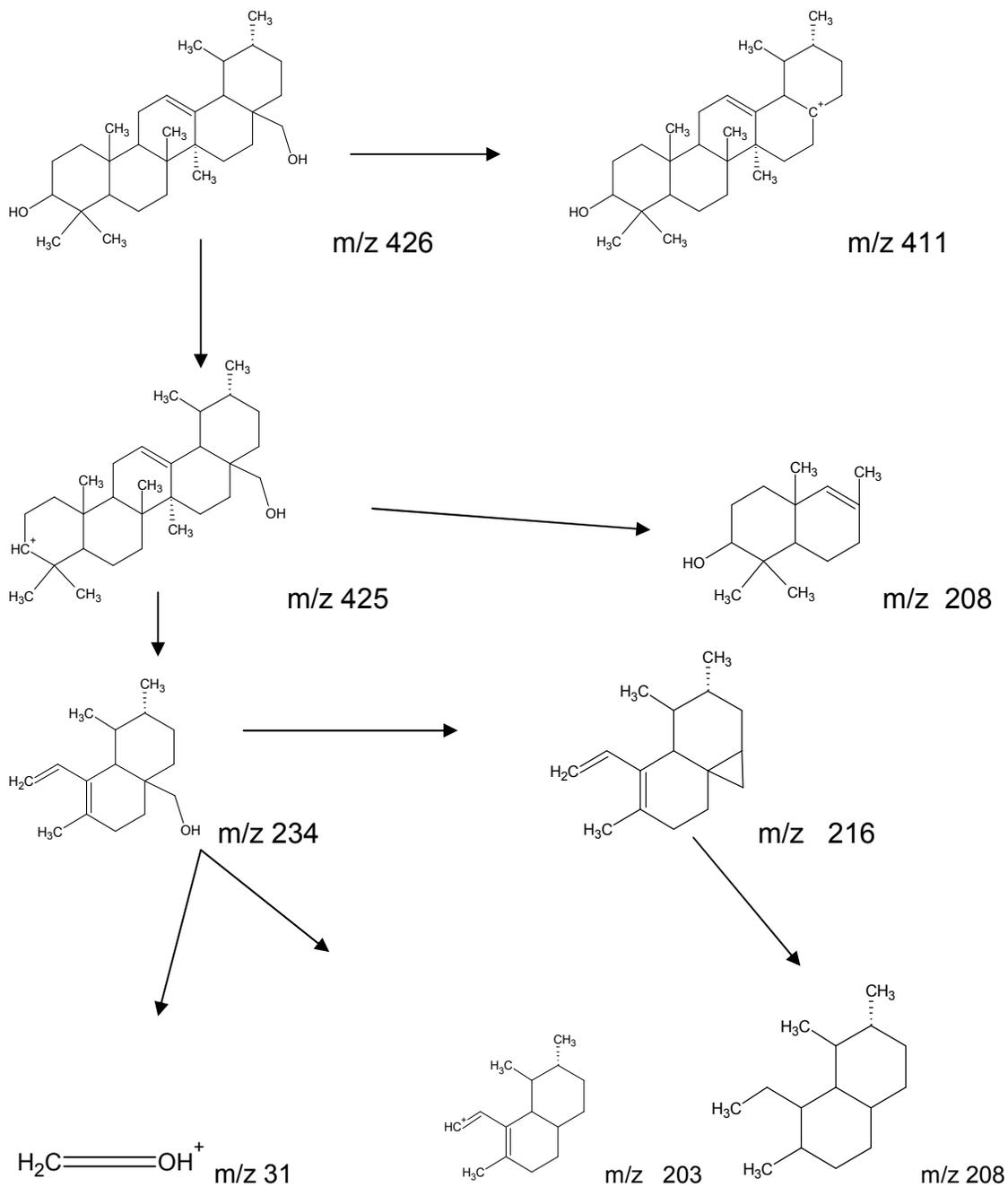


UVAOL

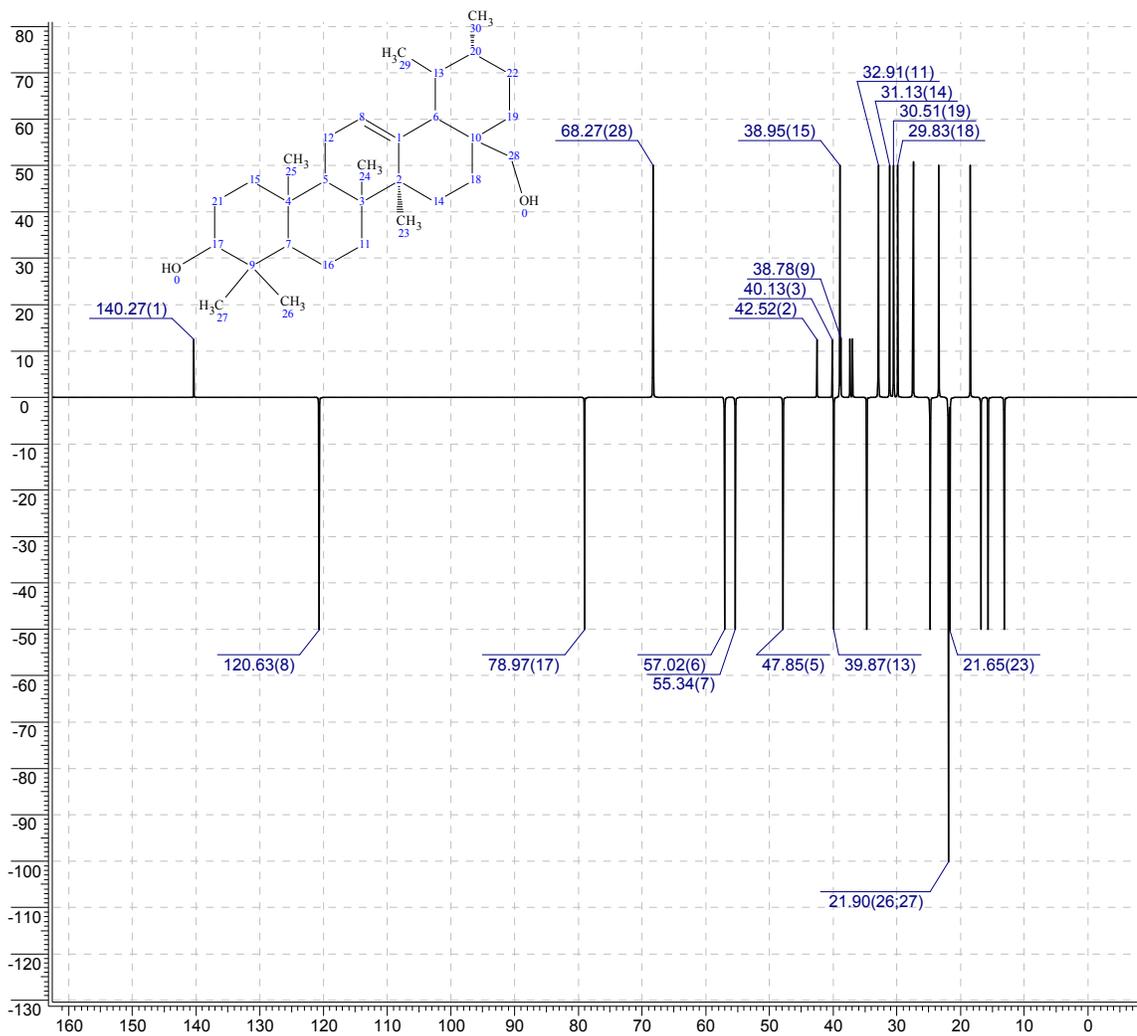


MS, m/z 442 (M⁺), 411, 234, 204, 203, 133, 119, 107, 105, 95, 81, 69, 55

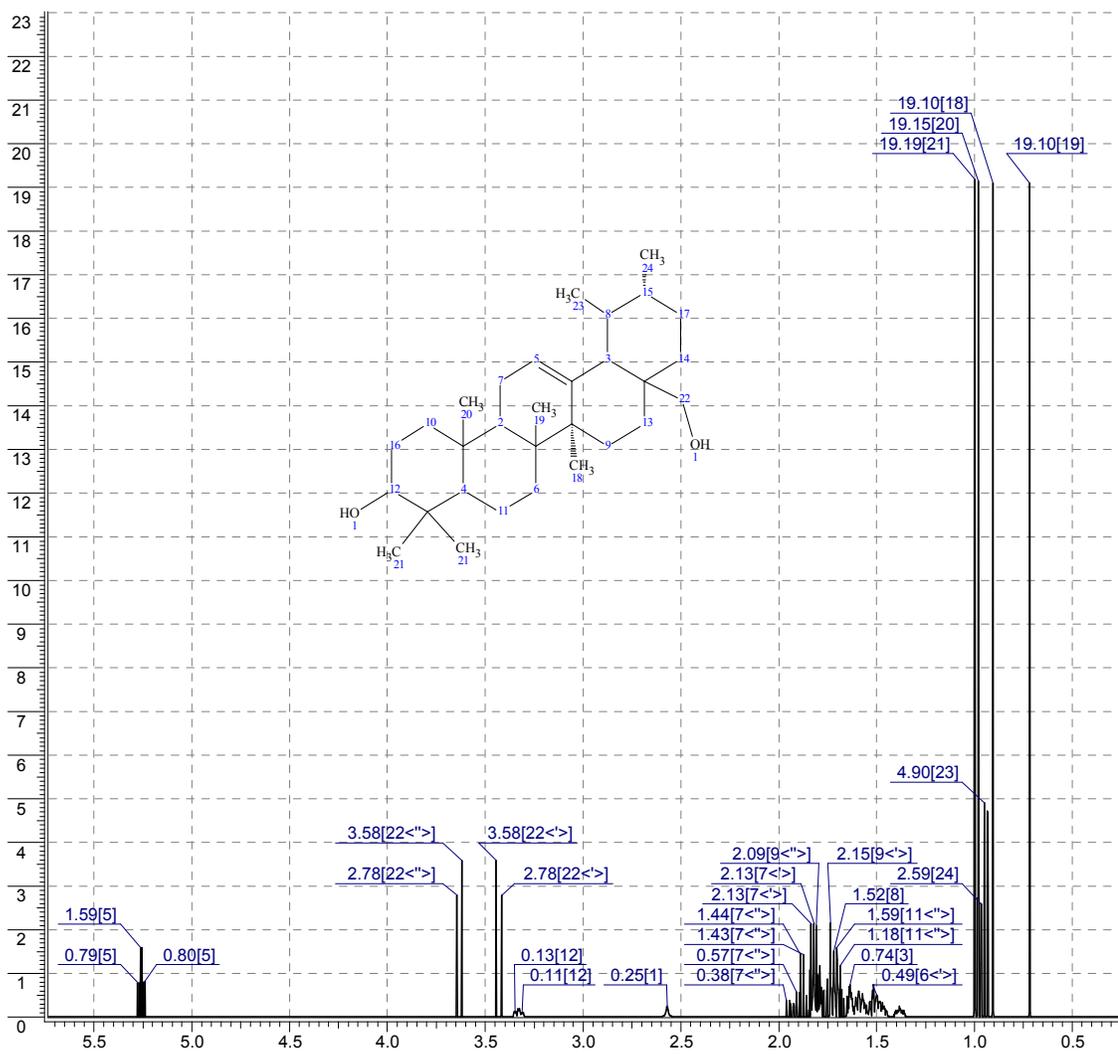
8.3.1 ESTRUCTURA Y FRAGMENTACIÓN DE UVAOL



8.3.2 ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE C13 JMOD DE UVAOL



8.3.3 ESPECTRO DE RESONANCIA DE HIDRÓGENO DE UVAOL



Espectro de resonancia de hidrógeno de las tres sustancias encontradas en la *Gustavia nana Pittier*

Es un espectro simulador, el cual permite identificar el número de hidrógenos que están sobre el carbono, el cual se encuentra encerrado entre paréntesis. A cada número de la estructura (de color azul) le corresponde la posición del pico en la gráfica.

De la especie *Gustavia nana pittier* se aislaron varios compuestos desconocidos, entre ellos dos triterpenos (Amyrin – Uvaol), y un esteroide (Estigmasterol).

8.4 Aplicaciones de las sustancias encontradas en la corteza de la *gustavia nana pittier*

8.4.1 Amyrin

Algunos estudios²⁸ demuestran que se puede encontrar en un suplemento dietético o una composición farmacéutica que comprende un extracto o un concentrado de parkii de *Butyrospermum* usado para la supresión de hipersensibilidad y/o la reacción inflamatoria.

La hipersensibilidad se define como un estado de reactividad alterada en que el cuerpo reacciona con una contestación inmune exagerada a una sustancia (el antígeno). La Hipersensibilidad puede causarse por los antígenos exógenos o endógenos.

Las reacciones de la hipersensibilidad están relacionadas con un gran número de enfermedades. Entre éstos, alérgico y las condiciones del autoimmune son de gran importancia.

Existe una nuez de un árbol Africano el parkii de *Butyrospermum* que contiene los alcoholes del triterpene característicos de *Butyrospermum* (en el termed de la invención presente *Butyrospermum-triterpenes*) es lupeol, el parkeol, el

²⁸ Novel composition containing extracts of *butyrospermum parkii* and the use of such a composition for preparing a medicament or a dietary supplement for the treatment or prevention of inflammation, hypersensitivity or pain.

germanicol, el dammaradienol, 24-methylene-dammarenol, el butyrospermol. el alfa. - el amyryl y la beta. - el amyryl, y esters de eso, sobre todo el cinnamic ácido, acético o el esters ácido graso. Utilizado principalmente para obtener la mantequilla del shea, ordinaria contiene 1-5% (el w/w) Butyrospermum-triterpenes y con una dosificación de mantequilla del shea de 1-20% (el w/w) en cosmético tópico existiendo o los productos farmacéuticos, los volúmenes de Butyrospermum-triterpenes en los tales productos serían máximos 1% (el w/w).²⁹

Aplicándolo tópicamente inhibe significativamente la inflamación o hipersensibilidad de las membranas superficiales o mucosas. Esto es sorprendente porque los tales efectos no son asequibles con los más bajo niveles de Butyrospermum-triterpenes que, a través del uso de mantequilla del shea como un emoliente, se ha usado hasta ahora en productos tópicos farmacéuticos o en productos cosméticos.

Otros estudios muestran que las partes etéreas de *Chuquiraga ulicina* ssp. contiene el lupeol, taraxasterol, b-amyryl, un-amyryl y acetato del b-amyryl, están presentes en las flores de varios Asteraceae y tienen efecto antiinflamatorio, porque se ha demostrado los efectos inhibitorios contra la inflamación TPA-inducido para parangonar aquéllos estrechamente contra la tumor-promoción por el mismo compuesto, y porque la Asteraceae estudiada por contiene estos triterpenos que poseen la actividad antiinflamatoria fuerte, los extractos de flores de Asteraceae y los triterpenoides de las flores pueden ser de importancia desde el punto de vista de la prevención del cáncer.³⁰

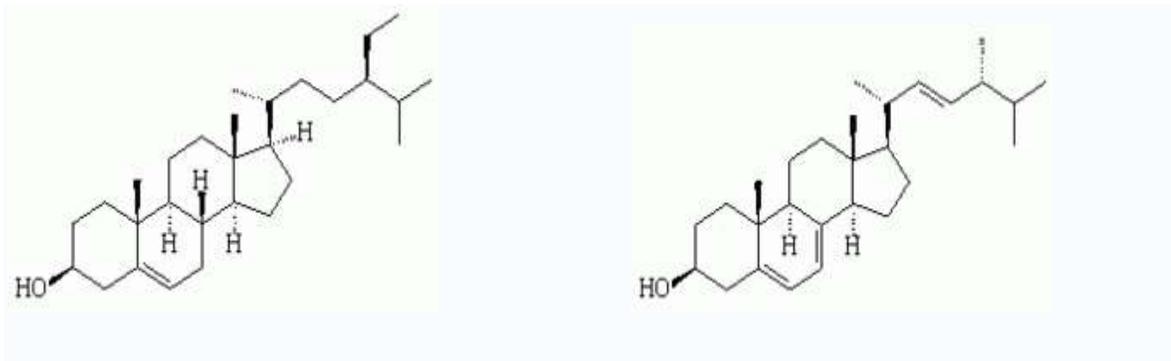
8.4.2 Stigmasterol

Stigmasterol es un phytosterol con un peso molecular de 412.691 y una fórmula de $C_{29}H_{48}O$.

²⁹ Novel composition containing extracts of *butyrospermum parkii* and the use of such a composition for preparing a medicament or a dietary supplement for the treatment or prevention of inflammation, hypersensitivity or pain.

³⁰ Boletín de la Sociedad Chilena de Química - CONSTITUENTS OF CHUQUIRAGAI -IATACAMENSIS AND C_ ULICINA_

Figura 47. β -sitosterol³¹



Phytosterols (también llamado el esteroles de la planta) es un grupo de alcohol del esteroide, phytochemicals que ocurre naturalmente en las plantas. Ellos son los polvos blancos con el olor apacible, característico, insoluble en el agua y soluble en los alcoholes. Ellos tienen muchas aplicaciones como los aditivos de comida, y en la medicina y cosméticos.

Debido a su presencia en la composición de la planta terrestre y sólo ocurrencia rara en las algas unicelulares, β -sitosterol puede usarse como un marcador biológico que indica la cantidad presente de la materia orgánica terrestre, derivado en una muestra. Cuando estos esteroides son generalmente insolubles en el agua, ellos se suspenden en materia sólida (por ejemplo los sedimentos). Debido al área de superficie de grano, efectúa barros con concentraciones mayores, por el peso que arenas o sedimentos forman granos más toscos. Para superar este efecto, se requiere proporciones de esteroles individuales para sumar el esteroles satisfecho o el colesterol, normalmente se usa para indicar la fuente de la materia orgánica.

Los phytosterols tienen la propiedad colesterol amenazadora (reduciendo la absorción de colesterol en el intestino), y puede actuar en la prevención de cáncer. Phytosterols ocurren naturalmente en la cantidad pequeña en la verdura con grasa, sobre todo el aceite de la soja. Un complejo del phytosterol, aislado del aceite de la verdura, es el cholestatin, compuesto de campesterol, stigmasterol, y brassicasterol, y se comercializa como un suplemento dietético. El esteroles tiene la capacidad de reducir el colesterol en los seres humanos aproximadamente un 15%.

³¹ Kako M, Miura T, Nishiyama Y *et al.* Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. *J Nat Prod* 1997; 60(6): 604-5.

9. COMPONENTE PEDAGÓGICO

9.1 CURSO FITOQUIMICA

Responsable directamente asesor de tesis: Franco Arturo Ibarra Narváez, dirigido por las estudiantes de Licenciatura en educación Básica con énfasis en Ciencias Naturales y educación ambiental: Amalia Molina Chaux, Alicia Vargas Muñoz y Clara P. Montealegre S.

9.1.1 Introducción

La Fitoquímica como rama de la ciencia y base fundamental para el desarrollo de la sociedad y conservación de la especie. Facilita el conocimiento de las propiedades, principios activos que caracterizan la variedad de especies vegetales. A la vez brinda medios de servicio para la fabricación de productos, ya sea, para el campo industrial (insecticida, fungicida, cosméticos) o medicinal (fármacos, tratamientos).

El estudio de la especie *Gustavia nana Pittier*, permitió reconocer la importancia y la necesidad de fundamentar este campo investigativo en la sociedad, en todas las instituciones educativas. Con el fin de estimular las habilidades, destrezas y funciones cognitivas del ser humano. Aplicando métodos de estudio, investigación y prácticas de laboratorio, con técnicas sencillas que identifiquen principios activos (terpenos, esteroides, saponinas) y aproximar su utilidad para el beneficio de los seres vivos.

El curso fitoquímico está fundamentado en cuatro fases, la primera fase tiene como objetivo motivar a los directores de núcleo la aprobación del desarrollo de la jornada, junto con el apoyo de los rectores de los diferentes entes educativos de la ciudad de Neiva. Se escogieron dos representantes de cada institución educativa.

La segunda fase, requirió de una formación básica teórica. Para ello, se facilitó documentación teórica a los estudiantes, se complementó con diapositivas de estudios realizados. Con el fin de adquirir un conocimiento básico sobre fitoquímica y que tuvieran soporte teórico de lo que se desarrollaría en el curso.

La tercera fase, comprendió la confrontación teórica-práctica. Es la fase experimental, donde el estudiante aplicó técnicas de laboratorio para identificar principios activos en la planta de estudio. Finalmente en la cuarta fase se evaluaron los logros y los objetivos propuestos durante la jornada.

9.1.2. Actividades

- Invitación y motivación de la jornada fitoquímica a los estudiantes de grado undécimo (dos jóvenes) en las instituciones educativas de Neiva. A la vez entrega teórica básica sobre aspectos importantes de la fitoquímica, la cual conlleva preguntas que ubiquen al estudiante sobre lo que se quiere alcanzar a través de la jornada. Información de la fecha de la primera reunión del grupo.
- Dinámica de integración, que promueva el interés e identidad de cada integrante. Socializar el documento teórico que se les facilitó, para aclarar dudas y conocer los logros que aspiran alcanzar a través de la jornada.
- Proyección de diapositivas con el fin de ampliar el conocimiento sobre el estudio Fitoquímico, mostrar evidencias que lo incentiven a trabajar con empeño, y mostrar las metas, alcances durante el transcurso de la jornada. Explicación de las técnicas de identificación y métodos de las prácticas de laboratorios que se piensan desarrollar.
- Teniendo clara la fase teórica, se recurre a la confrontación teórica-práctica. Los estudiantes en pequeños grupos (de tres), traen su planta de estudio (argumentan por que la escogieron), experimentan diferentes técnicas fitoquímicas para la aprobación o desaprobación de principios activos en dicha especie.
- Finalmente, socialización del estudio realizado; para ello, cada grupo expone su trabajo con sus respectivos resultados y conclusiones.
- Se evalúa el trabajo desarrollado en general, sacando conclusiones de pertinente y sugerencias que permitan una mejor calidad educativa. Se

precisó la importancia de dar a conocer el trabajo realizado a los demás compañeros en su respectiva institución.

- Entrega de informe final de laboratorio, el cual será evaluado y junto con una carta dirigida al rector; anexo se enviaron los informes a cada institución con las correcciones pertinentes.

9.1.3 Programa de capacitación en Fitoquímica



PRIMERA JORNADA (sábado 7 de octubre de 2006, 8:00 a.m. – 12:00 m)
LUGAR: Laboratorio de Química, Universidad Surcolombiana, sede central.
Tercer piso bloque de laboratorios de Ciencias Básicas.

1. Saludo
2. Presentación personal
3. Actividad de integración
4. Socialización de conceptos previos
5. Presentación de diapositivas:
 - Concepto fitoquímica.
 - Identificación de instrumentos de laboratorio
 - Técnicas de laboratorio
6. Refrigerio
7. Explicación del curso de laboratorio
8. Formación de grupos y entrega de material
9. Desarrollo de la primera parte del curso de laboratorio:
 - Técnicas de identificación: Flavonoides, alcaloides
10. Conclusión y sugerencias
11. Marcha final

SEGUNDA JORNADA (día por definir con el grupo. 2:00 pm – 6:00pm)
Laboratorio de Química, Universidad Surcolombiana.

1. Saludo
2. Asistencia
3. Desarrollo de la segunda parte del curso de laboratorio:
Técnicas de identificación: Saponinas, isoprenoides
4. Resultados de cada grupo
5. Socialización de trabajo en el laboratorio
6. Entrega del cuestionario del curso de laboratorio
7. Conclusiones de las jornadas
8. Entrega de certificados a cargo del decano de la facultad y asesor de tesis.

REQUISITOS:

- Puntualidad
- Lectura del material facilitado
- Agenda de apuntes
- Bata de laboratorio
- Guantes látex

9.1.3.1 Objetivos

9.1.3.1.1 General

Dar a conocer a los estudiantes los productos naturales presentes en las plantas mediante la separación y detección de sus principios activos hasta sus aplicaciones o acciones terapéuticas.

9.1.3.1.2 Específicos

✨Despertar en el estudiante el interés por el estudio en el área de los productos naturales de origen vegetal.

☀ Proporcionar los medios adecuados para manejar los procesos de extracción, purificación e identificación de metabolitos secundarios en plantas.

☀ Caracterizar física y químicamente los ingredientes activos mediante técnicas usuales de laboratorio en análisis fotoquímico.

☀ Incentivar el estudio químico de las plantas con fines investigativos, suministrando las bases teóricas y técnicas necesarias para avances en el conocimiento de los constituyentes activos con interés industrial o bromatológico.

9.1.3.2 Descripción del curso

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de múltiple uso. Los constituyentes presentes en las plantas participan en los ciclos biosintéticos y su estudio contribuye a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen con fines científicos y económicos.

El curso está orientado al conocimiento químico de los principales constituyentes en una planta. Los constituyentes estudiados básicamente son flavonoides, quinonas, colorantes, alcaloides, sapogeninas, taninos, aceites esenciales y aroma entre otros. Experimentalmente se suministran los métodos adecuados de extracción, separación e identificación de sustancias en forma selectiva o general y se incentivan para adquirir un criterio analítico y bioquímico.

9.2 ASPECTOS TEÓRICOS BÁSICOS

¿Alguna vez has cuestionado la influencia de la Química en la sociedad? Interactuamos diariamente con ella y por ello tiene una enorme influencia sobre la vida humana. La Química es la ciencia que estudia la composición, estructura y propiedades de las sustancias materiales, de sus interacciones y de los efectos producidos sobre ellas al añadir o extraer energía en cualquiera de sus formas. En otras épocas las técnicas químicas se utilizaban para aislar productos naturales y para encontrar nuevas formas de utilizarlos. En el siglo XIX se desarrollaron técnicas para sintetizar sustancias nuevas que eran mejores que las naturales, o que podían reemplazarlas por completo con gran ahorro. Al aumentar la complejidad de los compuestos sintetizados, empezaron a aparecer materiales totalmente nuevos para usos modernos.

Los físicos, biólogos y geólogos habían desarrollado sus propias técnicas y su forma de ver el mundo, pero en un momento dado se hizo evidente que cada ciencia, a su modo, era el estudio de la materia y sus cambios. La química era la base de todas ellas. Actualmente la Química se ha especializado en cada área del conocimiento y por ello presenta variedad de ramas: química orgánica, inorgánica y en este caso el estudio de interés a desarrollar es fotoquímico.

La palabra fito proviene de “planta”, y química estudio de la materia. La fotoquímica estudia los principios activos de las plantas, especialmente de los llamados metabolitos secundarios que son como “artículos de lujo” que se encuentran en determinadas plantas. Estos artículos de lujo sirven de materia prima para la cura de enfermedades, fabricación de productos industriales, etc.

La ingeniería metabólica estudia todas las reacciones involucradas en el metabolismo de las plantas y sus enzimas reguladoras. Las plantas utilizan un lenguaje químico para interrelacionarse con otros seres vivos con los que coincide espacial y temporalmente. Los compuestos que median dichas interacciones se denominan aleloquímicos y pertenecen al grupo de los denominados metabolitos secundarios, productos naturales sintetizados por las plantas que no son considerados "esenciales" para los procesos básicos de vida (en contraste con el metabolismo primario). Los avances recientes en el campo de la biotecnología vegetal y el uso de herramientas como la proteómica, permiten establecer estrategias eficientes para la obtención de metabolitos de interés comercial.

El metabolismo primario compromete aquellos procesos químicos que cada planta debe llevar a cabo cada día para sobrevivir y reproducir su actuación, como son: fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, transaminación, síntesis de proteínas, enzimas y coenzimas, síntesis de materiales estructurales, duplicación del material genético, reproducción de células (crecimiento), absorción de nutrientes, etc.

Los metabolitos primarios se caracterizan por:

- Tener una función metabólica directa.
- Ser compuestos esenciales intermedios en las vías catabólica y anabólica.
- Encontrarse en todas las plantas.
- Tratarse de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos o clorofilas.

Los vegetales producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos,

otras vinculadas con interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores. Actualmente, se ha demostrado que principalmente la mayoría de ellos participan en el mecanismo de defensa de las plantas. Entre estos últimos, se consideran a las fitoalexinas, los alelopáticos, por mencionar algunos. La razón de ser de estos metabolitos permite una gama de usos en la agricultura y en la medicina. Adicionalmente, las múltiples funciones que presentan en los vegetales permite la búsqueda de nuevos agroquímicos naturales, como insecticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento, entre otros.

Para su estudio la fitoquímica permite aislar e identificar los principios activos de numerosas plantas con importante actividad biológica, tal es el caso de las plantas medicinales. Por el potencial que representan estos metabolitos, las investigaciones no solo se han dirigido a la elucidación de estructuras químicas y evaluación de su actividad biológica mediante bioensayos, sino hacia la obtención por cultivo in vitro.

Para obtener los metabolitos secundarios de una especie vegetal se requiere de un estudio teórico – práctico, aplicando una serie de técnicas de laboratorio para aproximarse a un saber claro sobre la planta de estudio, para que tipo de enfermedad sirve, o para la fabricación de qué tipo de producto (insecticida, fungicida).

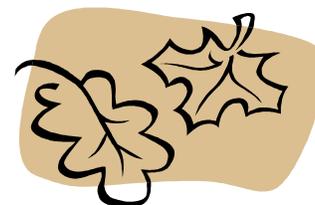
Algunas familias, generalmente, utilizan aguas naturales para diferentes funciones en la salud, ya sea para la tensión, cólicos o dolores estomacales, esa es una forma de utilizar los productos de las plantas con fines medicinales; así éstos tienen otras aplicaciones.

Pregunta en casa qué tipo de plantas utilizan con fines medicinales, alimenticios, estéticos o de otra aplicación, esta información te será útil para el primer encuentro que tendremos en los laboratorios de la Universidad Surcolombiana.

9.3 GUÍA PARA LABORATORIO DE FITOQUIMICA

9.3.1 SEMINARIO TALLER PARA ALUMNOS SELECCIONADOS DE ALGUNOS COLEGIOS DE NEIVA PARA EL ESTUDIO PRELIMINAR FITOQUÍMICO

9.3.2 Justificación



La determinación del hombre por conocer, aprovechar y dominar su entorno ha sido milenaria y en este propósito ha sacado de él los frutos necesarios para garantizar su existencia; así por ejemplo, fabricó remedios naturales extraídos de las plantas medicinales para curar sus enfermedades, aprendió a cultivar sus alimentos, fabricó tintes para rituales y una infinidad de productos naturales.

Colombia es un país biodiverso y abundante en especies vegetales que la hacen una verdadera potencia verde, lo que plantea que el conocimiento y aprovechamiento nacional, científico y tecnológico de esta sea la necesidad relevante para conducirnos a una mejor calidad de vida y a una valoración más auténtica y eficaz de nuestro patrimonio cultural.³²

En este sentido la formación de estudiantes y maestros en este campo del saber deben involucrar elementos que le permitan ser agentes transformadores de las realidades naturales, sociales y culturales con una perspectiva de desarrollo humano sostenible, la cual puede ser proyectada en su actividad como docentes y estudiantes. Por el reconocimiento de los recursos naturales del país y su potencialidad en términos de sus productos naturales constituyen el camino eficaz para la apropiación de conocimientos no solo en el ámbito del desarrollo disciplinar sino además como estrategia para la enseñanza de la química en las instituciones educativas. Es por ello que para el estudio de la fitoquímica se permite aislar e identificar los principios activos de numerosas plantas con importante actividad biológica, tal es el caso de las plantas medicinales.

³² BILBAO, Maria del Rosario. Análisis fitoquímica preliminar Universidad del Quindío Armenia 1997.

9.3.3 Objetivos

9.3.3.1 General

Impulsar procesos de investigación en el aula, a través de la fundamentación teórica y práctica en los procedimientos de investigación de los productos naturales, en especial en lo referente al análisis fitoquímico.

9.3.3.2 Específicos

- ❖ Despertar en el estudiante el interés por el estudio en el área de los productos naturales de origen vegetal.
- ❖ Motivar al estudiante en procesos de indagación.
- ❖ Incorporar nuevas tecnologías a procesos de aprendizaje.
- ❖ Explorar composición química de algunas especies vegetales presentes en nuestra región.
- ❖ Proporcionar los medios adecuados para manejar los procesos de extracción, purificación e identificación de metabolitos secundarios en plantas.

9.4 ASPECTOS TEORICOS

¿Cuál es el objeto de estudio de la fitoquímica?

Las sustancias vegetales se han dividido arbitrariamente en dos grupos:

Primarias y secundarias (aunque este último calificativo no hace justicia a la compleja naturaleza de sus diversas estructuras moleculares); los primeros son estudiados por la bioquímica mientras que los otros son el objeto de la fitoquímica.

La fitoquímica (del latín *phytos* = planta y, *química*) o química vegetal es la rama de las ciencias que estudia todo lo relacionado con la enorme variedad de sustancias orgánicas secundarias elaboradas y acumuladas por las plantas, en lo que hace referencia a sus estructuras químicas, biosíntesis, transformaciones metabólicas, distribución natural y función biológica.

El número de estructuras moleculares producidas en las plantas es inmenso, y tal es el avance en los conocimientos que de ellos se tiene en la actualidad, que uno de los problemas más grandes que tienen que enfrentar los químicos contemporáneos es, precisamente, el de poder recopilar y sistematizar toda la información existente para cada tipo particular.

MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales	Reactivos
-Vasos precipitados	-Etanol
-Pipetas	-Gotas de ácido clorhídrico
-Mortero	-13.5 g de Cloruro mercuríco
-Embudo	-Solución de NaOH
-Agitador	-27.2 g de KI
-Tubos de ensayo	-20 ml de HNO ₃
-Papel filtro	-anhídrido acético en cloroformo
-Vidrios reloj	-ácido sulfúrico concentrado
-Balanza analítica	-Cloroformo
-Erlenmeyer	-Cinta de magnesio
	-Cloruro de mercurio
	-Tricloruro férrico

9.5 METODOLOGIA



🔬 Preparación del material vegetal

La planta se limpia, se separa en sus partes (Flores, raíz, semilla fruto) y se seca a la sombra, con corriente de aire y una temperatura de 40°C máximo. Si se trabaja con material vegetal fresco debe extraerse o liofilizarse dentro de un plazo máximo de 24 de horas desde la recolección.

🔬 Extracción

El material vegetal molido y seco, se extrae por:

Maceración: Operación por la cual se hace actuar un disolvente sobre el material que se desea extraer, a temperatura ambiente. En el mortero se introduce la especie picada en trozos pequeños, se aplica una pequeña porción de alcohol y se agita continuamente, hasta obtener el extracto completo de la planta.

La polaridad del extracto es importante en la determinación de principios activos.

Pregunta: ¿Qué entiendes por polaridad y por qué es fundamental en la identificación de principios activos?

El extracto concentrado se extrae en un embudo de decantación con proporciones de éter de petróleo de 20 ml, por tres veces. Las fracciones se colectan y con 5ml. de éstas en diferentes tubos de ensayo, enumere para hacer pruebas de:

🔍 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.

PRUEBA DE SHINODA: A 1 ml del extracto etanólico en un tubo de ensayo agregue magnesio en polvo y gotas de ácido clorhídrico. Color de mancha: Rosado, anaranjado, o fresa indican prueba positiva.

Pregunta: ¿El amplio rango de colores en una de las partes estructurales de las plantas se debe a que principio? ¿Qué parte es?

🔍 IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS.

PRUEBA DE ESPUMA: Introducir muestras de extractos vegetales en tubos con soluciones de HCl, y aparte soluciones de NaOH, agitar vigorosamente. Las saponinas y los cardiotónicos disminuyen la tensión superficial del agua produciéndose espuma en altura de 2 cm. Que permanece hasta media hora.

Preguntas: ¿Por qué se caracterizan las saponinas? ¿Cuál es su importancia?

🔍 IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES.

REACCIÓN DE MAYER: Disolver 13.5 g de cloruro mercuríco en 50 g de yoduro de potasio en agua y aforar a un litro. Color de mancha: Precipitado blanco.

Preguntas: ¿Cómo identificas la presencia de alcaloides en las especies vegetales? ¿Nombra algunas plantas que contienen este metabolito secundario?

* ¿Qué aplicaciones tienen los alcaloides en la sociedad?

🔍 IDENTIFICACIÓN DE ESTEROIDES.

REACCIÓN DE LIEBERMANN – BURCHARD: Consiste en someter el extracto a la acción de anhídrido acético en cloroformo y ácido sulfúrico concentrado, empleando gotas en placa excavada. Las gotas de ácido deben agregarse por el borde de la cavidad, muy lentamente para apreciar los cambios de color, de lo contrario la mezcla reaccionante se quema y sólo se observa color café.

REACCIÓN DE SALKOWSKI: En placa excavada disuelve la muestra en cloroformo y agrega una gota H_2SO_4 concentrado. El colesterol da de color rojo.

Pregunta: ¿Qué función cumplen los esteroides en las plantas?

🔍 IDENTIFICACIÓN DE TANINOS.

PRUEBA DE CLORURO FÉRRICO: Es la reacción para reconocer fenoles. Los taninos reaccionan con solución acuosa de tricloruro férrico al 1% dando coloración azul (taninos derivados del ácido gálico) o verde (taninos derivados del ácido protocatéuico).

Pregunta: ¿Cómo identifico la presencia de taninos en una planta? ¿Qué aplicaciones tienen los taninos?

9.6 RESULTADOS DEL CURSO TALLER EN FITOQUÍMICA

El estudio fitoquímico desarrollado con los educandos de diferentes entes educativos, facilitó el aprendizaje de aspectos teóricos – prácticos fitoquímicos, utilizando técnicas e instrumentos de laboratorio para identificar metabolitos secundarios presentes en diferentes especies vegetales (guayabo, café, limoncillo, ají) y de ésta manera conocer sus propiedades y servicios en los diferentes campos de la ciencia (salud, industria).

La importancia que tendría el desarrollo de la fitoquímica en el departamento del Huila sería una oportunidad con grandes beneficios; tanto para la humanidad como el medio natural. Afortunadamente en el Huila existe una rica diversidad de plantas útiles desde el punto de vista medicinal, pero debido al mal manejo ecológico del recurso, muchas de estas especies se encuentran en peligro de extinción, con el agravante de no llegar a conocer las propiedades y metabolitos

secundarios presentes en dicha especie, hecho que debe sensibilizar a ecólogos, taxónomos, biólogos hacia la necesidad de recuperar en un tiempo corto, información que puede ser extraordinariamente valiosa para la supervivencia humana.

Tanto en el Huila, como en otros ámbitos a nivel regional y nacional, muchas personas utilizan empíricamente plantas con fines medicinales, bien sea para la curación de algunas enfermedades o también con propósitos preventivos, sin conocer cuáles son las características botánicas y etnobotánicas, los componentes que actúan como principios activos, cómo es su mecanismo de acción y cuáles son las formas de propagación y de producción.

Si las personas que habitan en este departamento se lograran concientizar sobre la importancia que poseen estas plantas para mejorar la calidad de vida humana y para el desarrollo del medio ambiente utilizarían adecuadamente estos recursos aprovechando al máximo sus beneficios, también permite abrir investigaciones científicas, promoviendo el desarrollo intelectual y ingresos económicos a nivel nacional e internacional.

Con este trabajo se pretende difundir el conocimiento a la comunidad huilense para que se tome conciencia de la importancia de la biodiversidad local de este recurso y su potencial económico, ya que una vez conocidos los principios activos y los usos fitoterapéuticos y potenciales de éstas plantas, esto, finalmente, podría contribuir a implementar tecnologías agronómicas que permitan el desarrollo sostenible hacia la calidad de vida de las futuras generaciones.

Dentro de la variedad de flora que se encuentra en el departamento del Huila, las especies vegetales que son de mayor uso medicinal según la socialización presentadas por los estudiantes son:

- El aguacate: Mejora dolencia cardíaca
- Marañón y sábila: Mejorar síntomas de tos y gripa.
- Cáscara de coco: Calmar las hemorragias mensuales
- Caléndula: Mejoramiento y buen funcionamiento de los riñones.
- Violeta: Controla los cólicos mensuales.
- Eucalipto: Descongestiona las cavidades nasales.
- Yarumo: Controla el asma
- La coca: Calmar dolor de muela y amígdalas
- El paico: Purgante digestivo
- La insulina: Controla diabetes

- El ánom: Controla la úlcera.
- Apio y perejil: Aumenta la excreción en la orina
- Valeriana: Producir sueño, en caso insomnio.
- Hierbabuena: Calma dolores estomacales, cólicos y espasmos.
- Eucalipto: Congestión nasal y gripal
- Albahaca: Cefaleas, ardor urinario, fiebre y tos
- Romero: Ulceras gástricas, llagas y heridas
- Cola de caballo: Previene el cáncer, depurativo.
- Alcachofa: Combate reumatismo, inflamación, diabetes
- Limoncillo: Inductor de sudoración, combate infección viral
- Tomillo: Menstruación irregular, asma, reumatismo, estimula el apetito

Las especies vegetales empleadas en la práctica de laboratorio fueron el limoncillo, café, guayaba, ají. Se aplicaron las siguientes pruebas Fitoquímicas - Saponinas

- Alcaloides
- Esteroides
- Taninos

Con el fin de identificar su presencia o composición química de la planta, al igual que sus beneficios o grado de toxicidad para el ser vivo y medio natural.

Los resultados de cada prueba en las diferentes especies, registraron positivos en:

- Saponinas: Guayabo, ají, café
- Esteroides : Ají, guayabo, limoncillo

Al identificar los metabolitos secundarios a través de la técnica cromatográfica en placas silicagel, se registró presencia de terpenos (violeta), esteroides (azul), flavonoides (amarillo), de acuerdo a la gama de colores de corrido en las cámaras cromatográficas (en disolución con cloroformo y etanol), en la mayoría de extractos vegetales (limoncillo, café, ají, guayaba).

Como evidencias del trabajo realizado con los estudiantes de las instituciones educativas, se anexan registros fotográficos.(Anexo G)

9.7 RECURSOS

9.7.1 Humanos

Los recursos humanos son el Dr. Rubén Torrenegra y el candidato al título de doctor el profesor Oscar Rodríguez, quienes servirán de guías en este proceso (análisis fitoquímico).

El profesor Franco Arturo Ibarra quien es el asesor de tesis de grado.
Las estudiantes Alicia Vargas, Amalia Molina y Clara Patricia Montealegre.

9.7.2 Institucionales

La Universidad Surcolombiana con sede en Neiva Huila.
La Universidad Javeriana con sede en Bogotá D.C.

10. CONCLUSIONES

- El análisis cromatográfico de la *Gustavia nana pittier*, se llevó a cabo mediante columna cromatográfica, cromatografía en capa delgada y placa preparativa, mediante las cuales se lograron identificar y separar tres compuestos por la comparación de sus datos espectrales con espectros auténticos o datos de la literatura. La espectroscopia de masas y la resonancia magnética apuntan hacia un esqueleto del Alpha Amyrin, Stigmasterol y Uvaol.
- Las pruebas que muestran un resultado positivo más significativo son las de terpenos y esteroides entre las realizadas están, la cromatografía en sílica gel, reacción de Liebermann – Burchard y reacción de Salkowski.
- Con base en otros estudios se puede decir que los extractos de la corteza de la especie vegetal *Gustavia nana pittier* pueden ser de importancia desde el punto de vista de la prevención del cáncer debido a que contiene triterpenos que poseen la actividad antiinflamatoria fuerte, porque se han demostrado los efectos inhibitorios contra la inflamación relacionados aquéllos estrechamente contra la promoción-tumor por un compuesto que contiene β -amyrin y Uvaol.
- La determinación del punto de fusión para las muestras son respectivamente (6a 155-158 °C) y (6c 191-192 °C) determinadas en un equipo electrotérmico VA 9000 con el empleo de capilares.
- El trabajo desarrollado permitió impulsar procesos de investigación en el aula, a través de la fundamentación teórica y práctica en los procedimientos de investigación de los productos naturales, en especial en lo referente al análisis fitoquímico.
- Se realizó un curso taller mediante el cual se dio a conocer a los estudiantes de las instituciones educativas de Neiva, los productos naturales presentes en algunas plantas, mediante la separación y detección de sus principios activos secundarios hasta sus aplicaciones o acciones terapéuticas, encontrando gran aceptación por parte de la comunidad

estudiantil que se vio reflejada en la participación y desempeño y el compromiso académico de las instituciones de continuar con este tipo de trabajos.

- Este trabajo de investigación permitió el impulso a la línea de investigación en fitoquímica en la Universidad Surcolombiana, situación que posibilitará la realización de estudios posteriores en este campo del saber.
- La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Surcolombiana, a partir de la interacción académica de este grupo de trabajo, firmará un convenio de cooperación con la Universidad Javeriana que, a mediano plazo, ofrecerá en la ciudad de Neiva formación avanzada, inicialmente como diplomado y posteriormente como especialización.
- Es de suma importancia que la Universidad Surcolombiana interactúe con su entorno, y en el caso particular de la Facultad de Educación, con las instituciones que le son afines, de tal manera que se soporte el mejoramiento de la calidad de la educación a partir de proyectos pertinentes de investigación en el desarrollo curricular.

11. RECOMENDACIONES

Incorporar las experiencias investigativas de las Ciencias Básicas al componente pedagógico, con el fin de mejorar la formación docente y la pertinencia del aprendizaje.

Impulsar convenios interinstitucionales de cooperación académica que le permitan a la Universidad contrastar su conocimiento y definir procesos de capacitación para la población docente.

Promover el uso de los laboratorios de Ciencias Básicas en las instituciones educativas en el departamento del Huila, tendiente a ampliar los ambientes de aprendizaje.

Institucionalizar pasantías de investigación con otras universidades que posibiliten a los estudiantes de la Facultad de Educación la validación y ampliación de conocimiento.

Brindar espacios académico-administrativos para que los estudiantes participen en el ofrecimiento de cursos de proyección social.

Mejorar y dotar los laboratorios de Ciencias Básicas de la Universidad Surcolombiana con equipos con los cuales se pueda ofrecer servicios a la comunidad surcolombiana.

BIBLIOGRAFÍA

BILBAO, Maria del Rosario. Análisis fitoquímica preliminar Universidad del Quindío Armenia 1997.

DOMINGUEZ, Xorge Alejandro. Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Editorial Limusa.1978. p.444

GARCÍA CARMONA, A. (2002): El termómetro de Galileo como instrumento didáctico en el aula de Física. *Revista Española de Física*, 16 (2), pp. 46-49.

GARZÓN, Bernal. Estudio botánico y del potencial de uso de la familia Lecythidaceae para la Amazonía. 2000

GIL, D. et al (1991): *La enseñanza de las Ciencias en la Educación Secundaria*. Barcelona: ICE / Horsori.

Guerrero, R. Jorge H. Estudio Preliminar de la Especie *Gustavia superba* (H.B.K.) Berg. Análisis de su extracto lípido, trabajo de grado (Químico) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, departamento de Química. Bogotá 1983

Inventario de Flora y Fauna del CENTRO DE INVESTIGACIONES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL "LA TRIBUNA" Convenio Hocol - Usco - Fase II

Kako M, Miura T, Nishiyama Y *et al*. Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. *J Nat Prod* 1997; 60(6): 604-5.

MABBERLEY, D.J. The plant-book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press, 1993. pp.707. Recuperado 23/11/05

Martha Magnin - Fitoterapeuta: consultas - hierbas, tinturas madres, tratamientos naturistas. Fitonutrientes Fitoterapia Salud BuenaSiembra.com.arp (2). Recuperado 2/05/06

RIBEIRO, J.E.L Da S. Flora da Reserva Ducke. Instituto Nacional de Pesquisas de Amazonía, Manaus. Pereira, 1999.

ROSADO, L. y AYENSA, J. M. (1999): La enseñanza de la Física en el nuevo Sistema Educativo. Base didáctica y nuevos medios tecnológicos en la ESO y el Bachillerato. Madrid: UNED.

Novel composition containing extracts of butyrospermum parkii and the use of such a composition for preparing a medicament or a dietary supplement for the treatment or prevention of inflammation, hypersensitivity or pain.

POZO, J. I. y GÓMEZ CRESPO, M. A. (1998): *Aprender y enseñar Ciencia. Del conocimiento cotidiano al conocimiento científico*

RODRIGUEZ, B. María del Rosario. Análisis Fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío: Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas. Programa de Química de productos vegetales. Armenia, 1997. p. 9-136

ROSADO, L. y AYENSA, J. M. (1999): *La enseñanza de la Física en el nuevo Sistema Educativo. Base didáctica y nuevos medios tecnológicos en la ESO y el Bachillerato*. Madrid: UNED.

WHITNEY, Frederick Lamson. Elementos de Investigación. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1970.

Páginas de Internet:

URL:<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/terpenos.html>. Recuperado 22/06/06

URL: http://natureduca.iespana.es/med_sustanc_esencias.htm. Recuperado 22/05/06

—————. Recuperado 5/05/06

URL: <http://www.unex.es/polen/BH/contenidos/07-esquema.htm>

URL: <http://www.um.es/molecula/lipi06.htm>. Recuperado 19/09/06

URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Caroteno>. Recuperado 19/09/06

URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Limoneno>. Recuperado 19/09/06

URL: http://html.rincondelvago.com/aprendizaje_12.html. Recuperado 18/10/06

URL: <http://www.xtec.es/~cdorado/cdora1/esp/psicolog.htm>. Recuperado 18/10/06

URL: <http://www.guia-digital.com/infociencia/arbol/arbol-ficha.cfm?rama=3&ID=230230>. Recuperado 3/06/06

URL: http://natureduca.iespana.es/med_sustanc_esencias.htm. Recuperado 5/05/06

URL: http://natureduca.iespana.es/med_sustanc_esencias.htm. Recuperado 22/05/06

URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Caroteno>. Recuperado 19/09/06

URL: <http://www.um.es/molecula/lipi06.htm>. Recuperado 19/09/06

URL: <http://www.Tevni Grajales G. file:///A:/invesdefin.htm> (1 of 3).
Recuperado.7/03/2000 04:38:37 p.m.

URL: http://www.Boletín de la Sociedad Chilena de Química - CONSTITUENTS OF CHUQUIRAGAI -IATACAMENSIS AND C_ ULICINA_

URL: <http://www.Rafael Humberto Ramírez Gil. La Fitoquímica y su Incidencia en la Enseñanza de la Química. http://www.pedagogica.edu.co/index.php?inf=266>.
Recuperado 22/06/06

Vigotsky, aprendizaje por imitación modelaje.
http://html.rincondelvago.com/aprendizaje_12.html. Recuperado 18/10/06

URL: <http://www. Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ® 2005. © 1993-2004 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.>

URL: [http://www.ROSADO, L. y GARCÍA CARMONA, A. \(2001\): Diseño de un programa-guía de actividades en el estudio de la Estática de Fluidos para la ESO.](http://www.ROSADO, L. y GARCÍA CARMONA, A. (2001): Diseño de un programa-guía de actividades en el estudio de la Estática de Fluidos para la ESO.)

En Rosado, L. y Cols., Didáctica de la Física y sus Nuevas Tendencias. Madrid: UNED, pp. 622-667. <http://contexto-educativo.com.ar/2004/3/nota-08.htm>

URL: Walter & Gillet (1998) IUCN Red List of Threatened plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Center. IUCN-Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Bdv + 862 pp. http://www.uprm.edu/publications/cjs/Vol36a/36_31-39.pdf. Recuperado 26/11/05.

URL: Zuloaga y Morrone, 1999. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II, Dicotyledoneae. Monogr. in Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 74:1-1269. <http://www.uns.edu.ar/inbiar/campos.htm> Recuperado 23/11/05

URL: PRANCE, G.T. & S.A. Mori. 1979. Lecythydaceae – Part I: The actinomorphic-flowered New World Lecythydaceae (Asteranthus, Gustavia, Grias, Allantoma and Cariniana). Flora Neotropica Monograph 21 (I). 270pp. www.unep-wcmc.org/species/tree_study/americas/esp/2-13.htm - 35k Recuperado 26/11/05

URL: MAGNIN, Martha. Fitoterapeuta: consultas - hierbas, tinturas madres, tratamientos naturistas. Fitonutrientes, Fitoterapia, Salud. En: URL <http://www.BuenaSiembra.com.arp>. Recuperado 2/05/06

URL: GALEANO, Gloria; CALDERÓN, Edardo, DUEÑAS, Hilda; TOBÓN, Isabel. Lecythydaceae. www.humboldt.org.co/conservacion/libros_rojos/descargas_lr/lr_plantas/08_octava_parte.pdf recuperado 26/11/05

URL: E. R.: Duke 15739, MO. Lecythydaceae. *Gustavia nana* subsp. *nana* Pittier., Contr. US Nat. Herb. 26(1): 5-6, 1927. Categoría nacional. VU D2. Citado por GALEANO, Gloria; CALDERÓN, Edardo, DUEÑAS, Hilda; TOBÓN, Isabel; www.humboldt.org.co/conservacion/libros_rojos/descargas_lr/lr_plantas/08_octava_parte.pdf. Recuperado 26/11/05

ANEXOS A. Cronograma de actividades

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	TIEMPO (meses)			
	1	2	3	4
Revisión bibliografica	■			
Elaboración del anteproyecto	■			
Recolección de Muestras	■			
Análisis Fitoquímico de la corteza		■		
Elaboración del Informe final			■	■
Presentación Publica de los Resultados				■
Entrega de tesis de Grado				■

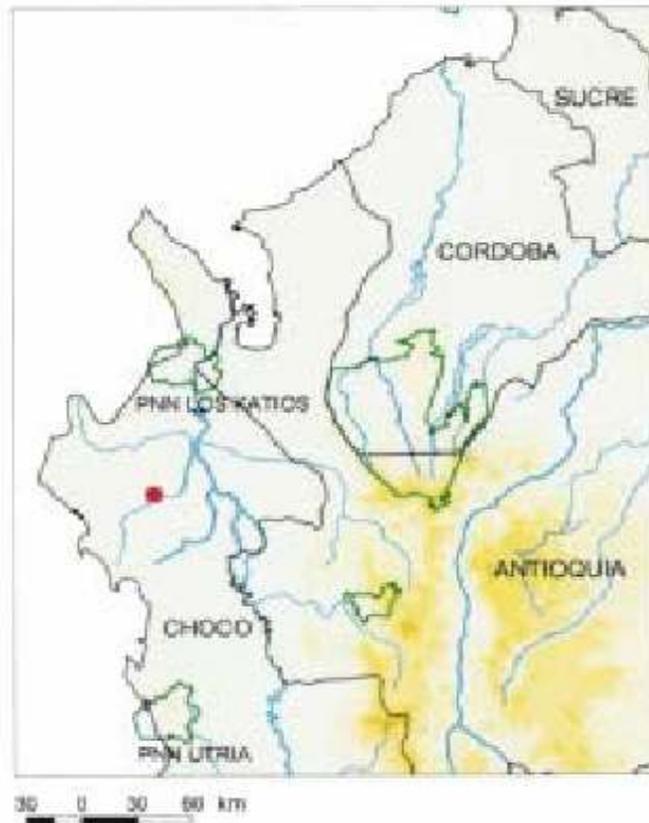
ANEXO B. Mapa de la ubicación de *Gustavia nana* Pittier en Colombia

Mapa N° 1.



ANEXO C. Parque Nacional los Katíos en Colombia

MAPA N° 2



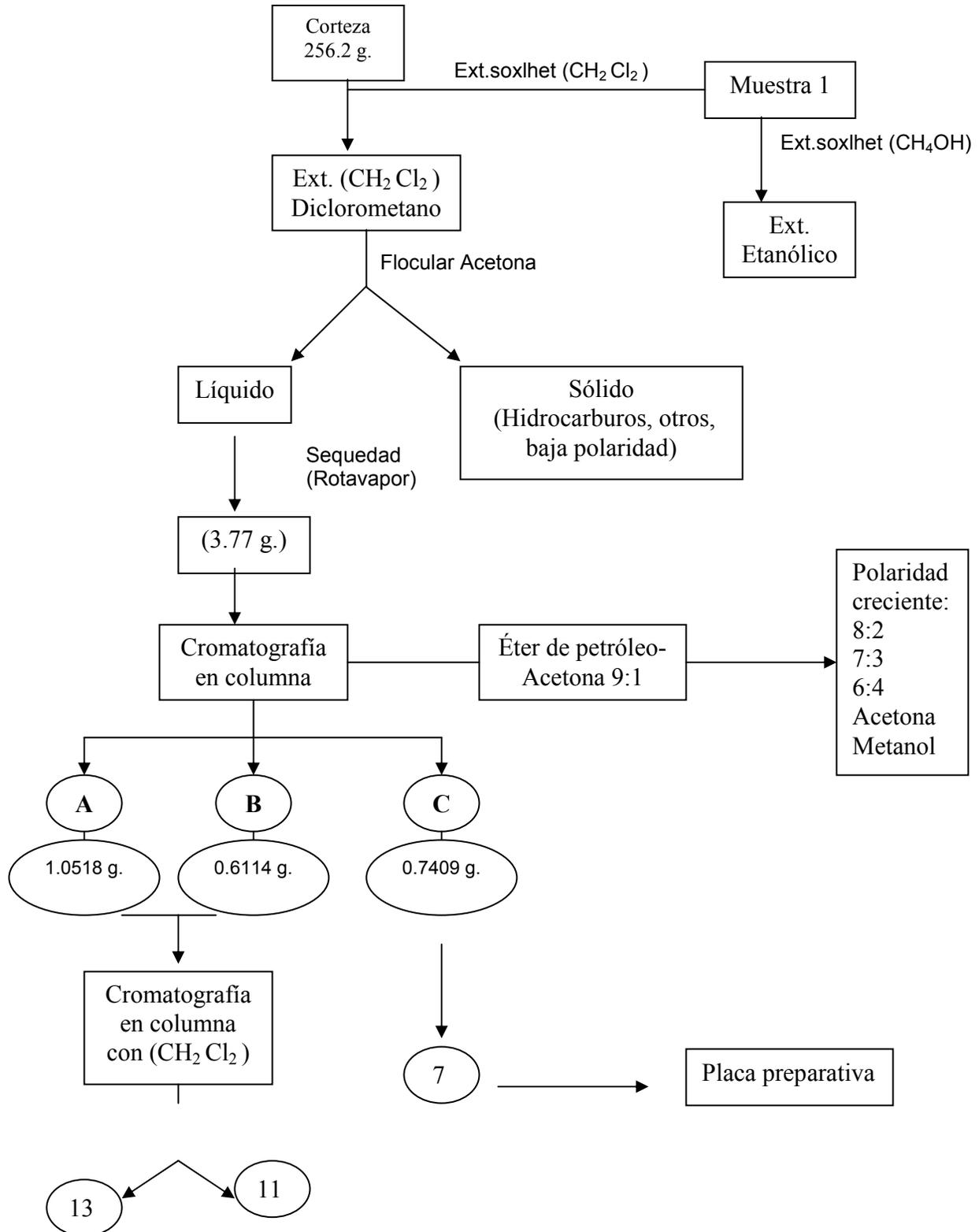
ANEXO D. Especies del género *Gustavia* que se encuentran en Colombia

TABLA N° 4 Especies del Género *Gustavia* que se encuentran en Colombia³³

<i>G. longifuniculata</i>	<i>G. dubia</i>	<i>G. hexapetala</i>
<i>G. grandibracteata</i>	<i>G. sessilis</i>	<i>G. angustifolia</i>
<i>G. petiolata</i>	<i>G. santanderiensis</i>	<i>G. verticillata</i>
<i>G. macarenensis</i> ³⁴	<i>G. speciosa</i> ³⁵	<i>G. romeroi</i>
<i>G. nana</i> ³⁶	<i>G. gentryi</i>	<i>G. poeppigiana</i>
<i>G. gracillima</i>	<i>G. foliosa</i>	<i>G. longifoliata</i>
<i>G. superba</i>	<i>G. excelsa</i>	

³³ Adatada de PRANCE, G.T. y MORI, S.A (26) Tabla XVI. P. 255.

ANEXO E. Diagrama de flujo del procedimiento



ANEXO F. Pruebas químicas preliminares

Para la identificación de los grupos de metabolitos presentes en los extractos totales se aplican los procedimientos de las pruebas químicas preliminares propuestos por SANABRIA, A. (1983) (Tabla 11).

Tabla 11. Procedimientos de las pruebas químicas preliminares para la identificación de los diferentes grupos de metabolitos secundarios

GRUPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBA QUÍMICA	PROCEDIMIENTO
Taninos	Cloruro férrico	A 0.2mL de extracto etanólico agregar 1 gota de solución de cloruro férrico al 1%. Observar coloración azul o verde.
	Acetato de plomo	A 1mL de extracto etanólico agregar 1mL de acetato de plomo al 10%. Observar turbidez o precipitado blanco.
	Gelatina – sal	A 1mL de extracto etanólico agregar 1mL de solución acuosa de gelatina – sal. Observar precipitación.
Flavonoides	Shinoda	A 1mL de extracto etanólico agregar gotas de ácido clorhídrico y un trozo de cinta de magnesio. Observar coloración naranja – roja.
	Rosenhein	A 1mL de extracto etanólico agregar 0.5ml de ácido clorhídrico concentrado. Mezclar y calentar por 10 minutos a 90°C, enfriar y agitar con 0.4mL de alcohol amílico, decantar y observar coloración roja en la fase amílica.
Esteroides	Liebermann – Burchard	Disolver 1 – 2 mg de extracto etéreo en 1mL de cloroformo. Agregar gotas de ácido sulfúrico concentrado y 1mL de anhídrido acético. Observar coloración azul.
	Rosenheim	A 1mL de solución clorofórmica del extracto agregar gotas de ácido tricloroacético 90%. Observar coloración de violeta-azul.
Saponinas	Espuma	A 1mL de extracto etanólico agregar 5mL de agua. Agitar vigorosamente. Observar formación de espuma con altura de 2cm que permanece hasta media hora.

	Hemólisis	En placas de agar – sangre colocar muestras del extracto etanólico en círculos de papel filtro. Observar la zona hemolizada y medir su diámetro.
Cardiotónicos	Baljet	A 0.5mL de extracto etanólico agregar 0.5ml de reactivo de Baljet (ácido pícrico 1% en etanol e hidróxido de sodio al 10%). Observar coloración naranja – roja.
	Legal	Disolver 1 – 2 mg de extracto etanólico en piridina. Agregar 3 gotas de reactivo de Legal (nitroprusiato de sodio al 5% e hidróxido de sodio 2N). Observar coloración roja intensa.
Lactosas terpénicas	Hidroxamato férrico	A una gota de extracto etanólico o etéreo añadir una gota de hidróxido de potasio 2N, calentar durante 2 minutos. Enfriar, acidular con ácido clorhídrico 0.5N y añadir una gota de cloruro férrico 1%. Observar coloración violácea.
Quinonas	Borntrager – Graus	Colocar 5g a ebullición de material vegetal pulverizado durante 5 a 10 minutos con hidróxido de potasio al 5% al cual se le ha añadido 1mL de peróxido de hidrógeno al 20%. Enfriar la mezcla, filtrar y acidular 5mL del filtrado con 10 gotas de ácido acético. Agitar en embudo de decantación con 10mL de benceno, formándose una coloración amarilla en la capa bencénica. Agitar 1ml de hidróxido de amonio diluido con 2ml del extracto bencénico. Observar coloración roja.
	Hidrosulfito de sodio	A 0.2 mL del extracto etanólico agregar una gota de hidróxido de sodio 5N y 1mg de hidrosulfito de sodio. Calentar y observar coloración roja intensa.
Cumarinas	Hidroxamato férrico	A una gota de extracto etanólico o etéreo añadir una gota de hidróxido de potasio 2N, calentar durante 2 minutos. Enfriar, acidular con ácido clorhídrico 0.5N y añadir una gota de cloruro férrico 1%. Observar coloración violácea.
	Erlich	A 1ml de extracto etanólico agregar 1mL de reactivo de Erlich (p – dimetilaminobenzaldehído 5% en etanol y cloruro de hidrógeno). Observar coloración naranja.

Alcaloides		A 1g de extracto etanólico seco agregar 10ml de ácido clorhídrico al 5%, calentar a 60°C. Enfriar y filtrar
	Mayer	A 1ml de extracto ácido agregar unas gotas de reactivo de Mayer (solución de cloruro mercúrico 1.5% y yoduro de potasio 5%). Observar formación de precipitado blanco.
	Dragendorff	A 1ml de extracto ácido agregar unas gotas de reactivo de Dragendorff (Nitrato de bismuto 5% en ácido nítrico y 27% yoduro de potasio). Observar formación de precipitado marrón.
	Wagner	A 1ml de extracto ácido agregar unas gotas de reactivo de Wagner (yodo sublimado 1.3% y yoduro de potasio 2%). Observar formación de precipitado café.

ANEXO G. Registro Fotográfico Capacitación en Fitoquímica



