

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN HOJAS Y TALLOS DE
ESPECIES DEL GÉNERO *Columnea* spp. (Gesneriaceae) UTILIZADAS EN LA
MEDICINA TRADICIONAL, CORREGIMIENTO DE KANKINTÚ, COMARCA
NGÄBE-BUGLÉ, 2017-2019.**

OLMEDO LUIS MORALES

1-724-1758

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO A LA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA CON
ESPECIALIZACIÓN EN BIOLOGÍA VEGETAL.**

ASESORES:

Dra. Laura Patiño
Dr. Luis Carlos Mejía
M. Sc, Rafael Rincón

David, Chiriquí, República de Panamá

12 de noviembre de 2019

RJT 4038

DEDICATORIA

En memoria a mi profesora, amiga **Viviana E. Morales V.**, por ser competente, perseverante y una más de mi familia.

A mis padres **Ignacio Luis Cho** y **Elicia Morales C.**, quien ha sido mi apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a Dios por la vida, y la sabiduría para desarrollar este proyecto.

A la Secretaría Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (**SENACYT**) por la beca para estudios de postgrado; Al señor Ignacio Luis por sus valiosos conocimientos en la medicina.

A la Profesora Viviana E. Morales Villamonte por su paciencia, sus consejos, su humildad, sus conocimientos, su dedicación y preocupación por los estudiantes.

A los asesores Doctora Laura Patiño, Doctor Luis Mejía y el Magister Rafael Rincón por su tiempo y su paciencia.

Al Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) y del Herbario de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UCH), por facilitarme las herramientas y todo los materiales necesario para realizar esta investigación.

Al Instituto de Investigaciones de Ciencias y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP).

ÍNDICE GENERAL

Contenidos	Pág.
• Dedicatoria.....	i
• Agradecimiento.....	ii
• Índice general.....	iii
• Índice de cuadros.....	vi
• Índice de figuras.....	viii
• Resumen.....	1
1. Capítulo I (Marco teórico).....	2
1.1. Introducción.....	3
1.1.1. ¿Qué son las plantas medicinales?.....	4
1.1.2. Estudios sobre plantas medicinales de Panamá.....	4
1.1.3. Estudio realizado en otros países.....	5
1.2. Clasificación de los componentes químicos vegetales.....	6
1.2.1. Los compuestos del metabolismo primarios.....	6
1.2.2. Los compuestos del metabolismo secundarios.....	7
1.2.2.1. Metabolitos secundarios.....	7
1.2.3. Terpenos: hormonas, pigmentos o aceites esenciales.....	9
1.2.4. Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.....	9
1.2.5. Alcaloides.....	10
1.2.5.1. Clasificación de los alcaloides.....	10
1.2.6. Glucósidos: Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.....	11
1.3. Características de los metabolitos secundarios o productos naturales vegetales.....	12
1.3.1. Actividad biológica de las cumarinas.....	12
1.3.2. Actividad biológica de los flavonoides.....	13

1.4. ¿Cómo se determina los metabolitos secundarios en extractos vegetales?.....	13
1.5. Consideraciones taxonómicas de la familia Gesneriaceae.....	14
1.5.1. Descripción Botánica de la familia Gesneriaceae.....	15
1.5.2. Descripción botánica del género Columnnea.....	16
1.6. Planteamiento del Problema.....	17
1.7. Justificación e importancia.....	19
1.8. Objetivo de la investigación.....	20
1.8.1. Objetivo general.....	20
1.8.2. Objetivos específicos.....	20
2. Capítulo II (Materiales y Métodos).....	22
2.1. Selección y recolección de muestras.....	23
2.2. Obtención de extractos vegetales.....	27
2.3. Análisis físico químico.....	28
2.3.1. Porcentaje de humedad.....	28
2.3.2. Porcentaje de Extracción.....	28
2.3.3. Análisis de pH.....	28
2.3.4. Análisis de sólidos totales disueltos o grado Brix.....	29
2.4. Determinación de metabolitos específicos o secundarios.....	29
2.4.1. Tamizaje fitoquímico para extractos acuosos y etanólico.....	30
2.4.1.1. Prueba para la Identificación de flavonoides.....	30
2.4.1.1.1. Prueba con reactivo de NaOH.....	30
2.4.1.1.2. Prueba con reactivo de Pew's.....	30
2.4.1.1.3. Prueba con reactivo de Shinoda.....	31
2.4.2. Prueba para identificación de terpenos/esteroides: (Reacción de Salkowski).....	31
2.4.3. Prueba para identificación de triterpenos.....	31
2.4.3.1. Prueba con reactivo de Lieberman-Buchard.....	31

2.4.4. Prueba para identificación de alcaloides.....	32
2.4.4.1. Prueba de Mayer.....	32
2.4.4.2. Prueba de Dragendorff.....	32
2.4.4.3. Prueba de Wagner.....	33
2.4.4.4. Prueba de Hager.....	33
2.4.5. Prueba para identificación de taninos.....	33
2.4.5.1. Prueba de gelatina sal.....	33
2.4.5.2. Prueba de FeCl ₃	34
2.4.6. Prueba para identificación de cumarinas.....	34
2.4.7. Prueba para identificación de saponinas.....	34
2.4.7.1. Ensayo de agua caliente o ensayo de espuma.....	34
2.4.7.2. Prueba Rosenthaler.....	34
2.4.8. Prueba para identificación de glucósidos cardiotónicos y lactosas sesquiterpénicas (Prueba de Baljet).....	35
2.4.9. Prueba para Identificación de grupos 5_hidroxi flavonas (Prueba de Dimroth).....	35
2.4.10. Análisis cromatográficas y espectroscópicas.....	35
2.4.10.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	35
2.4.10.2. Espectrofotometría UV-visible.....	38
2.4.10.3. Espectroscopía infrarroja (IR).....	38
3. CAPÍTULO III.....	39
3.1. Resultados y Discusión.....	40
4. CAPÍTULO IV.....	88
4.1. Conclusiones.....	89
4.2. Recomendaciones.....	91
5. CAPÍTULO V (Referencias bibliográficas).....	92
6. CAPÍTULO VI (Anexo).....	103

ÍNDICE DE CUADROS

	Contenidos	pág.
Cuadro No. 1.	Equipos y reactivos para la determinación de metabolitos secundarios en los extractos etanólico y acuoso.....	26
Cuadro No. 2.	Valores estadísticos para contenido de agua en hojas y tallos de las cuatro especies de <i>Columnea</i>	42
Cuadro No. 3.	Estadísticos descriptivos para porcentaje de sólidos totales disueltos (grado Brix) de los extractos etanólico y acuoso de hojas y tallos de <i>Columnea</i> spp.....	43
Cuadro No. 4.	Prueba de normalidad para grado Brix de los extracto acuoso y etanólico de hojas y tallos de <i>Columnea</i> sp.....	44
Cuadro No. 5.	Estadístico U de Mann-Whitney para grado Brix de extracto acuoso y etanólico de las especies de <i>Columnea</i> sp.....	45
Cuadro No. 6.	Estadístico Kruskal-Wallis para contrastar la mediana entre grado brix en el extracto acuoso y la mediana entre pH en el extracto acuoso de las especies de <i>Columnea</i> sp.....	49
Cuadro No. 7.	Estadístico Kruskal-Wallis para contrastar la mediana entre grado brix en el extracto etanólico y la mediana entre pH en el extracto etanólico de las especies de <i>Columnea</i> sp.....	49
Cuadro No. 8.	Estadísticos descriptivos para Potencial de hidrógeno (pH) de los extractos acuoso y etanólico de hojas y tallos de <i>Columnea</i> spp.....	51
Cuadro No. 9.	Prueba de normalidad de los datos para potencial de hidrógeno (pH) de los extracto acuoso y etanólico de hojas y tallos de <i>Columnea</i> sp.....	51
Cuadro No. 10.	Estadístico U de Mann-Whitney para potencial de hidrógeno (pH) de extracto acuoso y etanólico de las especies de <i>Columnea</i> sp.....	53

Cuadro No. 11.	Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>Columnnea maculata</i>	59
Cuadro No. 12.	Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>Columnnea nicaraguensis</i>	60
Cuadro No. 13.	Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>Columnnea zebrina</i>	61
Cuadro No. 14.	Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>Columnnea billbergiana</i> ...	62
Cuadro No. 15.	Factor de retención en extractos etanólico de <i>Columnnea</i> spp.	66
Cuadro No. 16:	Longitudes de ondas absorbidas en el espectro UV-Visible en extractos acuoso de <i>Columnnea</i> spp.....	67
Cuadro No. 17:	Máximo de absorbancia en el espectro UV-Visible en extractos etanólico de <i>Columnnea</i> spp.....	69
Cuadro No. 18:	Principales señale del espectro infrarrojo de los extracto crudo etanólico y acuoso de <i>Columnnea maculata</i> y <i>Columnnea nicaraguensis</i>	86
Cuadro No. 19:	Principales señale del espectro infrarrojo de nueve fracciones de extracto etanólico de <i>Columnnea maculata</i> (Extracto de tallos y hojas purificada).....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Contenido	Pág.
Figura No. 1.	Ejemplo de compuestos tipos flavonoides.....	9
Figura No. 2.	Estructura de algunos de los núcleos alcaloídicos más sencillos.....	11
Figura No. 3.	Mapa del corregimiento de Kankintú, Distrito de Kankintú, Comarca Ngäbe-Buglé.....	24
Figura No. 4.	<i>Columnea nicaraguensis</i> Oerst., Foto: Morales 2017.....	25
Figura No. 5.	<i>Columnea maculata</i> C.V. Morton. Foto: Morales 2017.....	25
Figura No. 6.	<i>Columnea zebrina</i> Raymond, Foto: Morales 2017.....	25
Figura No. 7.	<i>Columnea billbergiana</i> Beurl, Foto: Morales 2017.....	25
Figura No. 8.	Diseño experimental para CCF.....	36
Figura No. 9.	Posible movimiento de solutos según su polaridad.....	36
Figura No. 10.	Extracto etanólico de tallos y hojas de <i>Columnea</i> spp.....	40
Figura No. 11.	Extracto acuoso de tallos y hojas de <i>Columnea</i> spp.....	40
Figura No. 12.	Gráfico de cajas y bigotes para representar el porcentaje de humedad en hojas y tallos para las cuatro especies de <i>Columnea</i>	42
Figura No. 13.	Gráficos de cajas y bigotes para representar la media de grado Brix de hojas de los extracto acuoso y extracto etanólico de las especies de <i>Columnea</i> sp.....	46
Figura No. 14.	Gráficos de cajas y bigotes para representar la media de grado Brix de tallos de los extracto acuoso y extracto etanólico de las especies de <i>Columnea</i> sp.....	47

Figura No. 15.	Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de porcentaje de sólidos totales disueltos (grado Brix) entre las hojas de <i>Columnea</i> spp., (Cm = <i>Columnea maculata</i> ; Cn = <i>Columnea nicaraguensis</i> ; Cz = <i>Columnea zebrina</i> ; Cb = <i>Columnea billbergiana</i>).....	50
Figura No. 16.	Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de porcentaje de sólidos totales disueltos (grado Brix) en tallos de <i>Columnea</i> spp., (Cm = <i>Columnea maculata</i> ; Cn = <i>Columnea nicaraguensis</i> ; Cz = <i>Columnea zebrina</i> ; Cb = <i>Columnea billbergiana</i>).....	50
Figura No. 17.	Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de porcentaje de sólidos totales disueltos (grado Brix) en tallos de <i>Columnea</i> spp., (Cm = <i>Columnea maculata</i> ; Cn = <i>Columnea nicaraguensis</i> ; Cz = <i>Columnea zebrina</i> ; Cb = <i>Columnea billbergiana</i>).....	54
Figura No. 18.	Gráficos de cajas y bigotes para representar la media de grado Brix de hojas de los extracto acuoso y extracto etanólico de las especies de <i>Columnea</i> sp.....	54
Figura No.19 .	Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de potencial de hidrógeno (pH) entre las hojas de <i>Columnea</i> spp., (Cm = <i>Columnea maculata</i> ; Cn = <i>Columnea nicaraguensis</i> ; Cz = <i>Columnea zebrina</i> ; Cb = <i>Columnea billbergiana</i>).....	55
Figura No. 20.	Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de potencial de hidrógeno (pH) entre las tallos de <i>Columnea</i> spp., (Cm = <i>Columnea maculata</i> ; Cn = <i>Columnea nicaraguensis</i> ; Cz = <i>Columnea zebrina</i> ; Cb = <i>Columnea billbergiana</i>).....	55
Figura No. 21.	Ensayo con agua caliente para saponina. Presencia de abundante espuma en extracto de hojas de: (A) <i>C. maculata</i> , (B) <i>C. zebrina</i> y (C) <i>C. nicaraguensis</i>	56

Figura No.22 .	Tamizaje fitoquímico para determinar taninos utilizando reactivo de FeCl ₃	57
Figura No. 23.	Tamizaje fitoquímico para determinar flavonoides utilizando reactivo de Shinoda.....	58
Figura No.24 .	Tamizaje fitoquímico para determinar triterpenos utilizando reactivo Lieberman Buchard.....	58
Figura No. 25.	Espectroscopía UV-visible. A) Cromatograma con revelador vainillina. B) Cromatograma de hojas y tallos de especies de <i>Columnea</i> bajo luz 365 nm. C) Cromatograma de hojas de <i>C. maculata</i> en placas preparativa. D) Compuesto purificado en hojas de <i>C. maculata</i> disuelto en metanol.....	65
Figura No. 26.	Espectro UV-Vis de extracto acuoso de <i>Columnea</i> spp.....	67
Figura No. 27.	Espectro UV- visible de patrón de ácido tánico.....	68
Figura No. 28.	Espectro UV- visible de patrón de quercetina.....	68
Figura No. 29.	Máximo de absorbancia en el espectro UV- visible de extracto etanólico de <i>C. maculata</i> y <i>C. nicaraguensis</i>	70
Figura No. 30.	Espectro UV-visible de quercetina (patrón-rojo) y extracto etanólico de <i>C. maculata</i> (azul para tallos y verde para hojas).....	70
Figura No. 31.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto acuoso crudo de hojas de <i>Columnea maculata</i>	72
Figura No. 32.	Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto acuoso crudo de hojas de <i>Columnea nicaraguensis</i>	72
Figura No. 33.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto acuoso crudo de tallos de <i>Columnea nicaraguensis</i>	73

Figura No. 34.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto acuoso crudo de hojas de <i>Columnea zebrina</i>	73
Figura No. 35.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto acuoso crudo de tallos de <i>Columnea zebrina</i>	74
Figura No. 36.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto acuoso crudo de hojas de <i>Columnea billbergiana</i>	74
Figura No. 37.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto acuoso crudo de tallos de <i>Columnea billbergiana</i>	75
Figura No. 38.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de tallos de <i>Columnea maculata</i>	76
Figura No. 39.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de tallos de <i>Columnea maculata</i>	77
Figura No. 40.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de hojas de <i>Columnea nicaraguensis</i>	77
Figura No. 41.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de tallos de <i>Columnea nicaraguensis</i>	78
Figura No. 42.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de hojas de <i>Columnea zebrina</i>	78
Figura No. 43.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de tallos de <i>Columnea zebrina</i>	79
Figura No. 44.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de hojas de <i>Columnea billbergiana</i>	79
Figura No. 45.	Principales señales de espectro infrarrojo para extracto etanólico crudo de tallos de <i>Columnea billbergiana</i>	80

Figura No. 46.	Principales señales de espectro infrarrojo para fracción F1 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de hojas de <i>Columnea maculata</i>	81
Figura No. 47.	Principales señales del espectro infrarrojo para fracciones F2 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de hojas de <i>Columnea maculata</i>	82
Figura No. 48.	Espectro infrarrojo para fracciones F3 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de hojas de <i>Columnea maculata</i>	82
Figura No. 49.	Principales señales de espectro infrarrojo para la fracción F4 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de hojas de <i>Columnea maculata</i>	83
Figura No. 50.	Principales señales de espectro infrarrojo para la fracción F5 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de hojas de <i>Columnea maculata</i>	83
Figura No. 51.	Principales señales de espectro infrarrojo para la fracción F1 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de tallos de <i>Columnea maculata</i>	84
Figura No. 52.	Principales señales de espectro infrarrojo para la fracción F2 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de tallos de <i>Columnea maculata</i>	84
Figura No. 53.	Principales señales de espectro infrarrojo para fracción F5 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de tallos de <i>Columnea maculata</i>	85
Figura No. 54.	Principales señales de espectro infrarrojo para fracción F6 obtenidas de la purificación de extractos etanólico de tallos de <i>Columnea maculata</i>	85

Figura No. 55.	Morfología y anatomía de <i>Columnea billbergiana</i> . A) Ramas con flor, B) Células de parénquima acuíferos, C) Rafidios en forma de resortes, D) Corte transversal de hojas, E) Cáliz con la disposición de la corola vista en estereoscopio.....	104.
Figura No. 56.	Proceso realizado en el laboratorio. A) Hoja de <i>Columnea maculata</i> , B) Tallos de <i>Columnea maculata</i> , C) Extracción por método de percolación (por 8 días), D) <i>Columnea zebrina</i> , E) medición de hojas de <i>C. zebrina</i> con calibrador vernier.....	105
Figura No. 57.	Proceso realizado en el laboratorio. A) Refractómetro, B) Medición de grado Brix, C) Extracto etanólico de hojas, D) Extracción etanólico de tallos de <i>Columnea nicaraguensis</i> , E) Extracción etanólico de hojas de <i>Columnea nicaraguensis</i>	106
Figura No. 58.	Proceso realizado en el laboratorio. A) Extracto etanólico, B) Extracto acuoso, C) Extracto acuoso de hojas de <i>C. maculata</i> (rojo) y de tallos de <i>C. maculata</i> (amarillo), D) Ensayo de saponina con agua caliente (<i>C. nicaraguensis</i>), E) Ensayo de tanino de hojas de <i>C. nicaraguensis</i>	107
Figura No. 59.	Ensayo cromatográfica. A) Cromatograma de extracto etanólico de <i>Columnea</i> spp.; B) Cromatograma etanólico de tallos de <i>C. maculata</i> ; C) Muestra obtenido de la purificación (placa preparativa, fase normal); D) Cromatograma observado bajo luz UV 254 nm (<i>C. maculata</i>); E) Cromatograma con revelador vainillina (señallado con flecha rojo).....	108
Figura No. 60.	Equipos de laboratorio. A) Potenciómetro; B) Espectrofotómetro UV-visible; C) Espectrofotómetro infrarrojo; D) Rotavapor ; E) Proceso de decantación de extracto etanólico	109

Resumen

Las especies *Columnnea* spp., son plantas utilizadas con frecuencia como medicina tradicional por los grupos indígenas del corregimiento de Kankintú para contrarrestar diversas dolencias, sin embargo, la mayoría de ellas no tiene referencias científicas que lo respalde. Este estudio consistió en recolectar muestra vegetal en la región Ño Kribo, Corregimiento de Kankintú, Distrito de Kankintú. El muestreo fue aleatorio, se recolectaron tallos y hojas sanas, las cuales fueron analizadas en el laboratorio de CIPNABIOT, UNACHI, para hacer las respectivas extracciones y análisis correspondientes. La identificación taxonómica se realizó en el Herbario UCH de la Universidad Autónoma de Chiriquí, en David, Provincia de Chiriquí. El material vegetal fue extraído con solución hidroalcohólico (técnicas de percolación) y acuosa (infusión). Se realizaron análisis fisicoquímicos y fitoquímicos para determinar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las especies *Columnnea*, aplicando métodos espectrofotométrico UV-Vis e FT-IR.

Con el tamizaje fitoquímico se identificaron metabolitos secundarios mayoritarios como fenoles, flavonoides, taninos, saponinas estas fueron confirmada con el espectro UV visible con absorbancia para algunos de los 270 a los 300 nm para extractos acuoso y 270-500 nm para extractos etanólicos, que corresponde a los grupos de flavonoides tipo antocianinas y taninos y se observaron máximos correspondientes a los pigmentos tipo clorofila (665 nm).

El análisis de los extractos de hojas de *Columnnea* spp. en el espectrofotómetro infrarrojo se observaron bandas anchas entre los 3200 cm^{-1} y 3340 cm^{-1} del estiramiento -OH característico de grupo alcoholes y fenoles, así como señales a 1074.35 cm^{-1} , adjudicables a alargamiento del enlace C-OH, señales en $2900\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$ adjudicables a vibraciones de estiramiento C-H de un aldehído, señales entre $2850\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$ para el alargamiento H-CH₂ de alcanos y las vibraciones 1760 cm^{-1} señales para tensión C=O de grupo funcional cetona, señales entre 1650 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de tensión C=C de un aromático, señales entre 1300 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} señal para C-H₃ correspondiente al esqueleto carbonado, 1255 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} señal para vibraciones de flexión de un C-O adjudicables a un aromático y señales entre 1070 cm^{-1} y 1080 para un C-O de tipo alifático, señales débiles entre 650 cm^{-1} y 815 cm^{-1} adjudicables a tensión C-H de aromáticos.

Según referencias bibliográficas con los solventes etanol y agua se puede extraer flavonoides y fenoles, por lo tanto se podría concluir que los compuestos mayoritarios extraídos fueron de estos dos tipos por las bandas característicos del O-H en todos los espectros. Este estudio consistió en determinar los metabolitos secundarios mayoritarios en los extractos etanólico y acuoso de hojas y tallos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Introducción

El conocimiento sobre plantas medicinales tiene su comienzo desde la historia del hombre y cuando formó sociedades; desde entonces las plantas han sido su alimento y su remedio para los problemas de la salud; en la antigüedad el hombre utilizó su propio instinto a través del conocimiento empírico que se sustentada en el cotejo de aciertos y errores y aprendió a distinguir las plantas tóxicas de las que podían serle útil (Alonso, 2010).

Los conocimientos ancestrales se han extendido mediante el aprendizaje teórico y práctico, por medio de la observación y la experimentación, a partir de la repetición de sus principios e igualmente de sus experiencias (Faguetti, 2010).

Los indígenas de la selva peruana hace muchos siglos descubrieron el valor de la corteza del quino, árbol que contiene el alcaloide llamado quinina que es usado para contrarrestar la malaria. Pasaron 200 años para que los científicos pudieran identificar su compuesto activo, la quinina, que ha sido de valor incalculable en el tratamiento de la malaria (Sosa, 2010).

La medicina tradicional según la O.M.S (2003) comprende diversas prácticas, enfoques y creencias sanitarias que incorporan medicinas procedentes de plantas, animales o minerales. Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna; su acción preventiva y curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo; estas sustancias se conocen como principios activos; generalmente son producto del metabolismo secundario de la planta, tienen propiedades medicinales y funcionan incrementando el bienestar.

1.1.1. ¿Qué son las plantas medicinales?

Son aquellos vegetales que elaboran sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo (Hernández, 2008).

Suárez (2007) define plantas medicinales como "cualquier planta que en una o más de sus partes ya sea hojas, flores, corteza, raíz, fruto, contiene sustancias que la hacen útil para mejorar la salud de las personas o los animales".

1.1.2. Estudios sobre plantas medicinales de Panamá

La flora de Panamá es una de las más ricas en el mundo con un estimado de 10,400 especies de plantas vasculares diferentes, de las cuales alrededor del 1500 (13%) son endémicas la mayoría de las cuales no han sido investigadas para identificar su utilidad y sus propiedades químicas (Ortiz *et al.*, 2019 y Correa, *et al.* 2004).

En Panamá se han realizado inventarios sobre el uso de plantas medicinales en los diferentes grupos indígenas del país; en la Comarca Ngäbe-Buglé en 1980 se recolectaron un total de 286 plantas de las cuales 265 (92,6%) tienen un uso etnobotánico identificándose taxonómicamente 104 de ellas; en el estudio se describió a *Columnea nicaraguensis* para el tratamiento de dolor de cabeza, también son usadas por los grupos indígenas Naso o Teribe para tratar fiebre y fatiga. Se describe a *Columnea sanguinolenta* para tratar dismenorrea por los Teribe y *Columnea tulae* para fiebre y sarampión (Gupta, 2013).

Estudios recientes por Morales (2015), describe seis especies de *Columnea* (*C. consanguinea*, *C. sanguinolenta*, *C. maculata* y *C. nicaraguensis*, *C. parviflora* y *C.*

mira) usadas como medicina en la Comarca Ngäbe-Buglé, sin embargo sólo se menciona su uso tradicional.

1.1.3. Estudio realizado en otros países

El género *Columnea* perteneciente a la familia Gesneriaceae ha sido muy poco estudiada para conocer las sustancias activas que la componen; sin embargo, en algunos países se han hecho estudios preliminares con diferentes especies por ejemplo la especie *Columnea picta* H. Karst., utilizada como antiofídica por los grupos indígenas Awá-Cuaiquier y Emberá en Colombia. En el análisis fitoquímico preliminar realizado en hojas de esta especie (distribuida solo en Colombia y Ecuador), se caracterizó la presencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, grupos aldehídos, carotenoides y terpenos, compuestos encontrados en plantas que han demostrado tener un grado significativo de neutralización del efecto letal del veneno de la serpiente *Bothrops asper* y *B. atrox* (Chávez, et. al. 2007).

Otros estudios realizados sobre validación antibiótica de plantas medicinales contra *Staphylococcus aureus* en el noroeste de Colombia, describe especies de *Columnea* *consanguinea*, *C. parviflora*, *C. picta* y *C. rubriacuta* donde únicamente *C. picta* mostró inhibición total del crecimiento bacteriano (Benítez & Stashenko, 2009).

En otro estudio realizado en Colombia se determinaron la composición química de cuatro especies de *Columnea* (*Columnea parviflora*, *Columnea cruenta*, *Columnea picta* y *Columnea consanguinea*), donde caracterizaron flavonoides y esteroides para *C. parviflora* y *C. cruenta*, mientras que en *C. picta* y *C. consanguinea* solamente se encontraron esteroides. La especie *C. cruenta* presentó taninos, sustancias cardiotónicas y abundante antraquinonas, además cumarinas, fenoles y flavonoides,

que son sustancias que en su conjunto rebajan la tasa de colesterol, regeneran células hepáticas, protegen contra virus y microbios, son quimioprotectores frente al cáncer, reducen la presión sanguínea, fortalecen el sistema cardiovascular y estabilizan el ritmo cardiaco. Se describe a *C. consanguinea* como anti-inflamatorio en mordedura de serpientes; esta especie de *Columnea* en unión con otras hierbas (micay y botoncillo) se utiliza como diurético en afecciones renales (Pino-Benítez, 2006).

Las plantas se encuentran en constante dinamismo desde el punto de vista químico, debido a que hay una constante síntesis y degradación de moléculas biológicas que determina el funcionamiento de sus sistemas biológicos por las presiones ecológicas donde se encuentran (Ringuelet & Viña, 2013).

1.2. Clasificación de los componentes químicos vegetales

Desde el punto de vista biológico las plantas poseen dos rutas metabólicas que son esenciales para su funcionamiento; Estas rutas metabólicas son el metabolismo *primario* y *metabolismo secundario*.

1.2.1. Los compuestos del metabolismo primario

Los *compuestos primarios* son todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción; estos metabolitos primarios comprenden los glúcidos o hidratos de carbono, los *lípidos*, las *proteínas* y los *ácidos nucleicos* (Ringuelet & Viña 2013).

1.2.2. Los compuestos del metabolismo secundario

Los *compuestos secundarios* cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. No están, en general, directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo, ni participan en procesos tales como la obtención de energía; sin embargo muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer insectos y otros polinizadores, repeler predadores o seres dañinos, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima., es decir que cumplen preferentemente funciones ecológicas (Ringuelet & Viña 2013).

1.2.2.1. Metabolitos secundarios

En muchos casos los metabolitos secundarios pueden ser materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos de semisíntesis; La utilidad de los mismos está solamente limitada por la imaginación humana o por el avance de los conocimientos científicos (Ringuelet & Viña, 2013).

Estos compuestos son producto del metabolismo secundario de las plantas, no se encuentran en estado puro en las mismas, sino en forma de complejos cuyos componentes se complementan y se refuerzan en su acción sobre el organismo. Estas sustancias activas presentan un equilibrio fisiológico dentro de la planta y el organismo; debido a ello, resultan más asimilables por el cuerpo (Hernández, 2008).

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas y cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no afecta su desarrollo, pues no intervienen en el metabolismo primario de las plantas, sin embargo intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente y

en los seres humanos juegan un papel importante en la prevención de enfermedades como el cáncer, afecciones cardiovasculares y neurodegenerativas (Hijuelo, 2013).

Estos tipos de metabolitos se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies y se agrupan en cuatro clases principales:

1.2.3. Terpenos: hormonas, pigmentos o aceites esenciales.

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmético, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas; otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

1.2.4. Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unida a estructuras aromáticas o alifáticas (Figura 1). Las propiedades antioxidantes de los polifenoles son el motivo de sus posibles implicaciones en la salud humana, como son la prevención del cáncer, de las enfermedades cardiovasculares o incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. De todos los compuestos fenólicos, el grupo de los flavonoides es el más extendido en la naturaleza y dentro de ellos, los flavonoides son los que poseen una mayor actividad antioxidante (Gimeno, 2004).

Estudios epidemiológicos han demostrado que una ingestión rica en flavonoides se correlaciona con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular y se ha observado que actúan a diferentes niveles; Las cumarinas conocidas también como benzopironas, son una familia de compuestos de origen natural y sintético que han suscitado desde hace mucho tiempo un gran interés debido a sus posibles aplicaciones biológicas; En las plantas se pueden encontrar en general en las raíces, las hojas, los frutos y las flores (Gimeno, 2004).

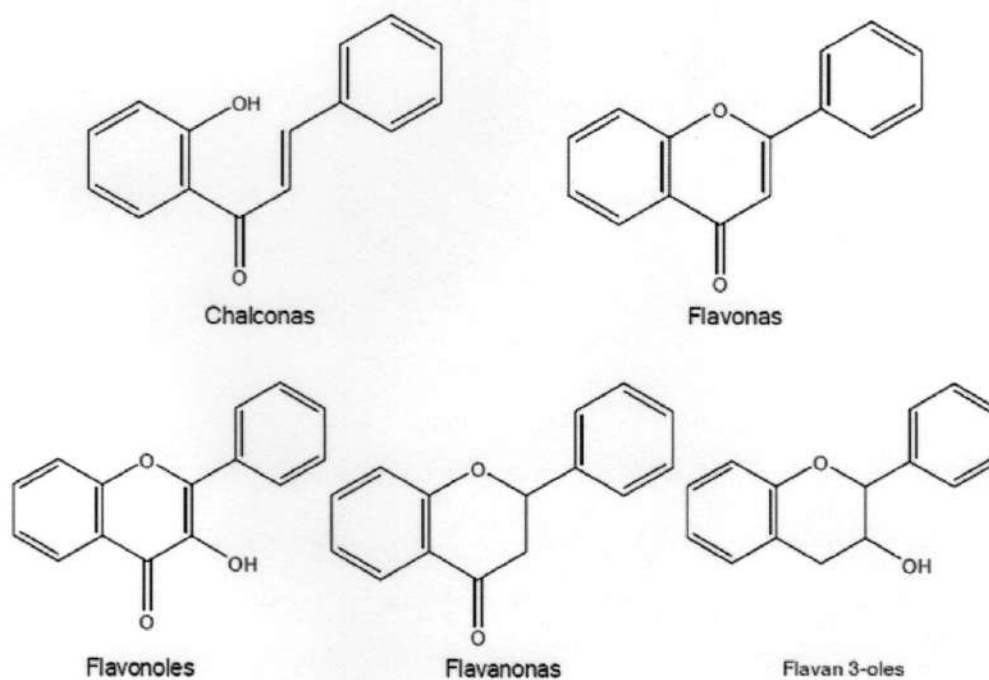


Figura 1: Ejemplo de compuestos tipos flavonoides

1.2.5. Alcaloides.

Arango (2008), lo define como compuestos orgánicos de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación. La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, de los alcaloides, hacen de este grupo, uno de los más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico.

Según Ringuelet (2013), para su mejor estudio se suele clasificar a los metabolitos secundarios en grupos y esta clasificación puede realizarse desde distintos puntos de vista: teniendo en cuenta su estructura química, sus rutas biosintéticas, sus propiedades farmacológicas, su distribución botánica, entre otros.

1.2.5.1. Clasificación de los alcaloides

A). Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos ornitina y lisina. B). Alcaloides derivados del ácido nicotínico. C). Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina: feniletilamínicos e isoquinoleínicos. D). Alcaloides derivados del triptófano: indolmonoterpénicos, ergolínicos, etc. E). Alcaloides derivados del ácido antranílico: quinoleínas, quinazolininas y otros. F). Alcaloides derivados de la histidina: imidazólicos. G). Alcaloides derivados del metabolismo terpénico: diterpénicos y esteroidicos. En la figura 2 se muestra algunos alcaloides más conocidos con sus respectivas estructuras bioquímicas.

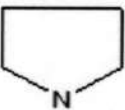

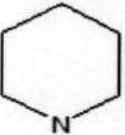
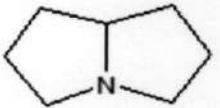
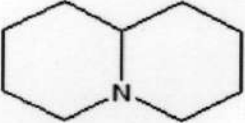
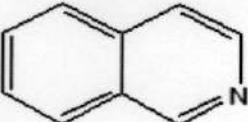
Núcleo alcaloídico	Estructura	Precursor biosintético	Ejemplos
PIRROLIDINA		ORNITINA	NICOTINA
TROPANO		ORNITINA	ATROPINA COCAÍNA
PIPERIDINA		LISINA	CONÍINA
PIRROLIZIDINA		ORNITINA	RETRONECINA
QUINOLIZIDINA		LISINA	LUPININA
ISOQUINOLEÍNA		TIROSINA	CODEÍNA MORFINA

Figura 2. Estructura de algunos de los núcleos alcaloídicos más sencillos

1.2.6. Glucósidos: Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

“La palabra glucósidos hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Las saponinas son glicósidos que se caracterizan por producir espuma en el agua cuando se mezclan y se remueven, lo que les ha valido su condición de jabones naturales y ha hecho que algunas plantas como la jabonera (*Saponaria officinalis*)

fueran utilizadas como tal desde hace mucho tiempo. Entre las plantas ricas en saponinas se conocen a la hiedra (*Hedera helix*), el rusco (*Ruscus aculeatus*), el espárrago (*Asparagus officinalis*) entre otros (Cortés, 2015).

1.3. Características de los metabolitos secundarios o productos naturales vegetales

Los metabolitos secundarios han sido y son utilizados por el hombre para aplicarlos en la industria farmacéutica, terapéutica de cultivos, perfumista, alimenticia (como suplementos, aditivos o colorantes), en el curtido de cueros, entre muchas otras aplicaciones; estos son los comúnmente llamados productos naturales vegetales y representan moléculas con variadas estructuras, diferentes propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos; en muchos casos son materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos de semisíntesis (Ringuelet & Viña, 2013).

Otros compuestos tienen una función protectora frente a predadores, como disuasorios, proporcionando al vegetal sabores amargos, convirtiendo a las plantas en materiales indigestos o venenosos; también intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ringuelet & Viña, 2013).

1.3.1. Actividad biológica de las cumarinas

Las cumarinas poseen gran variedad estructural por la cual son muchas las propiedades farmacológicas con las que la asocian, entre otras: antimicrobianas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antivirales, antihelmínticas, antioxidantes o inhibidoras enzimáticas (Arango, 2010).

Otros ejemplar de actividad biológica son la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la acción estrogénica del cumestrol. Se destaca además, el uso de cumarinas como saborizantes y en perfumería. Existen además derivados tricíclicos o tetracíclicos de cumarinas que se comportan como intercalantes del ADN y, por tanto, tienen interés como antitumorales o bien como agentes fotoquimioterápicos en el tratamiento de la psoriasis (Arango, 2010).

1.3.2. Actividad biológica de los flavonoides

Los flavonoides constituyen una de las subfamilias de polifenoles naturales a las que la comunidad científica ha dedicado más atención en los últimos años. Sus múltiples propiedades biológicas (entre ella anticancerígena) observadas experimentalmente y su abundancia en la dieta, junto con su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional, los convierten en posibles candidatos a explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar determinadas enfermedades crónicas (Álvarez & Orallo, 2003).

1.4. ¿Cómo se determina los metabolitos secundarios en extractos vegetales?

Existen diversos métodos para determinar la presencia de metabolitos secundarios en extractos vegetales; ya sea métodos sencillos y rápidos como el tamizaje fitoquímico y análisis por cromatografía en capa fina; así como métodos más complejos, como los análisis por espectroscopias UV-visible, IR, RMN entre otros, que requieren más tiempos de investigaciones.

“El tamizaje fitoquímico o análisis fitoquímico se encuentra dentro de las fases iniciales de la exploración fitoquímica que facilita saber cualitativamente primordiales sectores químicos latentes en una planta y desde ahí, dirigir la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés” (García *et al.*, 2019).

El tamizaje fitoquímico: es la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de aparición de color y precipitación. Los resultados del tamizaje fitoquímico conforman solamente una orientación y debe de interpretarse en grupo con los resultados del screening farmacológico (García *et al.*, 2019).

El tamizaje fitoquímico: proporciona información previa de los compuestos químicos de la planta, adjuntada con los resultados del tamizaje farmacológico, tienen la posibilidad de guiar el seguimiento de las investigaciones. Algunos consideran un reducido número de grupos de sustancias, en compensación, otros determinan la existencia de compuestos de poco interés, como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucilagos (García *et al.*, 2019).

1.5. Consideraciones taxonómicas de la familia Gesneriaceae

La familia Gesneriaceae pertenece a la división Magnoliophyta subclase Asteridae, Orden Schrophulariales. La subfamilia Gesnerioideae es considerada monofilética con base en datos moleculares y morfológicos. Tiene cerca de 133 géneros y 3000 especies en el mundo. Se le subdivide en 3 subfamilias: Cyrtandroideae del viejo mundo, esta subfamilia posee una especie en América; Gesnerioideae, subfamilia Neotropical y Coronatheroideae. Actualmente, se ha propuesto que la subfamilia Coronatheroideae sea una tribu de la subfamilia Gesnerioideae. Se distribuyen

principalmente en los trópicos y subtropicos de África, México, Centro y Sudamérica, Asia y Oceanía, con pocos géneros en zonas templadas del sur de Europa (Ramírez, 2008).

Las flores son polinizadas por los animales, ya sea por abejas, aves, particularmente por colibríes, mariposas, polillas y murciélagos. El hábito epífitos es común en las Gesneriaceae, permitiendo a los animales voladores visitar por polen, néctar y permitir la dispersión de semillas, Sin embargo muchas especies dispersan sus semillas a través de agua y vientos (Woodson & Schery, 1978).

La familia es de distribución pantropical, con cerca de la mitad de sus representantes en el Nuevo Mundo. Muchas se cultivan como ornamentales y algunas tienen reputación de medicinales (Pérez, 2000).

1.5.1. Descripción Botánica de la familia Gesneriaceae

Plantas herbáceas, árboles, arbustos, trepadoras o epífitas. Tallo leñoso o herbáceo, a veces modificados en tubérculos o rizomas escamosos; pubescentes. Hojas simples, usualmente opuestas, algunas veces verticiladas, en ocasiones agrupadas en roseta basal, muy rara vez alternas, en el caso de ser opuestas las de un mismo par a menudo desiguales o subiguales, láminas enteras, aserradas, dentadas o crenadas; pecioladas o a veces sésiles, láminas simples, isófilas o evidentemente anisófilas, enteras o diversamente dentadas, membranosas, carnosas o ligeramente coriáceas, venación pinnadas. Inflorescencias axilares, cimosas o racemosas o flores solitarias. Flores bisexuales, zigomorfas o actinomorfas, gamopétalas o rara vez polipétalas; cáliz 5-mero, tubo corto o largo, erecto u oblicuo, formado por la combinación de la base del cáliz, corola y estambres, lóbulos libres o connatos en la

base, persistentes, iguales o desiguales, de forma variada, enteros o dentados, verdes o coloreados; corola 5-mera, de diversa forma y color, tubo corto o largo, recto o ventricoso o ampliándose gradualmente hacia los lóbulos, base recta, lóbulos iguales o desiguales, a veces 2-labiados, generalmente erectos; estambres 2-5 iguales o didínamos, insertas o exsertas, libres o epipétalos, anteras libres o conniventes, dehiscencia longitudinal o poricida, generalmente un estaminodio; nectario generalmente presente, libre del ovario y formado por 1-5 glándulas libres o connatas de forma diversa o anular, generalmente libre del ovario, conspicuo o inconspicuos; ovario súpero, semi-ínfero o ínfero, 1-locular, 2-carpelar, placentación parietal; estigma 2-lobado o estomatomorfo. Frutos en bayas o cápsulas secas o carnosas; semillas numerosas, pequeñas, oblongas o elípticas, estriadas, pardas, rojizas o negruzcas, usualmente loculicida (Woodson & Schery, 1978).

1.5.2. Descripción botánica del género *Columnnea*

Hierbas perennes suculentos o sufrutescente o pequeños arbustos, tallos a menudo con raíces adventicias en los nudos, epífitas o terrestres, habito erecto, extendido, postrado o péndulos. Hojas opuestas, más o menos peciolados, en el par igual a fuertemente desigual, lámina de diferentes forma, usualmente con indumento característico. Flores axilares, a veces llamativas, más o menos pediceladas, brácteas caducas; cáliz con 5 lóbulos, libre cerca de la base en muchos casos, margen entero a dentado; pétalos 5, zigomorfa, 2 posteriores, 2 laterales y 1 anterior, fusionado a una corola tubular, lóbulos de la corola libre; 4 estambres, anteras coherente en dos pares, exserta o insertas, dehiscencia longitudinal, disco reducido a una simple glándula bilobada; Ovario súpero, unilocular, con 2 placenta parietal, estilo

terminal, estigma bilobado o estomatomorfo, excerto o incluido. Fruto una baya blanca o colorida; semillas pequeñas y numerosas (Woodson & Schery, 1978).

1.6. Planteamiento del Problema

En la actualidad la medicina tradicional ha tomado gran importancia debido a la búsqueda de terapias alternativas, en respuesta a una creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en la cura de algunas enfermedades como por los efectos colaterales que producen ciertos medicamento (Salas, 2006).

Por otra parte Fonnegra & Jiménez (2007) refiere “los problemas de salud y la difícil consecución de los medicamentos sintéticos por su alto costo han llevado a la humanidad a la búsqueda de la medicina tradicional. De esa manera tener acceso al conocimiento de las diferentes propiedades de las plantas medicinales ha vuelto a tener un auge acelerado. Cada día se ubica en un destacado lugar como una de las medicinas alternativas del futuro que garantizan eficacia, seguridad y bajo costo, siempre y cuando sea utilizado en forma adecuada y por personal calificado”

En Panamá la población rural y diversos grupos indígenas tienen acceso limitado a medicamentos modernos, razón por lo que recuren a la medicina tradicional como fuentes de abastecimiento primario para la salud (Gupta, 2013).

Se estima unas 10, 400 especies de plantas en Panamá (Ortiz *et al.*, 2019 y Correa, *et al.*2004)y se desconoce realmente el potencial que pueden representar para la medicina convencional y podrían representar una oportunidad de mercado, como materia prima para su industrialización o como producto terminado, con el consiguiente beneficio del valor agregado en su procesamiento (Gupta, 2013).

Algunas especies de plantas son utilizadas por un sector de la población para el tratamiento de algunas enfermedades comunes, especialmente en la población rural, que ve limitada la oportunidad de utilizar el sistema nacional de salud, tomando un gran valor el uso de este tipo de método alternativo, principalmente en las etnias indígenas, que tienen un gran conjunto de conocimiento cultural sobre este tema (Alfaro, 2009).

El incremento constante de la población, el cambio climático, la sobreexplotación, las pérdidas y transformación de hábitat; la tala de los bosques para el establecimiento de la agricultura, la ganadería y otras actividades antropogénicas, ponen en peligro la cobertura boscosa y las especies de plantas con propiedades medicinales. Por esta razón, es necesario conocerlas y conservarlas, ya que la Comarca Ngäbe-Buglé, es uno de los pocos territorios del país que aún posee bosques primarios, despertando el gran interés en estudiar los componentes químicos de las plantas medicinales (Morales, 2015).

El propósito de este trabajo es proponer y brindar alternativas para el uso más eficiente de las especies de *Columnea* utilizadas en etnobotánica.

1.7. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

El uso correcto de productos de buena calidad también contribuye en gran medida a la reducción de los riesgos asociados con los productos de la medicina tradicional. Sin embargo, la normativa y el registro de medicinas basadas en hierbas no están todavía bien desarrollados en muchos países (O.M.S., 2002) y sobre todo en Panamá. Alfaro (2009) refiere "existe una gran cantidad de documentación sobre el uso de plantas medicinales pero carecen de una base científica sobre las propiedades que realmente poseen y que merecen estudios químicos preliminares para conocer sobre su veracidad".

Las plantas representan una fuente valiosa de nuevos agentes, por lo tanto proporcionan un reservorio explotable, razón por la cual esta investigación jugará un papel importante en enriquecer el conocimiento actual sobre la fitoquímica y el uso medicinal de la flora panameña (Gupta, 2013).

En la actualidad hay una limitada documentación científicamente sustentada, sobre la identificación de las especies, sus características, la domesticación y el uso tradicional de plantas medicinales, generándose la necesidad de documentar estos temas para reducir el riesgo de pérdida del conocimiento popular sobre los recursos de nuestra flora (Alfaro, 2009).

La población actual han aumentado el uso de plantas medicinales, bajo la creencia de que son inofensivo por ser naturales; es lamentable esta falsa creencia ya que al igual que los medicamentos comerciales pueden producir efectos secundarios,

cuadro de toxicidad y problemas de interacciones con los medicamentos y si el paciente está en tratamiento terapéuticos con farmacología alopático (Hall, *et. al.* 2002).

La mayoría de las comunidades dentro de la Comarca no cuentan con centro de salud digno y para la atención primaria de la salud. Las especies de *Columnea* son ampliamente utilizados en la medicina tradicional para contrarrestar diversas enfermedades, razón por la cual el objeto de estudio de esta investigación es conocer su composición y sus propiedades químicas para sustentar las aplicaciones de las plantas con bases científicas.

En la Comarca Ngäbe-Buglé, la medicina tradicional es el primer remedio para abastecer las necesidades de la salud. Para ello los médicos tradicionales usan diversas plantas para ayudar a la población y curar las enfermedades más comunes. Sin embargo este conocimiento medicinal es empírico ya que no hay una base científica que confirme su potencial (Rodríguez, 2011).

Con este estudio se podrá contribuir a la veracidad y al uso adecuado de las plantas medicinales e ir seleccionando las especies con mayor potencial medicinal, su posible utilidad económica, prevenir riesgo de uso inadecuado en el futuro y contribuir a la conservación de las mismas.

1.8. Objetivo de la investigación

1.8.1. Objetivo general

Determinar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos de hojas y tallos de las especies *Columnnea billbergiana*, *Columnnea zebrina*, *Columnnea maculata* y *Columnnea nicaraguensis*.

1.8.2. Objetivos específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicos de las especies de *Columnnea* spp.
- Determinar mediante tamizaje fitoquímico los principales metabolitos secundarios presente en las hojas y tallos de las especies de *Columnnea* spp.
- Identificar los metabolitos aislados mediante CCF, espectroscopia FT-IR, UV-vis.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección y recolección de muestras

La investigación se realizó en la región Ño Kribo, Corregimiento de Kankintú, Distrito de Kankintú, Comarca Ngäbe-Buglé, a una altitud aproximada de 52-540 m.s.n.m. con las coordenadas geográficas: 08°51'00.0" N y 081°51'01.0" W y 08°47'52.2" N y 081°53'49.2" W (Figura 3)

El corregimiento de Kankintú se encuentra en la zona de vida de Bosque muy Húmedo Tropical con una temperatura promedio de 26 °C y una precipitación anual de 3.800-4.000 mm (Tosi, 1971).

El sitio de muestreo fue aleatorio y se recolectaron "500" g de hojas y tallos respectivamente de especies de *Columnnea* spp., en buen estado. Las muestras se colocaron con las ramas enteras dentro de una bolsa negra debido a la distancia del viaje (para evitar que se dañe), envuelto con papel periódico humedecido y colocada dentro de un Cooler; En el laboratorio, estas fueron colocadas en bolsas tipo ziploc de polietileno con cierre hermético debidamente codificados para sus correspondientes análisis en el laboratorio del Centro de Investigaciones de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) para hacer las respectivas extracciones y análisis correspondientes.

La identificación taxonómica se realizó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UCH) por el M. Sc Rafael Rincón. Se corroboró con los especímenes TIPO de JSTOR.

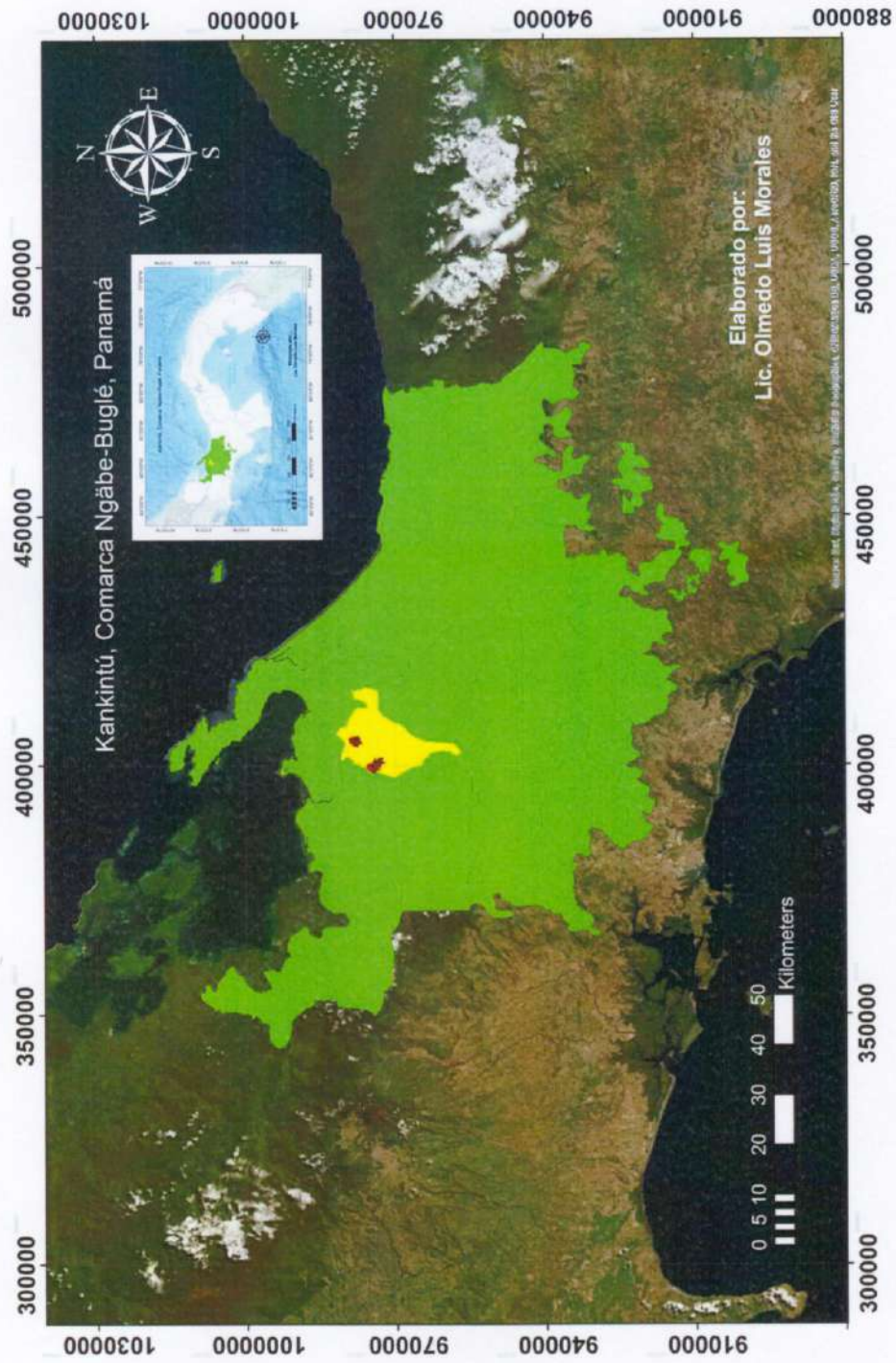


Figura 3. Mapa del corregimiento de Kankintú, Distrito de Kankintú, Comarca Ngäbe-Buglé (Morales, 2018)

Especies de *Columnea* estudiadas



Figura 4: *Columnea nicaraguensis* Oerst.,
Foto : Morales 2017



Figura 5. *Columnea maculata* C.V. Morton.
Foto : Morales 2017



Figura 6; *Columnea zebrina* Raymond
Foto : Morales 2017



Figura 7: *Columnea billbergiana* Beurl
Foto : Morales 2017

Cuadro 1. Equipos y reactivos para la determinación de metabolitos secundarios en los extractos etanólico y acuoso.

CRISTALERIA		SOLVENTES Y REACTIVOS		OTROS	
N°	Material	Vol.		Cont.	Material
1	Vaso químico de 250 mL	12 L	Etanol al 95%	1	Gradilla
2	Vaso químico de 100 mL	8 mL	Cloroformo	1	Plancha de calentamiento
1	Vaso químico de 150 mL	7 L	Hexano al 95%	2	Pinzas para tubos de ensayo
5	Vaso químico de 20 mL	15 mL	Metanol	1	Micropipeteador
2	Vaso químico de 5 mL	15 mL	n-butanol		Agua destiladas
6	Tubos de ensayo de 20 mL	5 mL	Tolueno		Papel filtro
24	Tubos de ensayos de 10 mL	25 mL	Ácido acético		Cromatoplaca para CCF
			Hidróxido de amonio		Silicagel 60 F ₂₅₄
2	Pipetas de 1 mL		Acetato de etilo	1	Lámpara UV 254 y 366 nm
2	Pipetas de 2 mL		Anhidrido acético		Masking tape
2	Pipetas de 5 mL				Gradilla
2	Pipetas de 10 mL	10 mL	HCl al 2%		Atomizador
1	Contenedor de cromatoplaca	5 mL	HCl concentrado		Cromatocámara
	Probeta 10, 50, 100 mL	12 mL	KOH 0.5 M		Espectrofotómetro UV-Vis
	Estándares		Reactivo de Shinoda		Espectrofotómetro IR
	Solución de taninos		Reactivo Liebermann-Bouchard		Balanza analítica
	Solución de saponinas		Reactivo de Wagner		Rotavapor Büchi
			Magnesio metálico		
			Reactivo de Mayer		
			Reactivo de Wagner		
			Reactivo Dragendorff		
			FeCl ₃ 1 %		
			Solución gelatina a 1% (p/V)		
			Ácido sulfúrico concentrado		
			Reactivo de Rosenthaler		
			Reactivo de Pew's		
			Reactivo de Baljet		
			Reactivo Dimroth		
			Reactivo de Salkowski		
			H ₂ SO ₄ concentrado		
			H ₂ SO ₄ 85%		
			Solución de Urea 10M		
			Ácido bórico		

Equipo de seguridad personal: bata, guantes, lente, mascarilla para gases.

2.2. Obtención de extractos vegetales

En el laboratorio se seleccionaron cuidadosamente hojas y tallos en buen estado luego fueron lavadas con agua destilada para su posterior extracción; se utilizaron dos disolventes: agua y etanol al 70% (polar) todos por triplicados.

De cada hoja se midieron de largo, ancho y el grosor utilizando un calibrador vernier, luego se colocaron aproximadamente 50 g de muestra de hojas y 50 g de tallos fresco respectivamente en envase de vidrio previamente rotulado, se le añadieron aproximadamente 250 mL de etanol al 70% a cada réplica. Estos envases con las muestras más etanol fueron cubiertos con papel aluminio y colocados en oscuridad durante ocho días, y fueron agitados diariamente durante 15 minutos.

Para la extracción acuosa se utilizaron 150 mL de agua destilada y luego las hojas calentaron por unos 30 minutos para extraer los componentes y se decantaron los extractos obtenidos y almacenados bajo refrigeración. Para ambos métodos de extracción se siguieron la metodología de Morales, (2013); Henríquez, (2014); Cano, (2015). Aunque con la extracción acuosa se pretendía replicar lo más similar posible el método empleado por los médicos tradicionales en la Comarca Ngäbe-Bugle, para la obtención de sus pócimas de las plantas medicinales en donde no solo utilizan agua caliente sino también agua sin calentar (Información personal).

Pasado los ocho días en extracción se decantaron los extractos y se concentraron en el Rota-vapor modelo Buchi R210 (a 45° y 56 bares) del CIPNABIOT de la Universidad Autónoma de Chiriquí. El concentrado resultante fue pesado en una balanza de precisión KERN EW 600-2M (d=0.01; 0.1 g) y depositados en viales de vidrio (con sus respectivos etiquetas) y bajo refrigeración.

2.3. Análisis físico químico

2.3.1. Porcentaje de humedad:

El porcentaje de humedad es el contenido de agua presente en una muestra. Para determinar el porcentaje de agua, se pesaron aproximadamente 50 g de muestras de hojas y tallos frescos y secados a 105 C en un horno SELECTA DIGITRONIC durante 2 horas. Después fueron pesaron en una balanza de precisión KERN EW 600-2M (d=0.01; e= 0-1g) y se calcularon el porcentaje de agua en cada muestra con la siguiente formula (Riaño *et al.*, 1999).

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{peso húmedo (g)} - \text{peso seco (g)}}{\text{peso de la muestra fresca (g)}} \times 100$$

2.3.2. Porcentaje de extracción

El porcentaje de extracción es la eficiencia del método de extracción y de los disolventes utilizados para obtener el concentrado de interés (Batanero & Medel, 1985). Se pesaron 50 g de muestras de hojas frescas y después se concentró en rota-vapor. Se calcularon los %-R de los extracto acuoso y etanólico, de hojas y tallos de especies de *Columnea* (Morales, 2013)

$$\% \text{ de R.} = \frac{\text{peso de la muestra después de concentrado (g)}}{\text{peso de la muestra fresca (g)}} \times 100$$

2.3.3. Análisis de pH

El potenciómetro fue calibrado utilizando buffer adecuado (pH 4, pH 7, pH 10), luego se determinó el pH de los extractos etanólico y acuoso de las hojas y tallos de *Columnea*, utilizando un potenciómetro pH 1100 Series Oaklon (Erazo, 2013)

2.3.4. Análisis de sólidos totales disueltos o grado Brix

El refractómetro digital es un medidor de mano, resistente al agua, para determinar el contenido de azúcar con un rango de medición de 0-85 % Brix. En la pantalla LCD del refractómetro digital se muestra el resultado de la medición y la temperatura del material a medir. Dependiendo del tipo de refractómetro se realiza la medición de sacarosa, fructosa, glucosa o azúcar invertido, rápido y fácil, con sólo dos gotas de la muestra del líquido. Se agregaron dos gotas de los extractos obtenidos en el Refractómetro Digital HI 96801y se leyeron las lecturas dadas (Herrera, 2011).

2.4. Determinación de metabolitos específicos o secundarios

Para determinar los metabolitos presentes en los extractos vegetales primero se realiza un análisis denominado tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico; Estos tamizaje son ensayos de tipo cualitativo que permiten la identificación de los metabolitos mayoritarios presentes en una muestra por estudiar, es por lo general la presencia de determinados compuestos específicos derivados del metabolismo secundario de la planta; Las pruebas para el tamizaje fitoquímico comprenden reacciones de identificación (coloreadas, de precipitación, fluorescencia, microsublimación).

El procedimiento es agregar de 2 a 5 mL del extracto líquido en los tubos de ensayo para luego añadir de tres (03) a cinco (5) gotas de los reactivos para la identificación de los metabolitos. Estos ensayos se pueden verificar sobre la misma droga; en forma entera, pulverizada o como es más frecuente en extractos que se pudieron obtener de diferentes procedimientos de extracción de la planta y con diferentes solventes.

2.4.1. Tamizaje fitoquímico para extractos acuosos y etanólico

A los extractos se realizaron tamizaje fitoquímico preliminar basado en la propuesta de García *et al.*, (2019), Marcano (2002), Bilbao (1997), Domínguez (1973) donde se les realizaron una serie de pruebas con diferentes reactivos indicadores para identificar los principales grupos funcionales como taninos, terpenos, fenoles, saponinas, alcaloides, cumarinas y glucósidos (Morales, 2013 & Henríquez, 2014).

2.4.1.1. Prueba para la Identificación de flavonoides

Durante el desarrollo de las plantas se condensan una gran diversidad de elementos fenólicos, estos compuestos son productos de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico; se puede señalar dentro de este tipo de metabolitos, caracterizada por su organización, a las antraquinonas, naftoquinonas y taninos, este último es condensado de un flavonoide como la antocianidina y si es hidrolizable de ácidos fenólico (García *et al.*, 2019 y Tang *et al.*, 2009)

2.4.1.1.1. Prueba con reactivo de NaOH

La prueba comenzó con agregar extractos en la placa de porcelana o tubo de ensayos, a estos extractos se agregaron dos gotas de NaOH diluido, todo por triplicado. La aparición de colores amarillo a naranja se consideró positiva (Henríquez, 2014).

2.4.1.1.2. Prueba con reactivo de Pew's

En tres tubos de ensayo con los extractos se le agregaron polvo de zinc y dos gotas de HCl 5 N. Los dihidroflavonoles reaccionan dando colores del rojo púrpura al rojo cereza. Las flavonas y dihidrocharconas dan coloración rosa a café indicando la prueba positiva (Henríquez, 2014; Morales, 2013).

2.4.1.1.3. Prueba con reactivo de Shinoda

En tres tubos de ensayos con los extractos se le agregaron un trozo de viruta de magnesio, se aplicó calor (60°C) y después dos gotas de HCl concentrado en las paredes del tubo de ensayo (Henríquez, 2014). Serán flavonas si se presenta una coloración roja, azul o violeta. Si en este caso la coloración fuera amarilla, entonces sería isoflavonas. Se deduce que son isoflavononas, chalconas y auronas para si el caso fueran incoloras (García *et al.*, 2019).

2.4.2. Prueba para identificación de terpenos/esteroides: (Reacción de Salkowski)

Con 1 mL de cloroformo se mezclaron los extractos y luego se añadirán 1 mL de ácido sulfúrico 85% que se dejó deslizar lentamente por las paredes del tubo de ensayo hasta que se mezcle con la solución. La formación de colores amarillo a rojo indica la prueba positiva (Morales, 2013)

2.4.3. Prueba para identificación de triterpenos

En 1 mL de cloroformo se mezcló 2 ml de cada extracto, luego se le agregó por las paredes del tubo de ensayo 1 mL de anhídrido acético y se dejó reposar en frío por unos 10 a 15 minutos, para posterior añadirle una a dos gotas de H₂SO₄ concentrado por las paredes del tubo. La formación de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase cuando se le agrega H₂SO₄, se considera positivo (Sarkar *et al.*, 2015).

2.4.3.1. Prueba con reactivo de Lieberman-Buchard

Para prepara este reactivo se agrega una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo. Se agregó dos gotas del reactivo de

Lieberman-Buchard a los tubos de ensayo con los extractos de las hojas y tallos. El cambio de un color azul o verde indica la presencia de esteroides, colores del rojo al violeta indica la presencia de triterpenos y el color amarillo pálido presencia de esteroides y triterpenos saturados (Paredes & Solar, 2007; Gonzales, 1995).

2.4.4. Prueba para identificación de alcaloides

2.4.4.1. Prueba de Mayer:

Los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol (Martínez *et al.*, 2003)

Se tomaron tres tubos de ensayo y se le agregaron 2 ml de cada extracto y se le agregaron HCl. Luego se le agregó el reactivo de Mayer. Si se observaba un precipitado la prueba se considera positiva.

2.4.4.2. Prueba de Dragendorff

La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona esta reactivo a una solución ácida de alcaloides; De los precipitados lavados se puede recuperar los alcaloides con una solución saturada de carbonato de sodio. Algunas sustancias oxigenadas con alta densidad electrónica como es el caso de las cumarinas, chalconas, maltol, acetogeninas, etc, pueden dar falsos alcaloides con el reactivo de Dragendorff (Martínez *et al.*, 2003).

Se tomaron tres tubo de ensayo y se le agregaron 2 mL de cada extracto más HCl concentrado, luego se le añadieron 1 mL del reactivo de Dragendorff, si se observaba un precipitado la prueba se considera positiva.

2.4.4.3. Prueba de Wagner

En tres tubos de ensayo se disolvieron 2 mL de los extractos con HCl concentrado. Luego se le añadió el reactivo de Wagner; la presencia de un precipitado se considera positiva.

2.4.4.4. Prueba de Hager

El reactivo de Hager: consiste en una solución saturada de ácido pícrico en agua, este reactivo precipita la mayoría de los alcaloides, los picratos se pueden cristalizar y ello permite por medio de resinas intercambiadoras, separar los alcaloides.

Para este ensayo se disolvió 2 mL de cada extracto en HCl concentrado. Luego se le añadió el reactivo de Wagner. Si se lograba observar un precipitado, la prueba se consideraba positiva (Martínez *et al.*, 2003)

2.4.5. Prueba para identificación de taninos

2.4.5.1. Prueba de la gelatina-sal:

Se utilizaron tres tubos de ensayo, en cada uno se agregó 0.5 ml de cada extracto a evaluar y posteriormente se le añadió 1 mL de reactivo de gelatina-sal (solución de gelatina 1% en NaCl al 10%). Si se formaba un precipitado el ensayo se consideraba positivo. Si se formaba el precipitado se le agregaba 0.5 mL de urea 10 M y dos a tres gotas de Cloruro férrico. Si el precipitado se tornaba verde se confirma la presencia de taninos condensados, si tornaba azules entonces se considera la presencia de taninos hidrolizables.

2.4.5.2. Prueba de FeCl₃:

En tres diferentes tubos de ensayo con los extractos de tallos y hojas se le agregará 1 mL de FeCl₃. Si se lograba observar un precipitado la prueba se considerará positiva. Los taninos condensados forman un precipitado de color pardo-verdoso, mientras que los hidrolizables se torna de color azul-negrucza.

2.4.6. Prueba para identificación de cumarinas

Tres tubos de ensayos con los extractos (tapado con papel filtro e impregnado de una solución de NaOH) fueron calentados. Si el papel filtro exhibía puntos fluorescentes bajo luz UV se considerará positiva.

2.4.7. Prueba para identificación de saponinas

Las saponinas esteroidales se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímico preliminares mediante los ensayos de espuma y Liebermann-Bouchard.

2.4.7.1. Ensayo de agua caliente o ensayo de espuma

Se disolvieron 2 mL de los extractos con agua caliente durante 15 a 30 minutos, luego se agitaron durante 3 a 5 minutos. La formación de espuma de panal de abeja, estable por 30 minutos de consideraba positiva.

2.4.7.2. Prueba Rosenthaler

Se le agregó una gota de reactivo de Rosenthaler en 1 mL de cada extracto y una gota de H₂SO₄ concentrado. La aparición de un color violeta indicará la prueba positiva (Paredes & Solar, 2007).

2.4.8. Prueba para identificación de glucósidos cardiotónicos y lactosas sesquiterpénicas (Prueba de Baljet).

En tres tubos de ensayo con 2 mL de cada extracto se le agregaron tres a cuatro gotas del reactivo del Baljet. La presencia de color naranja a rojo oscuro indicaba la prueba positiva (Henríquez, 2014).

2.4.9. Identificación de grupos 5_hidroxi flavonas (Prueba de Dimroth)

En tres tubos de ensayos con 1 mL de los extractos se le agrega 1 mL de reactivos de Dimroth. La presencia de un color naranja o roja se consideraba positiva (Henríquez, 2014).

2.4.10. Técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

2.4.10.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Es la técnica de separación en la que la fase estacionaria está sobre un plano formando una capa de partículas sólidas extendida sobre un soporte, tal como una placa de vidrio; la muestra es aplicada en puntos o en banda, para posteriormente ser eluida dentro de un tanque cromatográficos (Martínez *et al.*, 2003)

La cromatografía en capa fina como método cualitativo y cuantitativo, siempre requiere contar con un estándar de referencia para comparar su valor de factor de retardo (Rf) y el color de la mancha del estándar al ser revelada con agentes químicos, con los datos experimentales obtenidos.

Se recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un Rf medio en torno a 0.3-0.5. Para compuestos poco polares, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se

aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano/metanol en distintas proporciones.

Se prepararon placas de Silica gel de cromatografía de aproximadamente 7 a 15 cm de largo, luego se marcaron una línea base de un centímetro. Sobre esta línea base se marcaron tres puntos, donde se depositaran con capilares pequeñas cantidades (μL) de los extractos de hojas y tallos de cada disolvente: etanol y acuoso.

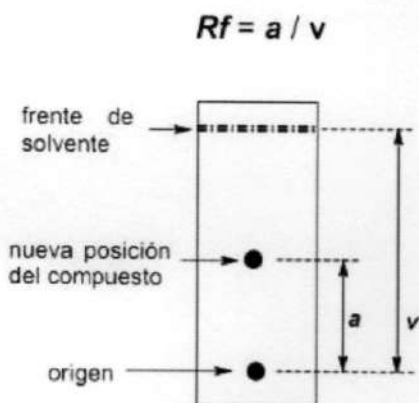


Figura 8. Diseño experimental para CCF

Polaridad	Orden de elución	Tipo de compuesto
Menor	Menor retención	Alcanos Alquenos Eteres Derivados halogenados Aldehidos y cetonas
Mayor	Mayor retención	Esteres Aminas Alcoholes Fenoles Acidos carboxilicos

Figura 9: Posible movimiento de solutos según su polaridad. Tomado de <http://www.qfa.uam.es/qb/practicas/P6-guion.pdf>

Se utilizaron varios eluyente de mezcla de diferentes solventes hasta encontrar la fase móvil deseado, entre ellos están acetato de etilo, metanol, cloroformo ciclohexano entre muchos otros disolventes, para identificar la polaridad de los compuestos presentes en cada extracto.

Posteriormente las placas fueron colocadas en el disolvente por 30 minutos, se retiraron de la cámara y se dejaron secar, luego se marcaron la distancia recorrida por el disolvente. Las placas se colocaron en una lámpara de rayos UV a los 365 nm y los

brillos fluorescentes que aparecían se señalaron con lápiz, luego se utilizó como revelador reactivo de Dragendorff y Vainillina (Freire & Vistel, 2015; Cabrera *et al.* 2013).

Posteriormente se identificaron los factores de retención (Rf) de cada marca señalada. La Rf es la manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa y mide la retención de un componente. Se define como: la distancia recorrida por el compuesto, que se mide generalmente desde el centro de la mancha original hasta donde se ha desplazado, sobre la distancia del frente del disolvente o fase estacionaria.

Para que los Rf sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (Espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de Rf que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un Rf entre 0.65 y 0.70 (Erazo, 2013; Morales, 2013). Los Rf se calculan con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{a}{v}$$

Donde (a) es la distancia recorrida por la muestra desde el punto de aplicación hasta el punto final del recorrido.

Según Rodas, (2004) para determinar algunos metabolitos como flavonoides utilizando la CCF se aplican 25-30µL en cromatoplaque de silicagel 60 F254 y se utilizan unos estándares como soluciones de flavonoides que en este caso sería la quercetina en metanol (10µL), donde recomienda como fases móviles: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético en proporción de 100:11:11., que se emiten fluorescencia intensiva en UV-365 nm.

Y para la prueba la identificación de saponina Rodas recomienda aplicar 10 mL, concentrar a 5 mL y aplicar 25-40 μ L en cromatoplaaca de silicagel 60F254. Como estándar solución de saponinas al 0.1 % en metanol (10 μ L) como fases móviles: Cloroformo-metanol-agua (64:50:10), o n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40) para la detección reactivo de Liebermann-Bouchard: UV 365 nm o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides; además se puede utilizar reactivo de Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehido-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillas. Cabe destacar que estas recomendaciones no son algo verídico y certero para todas las muestras.

2.4.10.2. Espectrofotometría UV-vis

Se realizaron lecturas (barrido general) de los extractos etanólico y acuoso de las hojas y tallos de *Columnnea* spp en el espectrofotómetro ultravioleta visible (modelo UV-UIS Dual Bean UVS-2800; GENESYS 10S UV-Vis).

2.4.10.3. Espectroscopía infrarroja (IR)

Para el IR se realizaron análisis en el espectrofotómetro Infrarrojo IR Affinity-1 FTIR-8400S con la ayuda del técnico del laboratorio. Las lecturas en el Espectrofotómetro Infrarrojo se realizaron con el Software IR Solution en el Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) de la Universidad Autónoma de Chiriquí (Morales, 2013, Cano, 2015).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados y discusión

Obtención de extractos etanólico y acuoso de tallos y hojas de cuatro especies de *Columnnea*

Para la extracción de los compuestos con etanol, se obtuvieron extracto de color chocolate para hojas y amarillas para tallos en todas las especies (Figura 10); Sin embargo, los extractos acuosos presentaron coloraciones muy variadas tanto en tallos como en hojas. Ejemplo de ellos los extractos de hojas de *Columnnea maculata* y *Columnnea zebrina* presentó coloración rojo-vino y los extractos de tallos fueron de color amarillos (Figura 11), esto era de esperarse ya que las hojas de estas dos *Columnnea* poseen manchas marrones en los ápice de las hojas, en comparación con las otras dos especies que no poseen manchas marrones en las hojas, por lo tanto su extracto presentó color chocolate.



Figura 10. Extracto etanólico de tallos y hojas de *Columnnea* spp



Figura 11. Extracto acuoso de tallos y hojas de *Columnnea* spp.

Análisis fisicoquímico de los extractos etanólico y acuoso

Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad es la cantidad de agua disponible en las plantas, sin embargo las plantas epífitas como la familia Gesneriaceae y otras especies deben poseer un mecanismo mucho más eficiente; hay especies que acumulan agua en tubérculos y tallos suculentos de muchas especies como orquídeas y cactus (DE ERRATAS, 1985).

Sin embargo, las cuatro especies de *Columnea* estudiada acumulan agua en sus tallos huecos con muchas células llamadas parénquima acuíferos, además existen otros aspectos importantes que contribuyen a la eficiencia en el uso de agua y nutrientes son la morfología, fisiología y la anatomía de las epífitas (Hernández-Rosas, 2004).

Con los valores obtenidos se aplicó análisis estadísticos utilizando el software SPSS versión. 24.0., y se obtuvo que la razón-F, que en este caso es igual a 112.45, sea el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos, donde se obtuvo que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, ($P= 0.00 < 0.05$) existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 muestras con un nivel del 95.0% de confianza.

En el gráfico de cajas y bigotes (cuadro 2 y figura 12) se puede observar con claridad donde todos los valores para hojas de las cuatro especies presentaron alto contenido de agua (arriba de los 80%) y el contenido de agua en los tallos se encuentran por encima de los 70%, lo cual indica que en estas especies los tallos presentan altos contenidos de agua casi igual que las hojas; en el laboratorio, se pudo observar en

corte transversal (Anexo , figura 35, B y D), que los tallos son semihuecos y con alto contenido de agua, al igual que en corte transversal de hojas.

El valor promedio de cantidad de agua obtenido para los órganos de estas especies están dentro del rango establecido según Azcón (2003) donde el porcentaje de agua es aproximadamente un 80-90% del peso fresco en la mayoría de las hojas y más del 50% de las partes leñosas.

Cuadro 2: Valores estadísticos para contenido de agua en hojas y tallos de las cuatro especies de *Columnea*.

Especies	N	Promedio	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Varianza
<i>C. maculata</i> /hojas	8	88.90±0.70	0.78%	87.58	89.56	1.98	0.48
<i>C. maculata</i> /tallos	8	76.11±1.37	1.80%	74.15	77.82	3.67	1.87
<i>C. nicaragüenses</i> /hojas	8	87.37±0.79	0.91%	86.08	88.36	2.28	0.63
<i>C. nicaragüenses</i> /tallos	8	77.81±1.58	2.03%	75.83	80.32	4.49	2.49
<i>C. zebrina</i> /hojas	8	85.76±0.21	0.24%	85.5	86.17	0.67	0.04
<i>C. zebrina</i> /tallos	8	73.97±3.63	4.91%	67.94	78.2	10.26	13.18
<i>C. billbergiana</i> /hojas	8	90.15±2.11	2.34%	87.67	92.21	4.54	4.44
<i>C. billbergiana</i> /tallos	8	78.07±0.56	0.72%	77.25	78.9	1.65	0.31
Total	64	82.27±6.26	7.61%	67.94	92.21	24.27	39.24

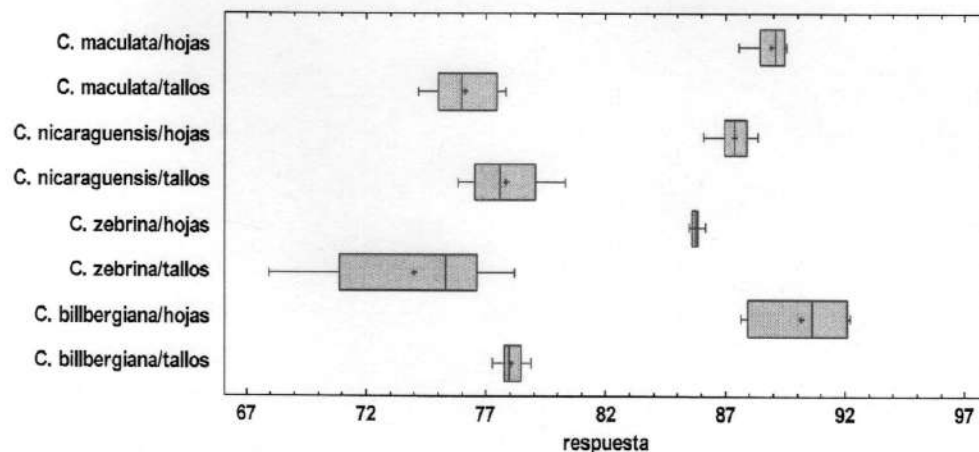


Figura 12: Gráfico de cajas y bigotes para representar el porcentaje de humedad en hojas y tallos para las cuatro especies de *Columnea*.

Determinación de sólidos solubles disueltos y potencial de hidrógeno (Grados Brix y pH)

A todos los datos se realizó prueba de normalidad para escoger el análisis estadística, correcto. Se utilizó Prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad ya que la $n=35$ (Cuadro 4.), donde se prueba la siguiente hipótesis:

Prueba de Shapiro-Wilks (W):

Hipótesis nula (H₀): la distribución de los datos para grado Brix y pH es normal (los datos de las muestras **proviene**n de una población con distribución normal)

Hipótesis alterna (H_a): la distribución de los datos para grado Brix y pH no es normal (los datos de las muestras **NO** **proviene**n de una población con distribución normal)

- Se rechaza H₀, si $P < 0.05$
- Se acepta H₀, si $P \geq 0.05$

Cuadro 3: Estadísticos descriptivos para porcentaje de sólidos totales disueltos (grado Brix) de los extractos etanólico y acuoso de hojas y tallos de *Columnea* spp.

Resumen estadísticos							
	Especies de plantas	N	Promedio	Mínimo	Máximo	Rango	Varianza
Grado Brix de hojas para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	30	1.32 ± 0.22	1.00	1.80	0.80	0.047
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	1.25 ± 0.17	0.90	1.60	0.70	0.028
	<i>Columnea zebrina</i>	30	1.22 ± 0.18	0.90	1.53	0.63	0.031
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	0.85 ± 0.29	0.50	1.30	0.80	0.082
Grado Brix de hojas para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	30	0.95 ± 0.23	0.70	1.50	0.80	0.054
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	0.95 ± 0.27	0.60	1.40	0.80	0.074
	<i>Columnea zebrina</i>	30	0.91 ± 0.28	0.30	1.30	1.00	0.076
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	0.91 ± 0.27	0.50	1.40	0.90	0.073
Grado Brix de tallos para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	30	0.64 ± 0.10	0.50	0.80	0.30	0.010
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	0.48 ± 0.14	0.30	0.80	0.50	0.020
	<i>Columnea zebrina</i>	30	0.62 ± 0.25	0.10	1.17	1.07	0.064
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	1.04 ± 0.18	0.60	1.30	0.70	0.033
Grado Brix de tallos para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	30	0.84 ± 0.19	0.50	1.20	0.70	0.034
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	1.06 ± 0.28	0.70	1.60	0.90	0.077
	<i>Columnea zebrina</i>	30	0.86 ± 0.25	0.20	1.10	0.90	0.060
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	1.26 ± 0.62	0.10	1.90	1.80	0.385

Cuadro 4 . Prueba de normalidad para grado Brix de los extracto acuoso y etanólico de hojas y tallos de *Columnea* sp.

Prueba de normalidad para grado Brix				
	Especies de plantas	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	GI	Sig.
Grado Brix de hojas para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	0.887	30	0.004
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.934	30	0.063
	<i>Columnea zebrina</i>	0.924	30	0.035
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.787	30	0.000
Grado Brix de hojas para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	0.829	30	0.000
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.868	30	0.001
	<i>Columnea zebrina</i>	0.947	30	0.141
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.921	30	0.029
Grado Brix de tallos para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	0.861	30	0.001
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.904	30	0.010
	<i>Columnea zebrina</i>	0.939	30	0.088
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.921	30	0.028
Grado Brix de tallos para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	0.853	30	0.001
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.878	30	0.003
	<i>Columnea zebrina</i>	0.838	30	0.000
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.860	30	0.001

Interpretación de la prueba de normalidad para grado Brix

Dado que los resultados para la prueba de normalidad arrojaron que NO todos los datos para grado Brix siguen una distribución normal, se procedió aplicar estadístico NO paramétrica para contrastar la hipótesis basada en la igualdad de media entre los datos. Con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se rechazó la hipótesis nula (H_0) para todos los datos, excepto para extracto acuoso de hojas de *columnea nicaguensis* ($P=0.063$), extracto etanólico de hojas de *Columnea zebrina* ($P=0.141$) y extracto acuoso de tallos de *Columnea zebrina* ($P=0.088$); lo cual indica que provienen de una población con distribución normal (Cuadro 4). Los datos presentan distribución normal y distribución NO normal por lo tanto para aplicar un estadísticos es necesario unificar criterios. Lo que indica aplicar una prueba no paramétrico U de Mann-Withnney para responder la siguiente hipótesis que se plantea:

➤ **Hipótesis para contrastar la media entre extracto acuoso y extracto etanólico**

• Hipótesis nula (H_0): NO existe diferencia significativa entre la media de extracto acuoso de hojas y tallos **con respecto a** la media de extracto etanólico de hojas y tallos de *Columnea* sp.

• Hipótesis alterna (H_a): Existe diferencia significativa entre la media de extracto acuoso de hojas y tallos **con respecto a** la media de extracto etanólico de hojas y tallos de *Columnea* sp.

Decisión

Se rechaza H_0 , si $P < 0.05$ y Se acepta H_a

Se acepta H_0 , si $P \geq 0.05$ y se rechaza H_a

Cuadro 5: Estadístico U de Mann-Whitney para grado Brix de extracto acuoso y etanólico de las especies de *Columnea* sp.

		Rangos		Prueba U de Mann-Whitney	Sig.
	Tipo de extracto	N	Rango promedio		
Grado Brix de hojas	Extracto acuoso	120	147.05	4013.50	0.000
	Extracto etanólico	120	93.95		
	Total	240			
Grado Brix de tallos	Extracto acuoso	120	91.10	3671.50	0.000
	Extracto etanólico	120	149.90		
	Total	240			

Interpretación de la prueba U de Mann-Whitney

Con esta prueba se concluye que se rechaza la hipótesis nula (H_0) ya que el valor P (Significancia asintótica bilateral) calculado es menor que 0.05 ($P=0.000$) por lo tanto existe evidencia estadística para concluir que hay diferencia significativa entre la media de los extractos acuoso con respecto a la media de los extractos etanólico. Para determinar cuál media es significativamente diferente de otra, se realizó gráfico de Caja

y Bigotes (Figura 13, 14). En general esta gráfica demuestra mayor media para grado Brix de hojas de extracto acuoso (caja azul) con respecto al extracto etanólico (caja amarillo); lo que podría ser interpretado como mejor extracción de metabolitos secundarios en hojas utilizando como disolvente agua caliente o los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en hojas presentan polaridad similar al del agua. En cambio si observamos la figura 14, el gráfico de cajas y bigotes de tallos para ambos extractos, notamos que la media del extracto etanólico es mayor que la del extracto acuoso lo que podría ser explicado en basa a la polaridad del metabolitos secundarios mayoritarios presenten en tallos y que se extraen mejor con etanol y que es afín con la polaridad de dicho solvente.

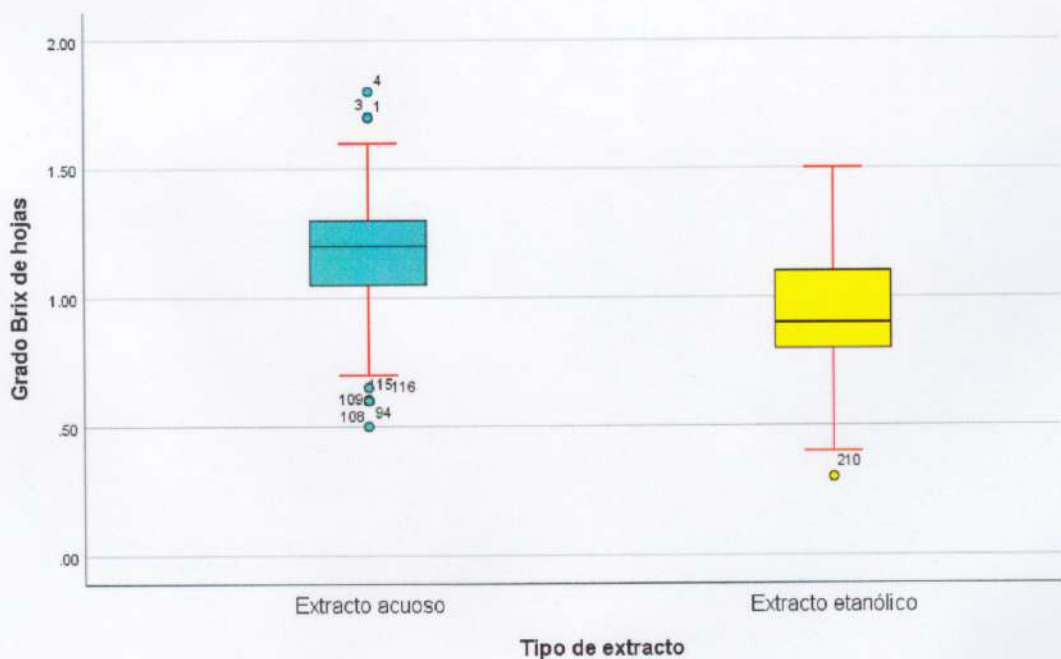


Figura 13: Gráficos de cajas y bigotes para representar la media de grado Brix de hojas de los extracto acuoso y extracto etanólico de las especies de *Columnnea* sp.

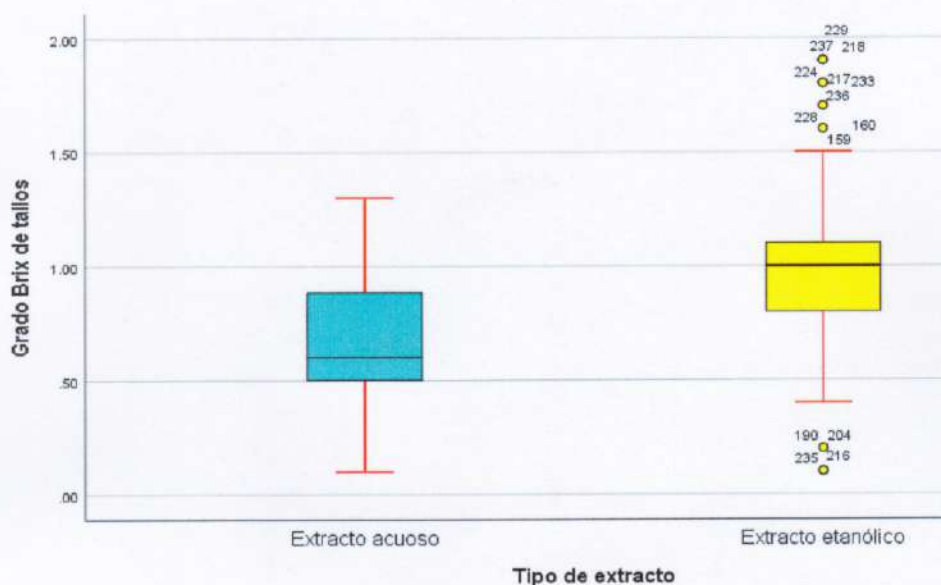


Figura 14: Gráficos de cajas y bigotes para representar la media de grado Brix de tallos de los extracto acuoso y extracto etanólico de las especies de *Columnea* sp.

En las figuras 15 y 16 se representa la media de grado Brix para los extractos de tallos y extractos de hojas por separado, tanto para extracto acuoso, como para extracto etanólico. Estas figuras representan mejor la diferencia entre las especies.

En el extracto acuoso la *C. maculata* presenta una media mayor y *C. billbergiana* con una media menor ambos para extractos de hojas; esta diferencia no tiene nada que ver con el tamaño ni la coloración de las hojas como se podría pensar, ya que la *C. maculata* tiene las hojas más grande (~23+ cm de largo) y con manchas marrones desde la mitad hacia el ápice y *C. billbergiana* es más pequeña entre 2-4 cm de largo sin manchas marrones. Por otra parte las hojas de *C. nicaraguensis* mide aproximadamente de 5-12 cm de largo y la media del grado Brix para ésta, es mayor que la *C. zebrina* que tiene hoja entre 13-15 cm de largo y con coloración marrones hacia el ápices. Las especies *C. maculata* y *C. nicaraguensis* presentan mayor media en el extracto acuoso.

Sin embargo los extracto de hojas de *C. zebrina* y *C. billbergiana* en etanol, presentó mayor media que las *C. maculata* y *C. nicaraguensis*.

A diferencia de los extractos de hojas, los extracto de tallo de *C. billbergiana* presentó mayor media tanto en acuoso como en etanólico. En general el grado Brix en extracto etanólico es mayor que en extracto acuoso. Esto indica que el etanol extrae mejor los metabolitos secundarios del tallo. Para llegar a esta discusión fue necesario realizar análisis con la prueba de Kruskal-Wallis (Cuadro 6 y 7) donde se contrastó varias hipótesis, como se describe a continuación.

➤ **Hipótesis para contrastar la mediana entre tallos y entre hojas de los dos extractos de manera independiente.**

• Hipótesis nula (H_0):

- a. NO existe diferencia significativa entre las medianas de **hojas** de las cuatro especies.
- b. NO existe diferencia significativa entre las medianas de **tallos** de las cuatro especies.

• Hipótesis alterna (H_a):

- a. Existe diferencia significativa entre las medianas de **hojas** de las cuatro especies.
- b. Existe diferencia significativa entre las medianas de **tallos** de las cuatro especies.

Decisión

Se rechaza H_0 , si $P < 0.05$ y Se acepta H_a

Se acepta H_0 , si $P \geq 0.05$ y se rechaza H_a

Cuadro 6: Estadístico Kruskal-Wallis para contrastar la mediana entre grado brix en el extracto acuoso y la mediana entre pH en el extracto acuoso de las especies de *Columnea* sp.

Extracto acuoso					
Rangos promedios					
Especies	N	Grado Brix de hojas	Grado Brix de tallos	pH de hojas	pH de tallos
<i>Columnea maculata</i>	30	76.12	58.75	23.97	34.13
<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	70.27	30.30	65.92	64.17
<i>Columnea zebrina</i>	30	65.57	51.33	75.47	67.13
<i>Columnea billbergiana</i>	30	30.05	101.62	76.65	76.57
Prueba de Kruskal-Wallis		32.838	67.922	45.879	25.090
Grado de libertad (gl)		3	3	3	3
Sig. Asintótica (valor-P)		0.000	0.000	0.000	0.000

Cuadro 7: Estadístico Kruskal-Wallis para contrastar la mediana entre grado brix en el extracto etanólico y la mediana entre pH en el extracto etanólico de las especies de *Columnea* sp.

Extracto etanólico					
Rangos promedios					
Especies	N	Grado Brix de hojas	Grado Brix de tallos	pH de hojas	pH de tallos
<i>Columnea maculata</i>	30	76.12	58.75	23.97	34.13
<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	70.27	30.30	65.92	64.17
<i>Columnea zebrina</i>	30	65.57	51.33	75.47	67.13
<i>Columnea billbergiana</i>	30	30.05	101.62	76.65	76.57
Prueba de Kruskal-Wallis		32.838	67.922	45.879	25.090
Grado de libertad (gl)		3	3	3	3
Sig. Asintótica (valor-P)		0.000	0.000	0.000	0.000

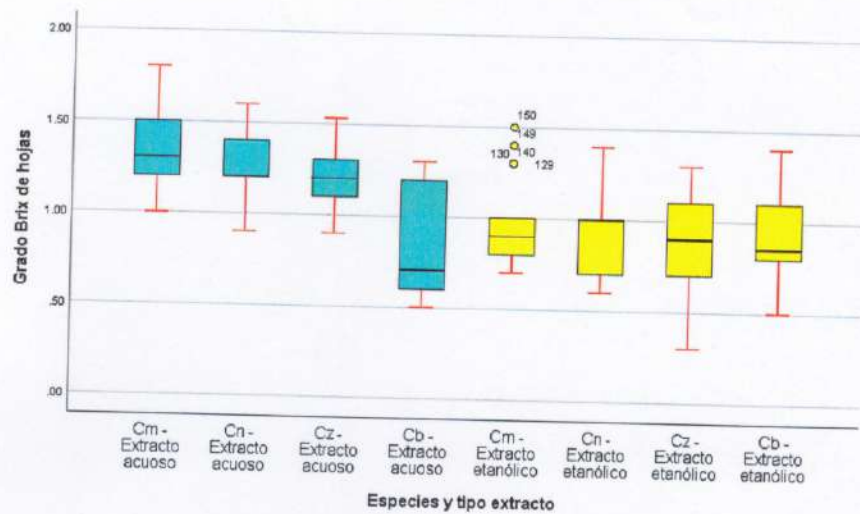


Figura 15: Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de porcentaje de sólidos totales disueltos (grado Brix) entre las hojas de *Columnnea* spp., (Cm = *Columnnea maculata*; Cn = *Columnnea nicaraguensis*; Cz = *Columnnea zebrina*; Cb = *Columnnea billbergiana*).

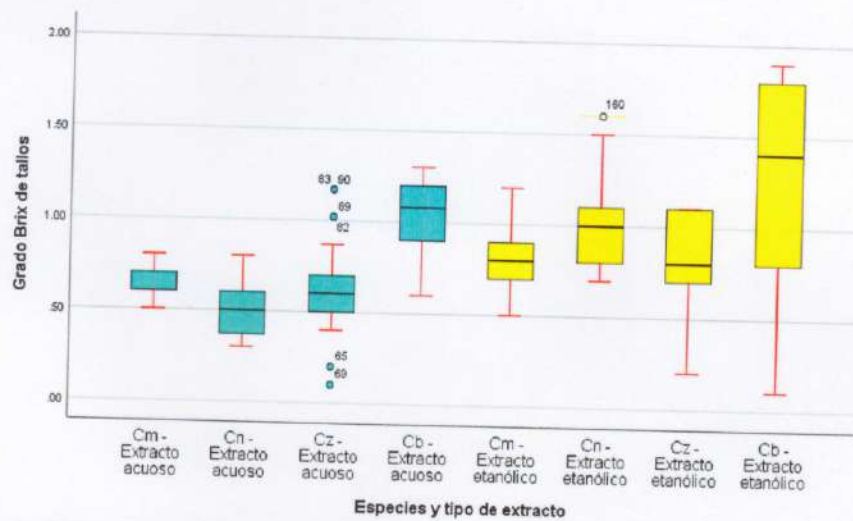


Figura 16: Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de porcentaje de sólidos totales disueltos (grado Brix) en tallos de *Columnnea* spp., (Cm = *Columnnea maculata*; Cn = *Columnnea nicaraguensis*; Cz = *Columnnea zebrina*; Cb = *Columnnea billbergiana*).

Cuadro 8: Estadísticos descriptivos para Potencial de hidrógeno (pH) de los extractos acuoso y etanólico de hojas y tallos de *Columnea* spp.

Resumen estadísticos							
	Especies de plantas	N	Promedio	Mínimo	Máximo	Rango	Varianza
pH de hojas para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	30	5.17 ± 0.44	4.4	6.36	1.96	0.19
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	5.95 ± 0.37	5.18	6.99	1.81	0.14
	<i>Columnea zebrina</i>	30	6.27 ± 0.92	4.92	7.48	2.56	0.85
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	6.17 ± 0.70	5.34	6.88	1.54	0.49
pH de hojas para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	30	6.07 ± 0.26	5.76	6.93	1.17	0.07
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	6.36 ± 0.14	6.01	6.54	0.53	0.02
	<i>Columnea zebrina</i>	30	6.09 ± 0.08	5.97	6.24	0.27	0.01
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	6.14 ± 0.04	6.05	6.2	0.15	0.00
pH de tallos para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	30	5.45 ± 0.68	4.92	6.89	1.97	0.47
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	5.86 ± 0.58	5.32	7.05	1.73	0.33
	<i>Columnea zebrina</i>	30	6.02 ± 0.84	5.06	7.33	2.27	0.70
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	5.97 ± 0.45	5.31	6.72	1.41	0.21
pH de tallos para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	30	6.04 ± 0.04	5.94	6.09	0.15	0.00
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	30	6.20 ± 0.14	6.01	6.45	0.44	0.02
	<i>Columnea zebrina</i>	30	6.22 ± 0.07	6.07	6.36	0.29	0.01
	<i>Columnea billbergiana</i>	30	6.13 ± 0.11	5.97	6.34	0.37	0.01

Cuadro 9. Prueba de normalidad de los datos para potencial de hidrógeno (pH) de los extracto acuoso y etanólico de hojas y tallos de *Columnea* sp.

Prueba de normalidad para potencial de hidrógeno (pH)				
	Especies de plantas	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	GI	Sig.
pH de hojas para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	0.751	30	0.000
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.801	30	0.000
	<i>Columnea zebrina</i>	0.890	30	0.005
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.709	30	0.000
pH de hojas para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	0.944	30	0.120
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.878	30	0.003
	<i>Columnea zebrina</i>	0.957	30	0.262
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.907	30	0.012
pH de tallos para extracto acuoso	<i>Columnea maculata</i>	0.654	30	0.000
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.709	30	0.000
	<i>Columnea zebrina</i>	0.828	30	0.000
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.876	30	0.002
pH de tallos para extracto etanólico	<i>Columnea maculata</i>	0.893	30	0.006
	<i>Columnea nicaraguensis</i>	0.904	30	0.010
	<i>Columnea zebrina</i>	0.941	30	0.099
	<i>Columnea billbergiana</i>	0.928	30	0.043

Interpretación de la prueba de normalidad para potencial de hidrógeno (pH)

Para el pH hay datos con distribución normal y datos con distribución NO normal por lo cual se aplica estadístico NO paramétrica para contrastar la hipótesis basada en la igualdad de media. Con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se rechaza la hipótesis nula (H_0) para todos los datos, excepto para extracto etanólico de hojas de *Columnea maculata* ($P=0.120$), *Columnea zebrina* ($P=0.262$) y extracto etanólico de tallos de *Columnea zebrina* ($P=0.099$); lo cual indica que provienen de una población con distribución normal (Cuadro 9). Los datos presentan distribución normal y distribución NO normal por lo tanto para aplicar un estadísticos es necesario unificar criterios. Lo que indica aplicar una prueba no paramétrico U de Mann-Withnney para responder la siguiente hipótesis que se plantea:

➤ **Hipótesis para contrastar la media de pH entre extracto acuoso y extracto etanólico**

• Hipótesis nula (H_0): NO existe diferencia significativa entre la media de pH de extracto acuoso de hojas y tallos **con respecto a** la media de pH de extracto etanólico de hojas y tallos de *Columnea* sp.

• Hipótesis alterna (H_a): Existe diferencia significativa entre la media de pH de extracto acuoso de hojas y tallos **con respecto a** la media de pH de extracto etanólico de hojas y tallos de *Columnea* sp.

- Se rechaza H_0 , si $P < 0.05$
- Se acepta H_0 , si $P \geq 0.05$

Cuadro 10: Estadístico U de Mann-Whitney para potencial de hidrógeno (pH) de extracto acuoso y etanólico de las especies de *Columnnea* sp.

		Rangos		Prueba U de Mann-Whitney	Sig.
	Tipo de extracto	N	Rango promedio		
pH de hojas	Extracto acuoso	120	99.79	4714.500	0.000
	Extracto etanólico	120	141.21		
	Total	240			
pH de tallos	Extracto acuoso	120	88.73	3388.000	0.000
	Extracto etanólico	120	152.27		
	Total	240			

Con el estadístico U de Mann-Whitney se llegó a la conclusión de rechazar la hipótesis nula (H_0) ya que el valor P calculado fue menor que 0.05 ($P=0.000$) por lo tanto había evidencia para concluir que existe diferencia significativa entre la media de pH de los extracto acuoso con respecto a la media de pH del extracto etanólico. Para determinar cuál media es significativamente diferente de otra ver gráfico de Caja y Bigotes (Figura 17 y 18). En esta gráfica se observa que el pH de hojas de extracto etanólico es constante a diferencia de extracto acuoso que presenta variación a medida que pasaba el tiempo. De manera que se puede relacionar al alcohol como mejor conservante de los extractos de estas plantas. También se observó en los extractos de tallos de las especies de *Columnnea* (Figura 18). Con la prueba de Kruskal-Wallis se observó que el pH de hojas del extracto acuoso de *C. maculata* y *C. nicaraguensis* es más constante que el extracto acuoso de *C. zebrina* y *C. billbergiana*. Lo mismo se observó con el pH de tallos del extracto acuoso. El pH de hojas y tallos de extracto etanólico es más constante, sin embargo, presentan pequeñas variaciones considerables entre las especies (Cuadro 6 y 7; figura 19 y 20).

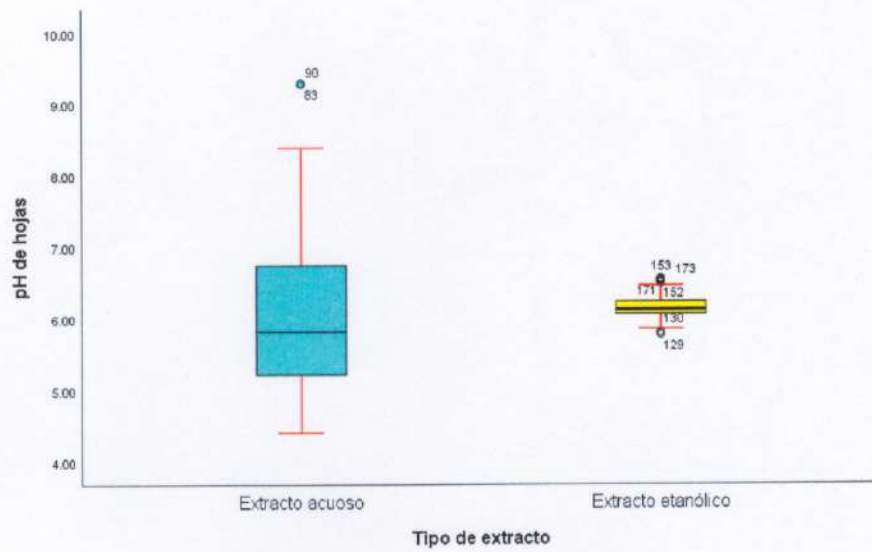


Figura 17: Gráficos de cajas y bigotes para representar la media de grado Brix de hojas de los extracto acuoso y extracto etanólico de las especies de *Columnea* sp.

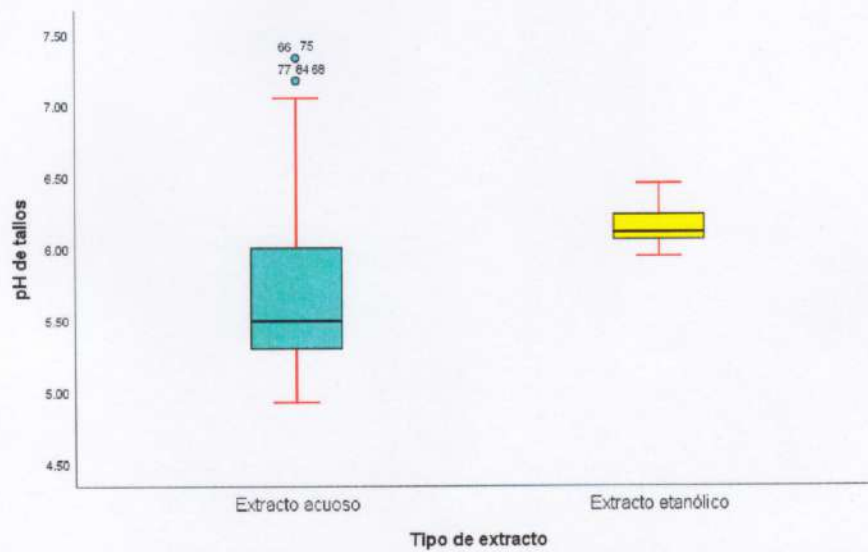


Figura 18: Gráficos de cajas y bigotes para representar la media de grado Brix de hojas de los extracto acuoso y extracto etanólico de las especies de *Columnea* sp.

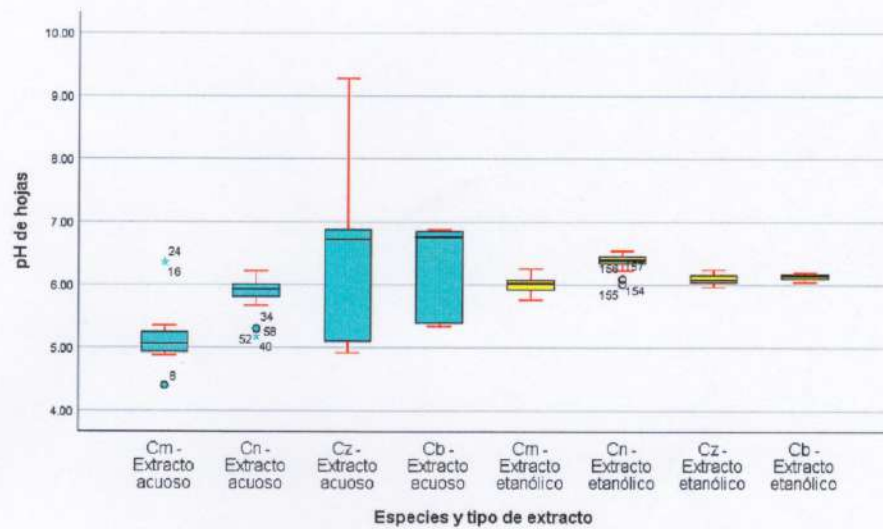


Figura 19: Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de potencial de hidrógeno (pH) entre las hojas de *Columnnea* spp., (Cm = *Columnnea maculata*; Cn = *Columnnea nicaraguensis*; Cz = *Columnnea zebrina*; Cb = *Columnnea billbergiana*).

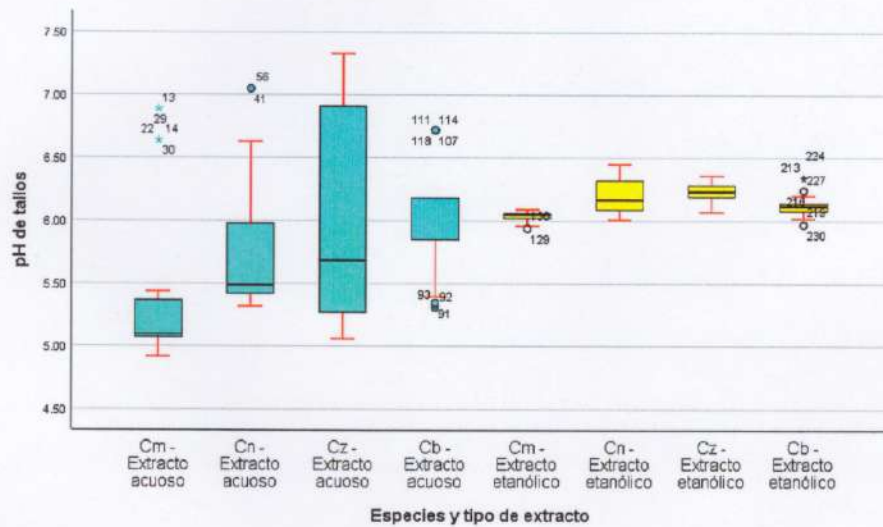


Figura 20: Gráfico de cajas y bigotes para representar la media de potencial de hidrógeno (pH) entre las tallos de *Columnnea* spp., (Cm = *Columnnea maculata*; Cn = *Columnnea nicaraguensis*; Cz = *Columnnea zebrina*; Cb = *Columnnea billbergiana*).

Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico de *Columnnea maculata*, *C. nicaraguensis*, *C. zebrina* y *C. billbergiana*.

En el análisis cualitativo de los extractos etanólico se determinó la presencia de, saponinas, triterpenos, taninos, flavonoides, terpeno, esteroides y grupo hidroxilo.

Identificación de saponinas

Para *C. maculata*, *C. nicaraguensis*, *C. zebrina* y *C. billbergiana* se observó formación de abundante espumas que permaneció durante más de media hora la cual se consideró positiva (+++) para los extractos de hojas y espumas moderadas (++) para extractos de tallos (Cuadro 11, 12, 13, 14 y Figura 21).

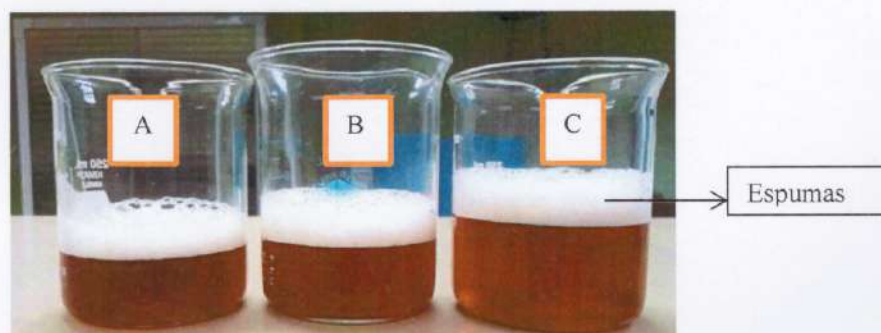


Figura 21. Ensayo con agua caliente para saponina. Presencia de espuma abundante en extracto de hojas de: (A) *C. maculata*, (B) *C. zebrina* y (C) *C. nicaraguensis*

El otro ensayo para detectar saponinas es agregando gotas del reactivo de Rosenthaler donde se observó formación de color violeta (intenso) justo cuando entra en contacto con el extracto de hojas la cual se consideró como prueba positiva y se observó un violeta moderado para los extractos de tallos, estos en *C. maculata*, *C. nicaraguensis*, *C. zebrina*, en cambio para *C. billbergiana* el cambio de coloración fue muy leve (++) para extractos de hojas y (+) para tallos (Cuadro 11, 12, 13 y 14).

Identificación de triterpenos

Para *C. maculata*, *C. nicaraguensis*, *C. zebrina* y *C. billbergiana*, con el reactivo de Lieberman-Buchard, se observó formación de un color rojo, este cambio de coloración se consideró moderado (++) para los extractos de hojas y verde muy leve (+) para extracto de tallos, las mismas se consideraron positivas para triterpenos (Cuadro 11, 12, 13, 14 y Figura 21).

Identificación de taninos

Para *C. maculata*, *C. nicaraguensis*, *C. zebrina* y *C. billbergiana* se observó formación de un precipitado blanco al agregar el reactivo de gelatina-sal, luego al haber precipitado se les agregó urea y tricloruro de hierro (FeCl_3) a las muestras, estas se tornaron de color verde intenso a oscuro para extractos de hojas (+++) y en el caso de tallos la coloración fue verde intenso por lo que se consideró como moderado (+++); este cambio de coloración indicó presencia de taninos condensados. La presencia de esta coloración confirma la presencia de taninos condensados con la prueba de FeCl_3 donde se observó formación de un precipitado pardo-verdoso muy intenso (+++) para extractos de hojas y precipitado pardo-verdoso (+++) para extractos de tallos (Cuadro 11, 12, 13, 14 y Figura 22).

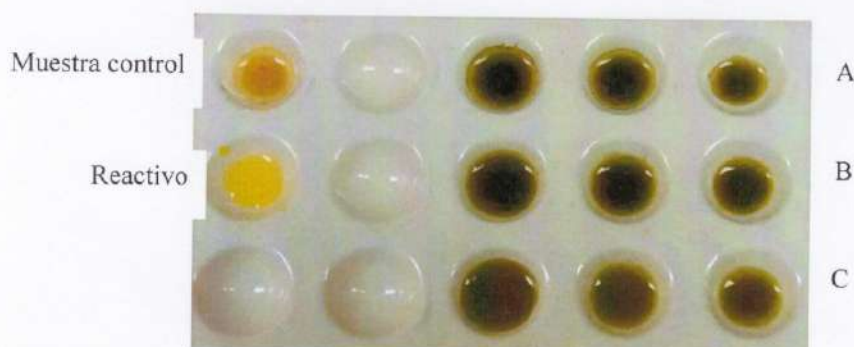


Figura 22. Tamizaje fitoquímico para determinar taninos utilizando reactivo de FeCl_3 .

Identificación de flavonoides

Para las cuatro especies de *Columnea*, con la prueba de NaOH diluido se observó aparición de colores amarillo intenso (+++) en hojas, la cual se consideraron positiva y amarillo moderado (++) para tallos. Con la Prueba de Pew's no se observó ningún cambio de coloración Para determinar flavonoides con el reactivo de Shinoda se observaron cambios de color rojo para el extracto de hojas de *C. nicaraguensis* y color magenta para las especies de *C. maculata*, *C. zebrina* y *C. billbergiana*, las cuales indicaron la presencia de flavonas o dihidroxiflavonoles como (Cuadro 11, 12, 13, 14 y Figura 23).

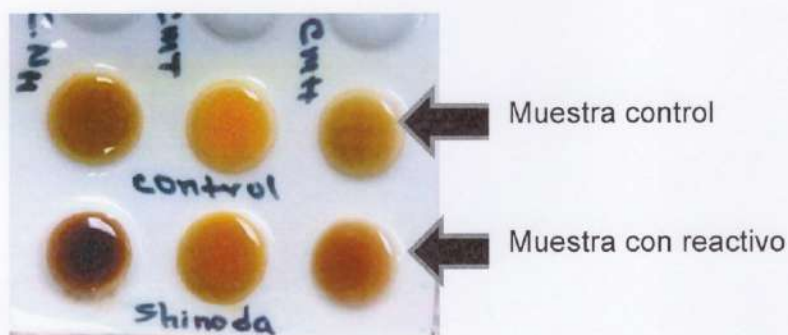


Figura 23. Tamizaje fitoquímico para determinar flavonoides utilizando reactivo de Shinoda.



Figura 24. Tamizaje fitoquímico para determinar triterpenos utilizando reactivo Liebermann bouchard.

No se confirmó la presencia de alcaloides para estas cuatro especies de *Columnea*, todas las pruebas dieron negativos.

Cuadro 11: Tamizaje fitoquímico del extracto de *Columnnea maculata*

Metabolitos secundarios	Reactivo	Extracto acuoso						Extracto etanólico								
		Hojas			Tallos			Hojas			Tallos					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Saponinas	Agua caliente	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Rosenthaler	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Triterpenos	Leiberman-Buchard	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+
Taninos	Gelatina sal	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
	FeCl ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoides	Shinoda	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
	NaOH	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Pew's	+++	+++	+++	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+
Lactona sesquiterpénica	Baljet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terp- Esteroides.	Salkowski	++	++	++	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Grupo Hidroxilo	Dimroth	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Cumarinas	Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (+) = leve; (++) = moderado; (++++)=abundante. Los números (1, 2, 3) indican las réplicas

Cuadro 12: Tamizaje fitoquímico del extracto de *Columnnea nicaraguensis*

Metabolitos secundarios	Reactivo	Extracto acuoso						Extracto etanólico									
		Hojas			Tallos			Hojas			Tallos						
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
Saponinas	Agua caliente	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Rosenthaler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos	Lieberman-Buchard	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Gelatina sal	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Taninos	FeCl ₃	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Shinoda	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Flavonoides	NaOH	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Pew's	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Lactona sesquiterpénica	Baljet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Salkowski	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo hidroxilo	Dimroth	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (+) = leve; (++) = moderado; (+++) = abundante. Los números (1, 2, 3) indican las réplicas

Cuadro 13: Tamizaje fitoquímico del extracto de *Columnnea zebrina*

Metabolitos secundarios	Prueba	Extracto acuoso						Extracto etanólico												
		Hojas			Tallos			Hojas			Tallos									
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3							
Saponinas	Agua caliente	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Rosenthaler	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos	Lieberman-Buchard	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina sal	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	FeCl ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoides	Shinoda	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NaOH	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Pew's	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactona sesquiterpénica	Baljet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terp- Esteroides.	Salkowski	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	G.H.	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Cumarinas	Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (+) = leve; (++) = moderado; (+++) = abundante. Los números (1, 2, 3) indican las réplicas

Cuadro 14: Tamizaje fitoquímico del extracto de *Columnnea billbergiana*

Metabolitos secundarios	Prueba	Extracto acuoso						Extracto etanólico								
		Hojas			Tallos			Hojas			Tallos					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Saponinas	Agua caliente	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Rosenthaler	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Triterpenos	Lieberman-Buchard	++	++	++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Taninos	Gelatina sal	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	FeCl ₃	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoides	Shinoda	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NaOH	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Pew's	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Lactona sesquiterpénica	Baljet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terp- Esteroides	Salkowski	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo Hidroxilo	Dimroth	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cumarinas	Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (+) = leve; (++) = moderado; (+++) = abundante. Los números (1, 2, 3) indican las réplicas

Cromatografía en capa fina (CCF) y espectroscopía UV-visible e Infrarrojo (IR)

Análisis por Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica. Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehidos y cetonas); La gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos); El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente (García *et al.*, 2019).

La fase móvil que se selecciona es de acuerdo con las características de la muestra. La base del ensayo es el disolvente utilizado para preparar el extracto o la fracción de que se trate; En todos los casos es conveniente utilizar sucesivamente tantas fases móviles como sea necesario para obtener las sustancias en posiciones de R_f no menor de 0,20 ni mayor de 0,80 (Rondina *et al.*, 1985).

Determinación del R_f .

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria.

Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil; La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de: - la polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes.

Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad. Así, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.

La fase móvil final utilizada fue una combinación de ciclohexano, acetato de etilo y metanol en proporción de 7:2:1. En la figura 19 se observan los cromatogramas obtenidos después de correr las muestras y observar bajo luz UV-vis como F1 y F5 (254nm) y también compuesto que no absorben luz UV fueron revelados con vainillina (F3 y F4); En esta figura se observa que los extractos de tallos es mejor para hacer este análisis ya que no presenta mucha clorofila y también se observa que hay compuestos que se ven con mayor facilidad como los F5. Los factores de retención calculados para cada extracto se presentan en el Cuadro 15 y Figura 25 A y B.

Los primeros Rf son el resultado de la observación bajo luz UV-Visible (254nm) con factores de retención 0.12-0.18 que podría ser compuestos con menor polaridad y los Rf de 0.30-0.50 podría ser compuesto con polaridad intermedia y los Rf cercano a los 0.60-0.70 son compuestos con mayor polaridad (Figura 25).

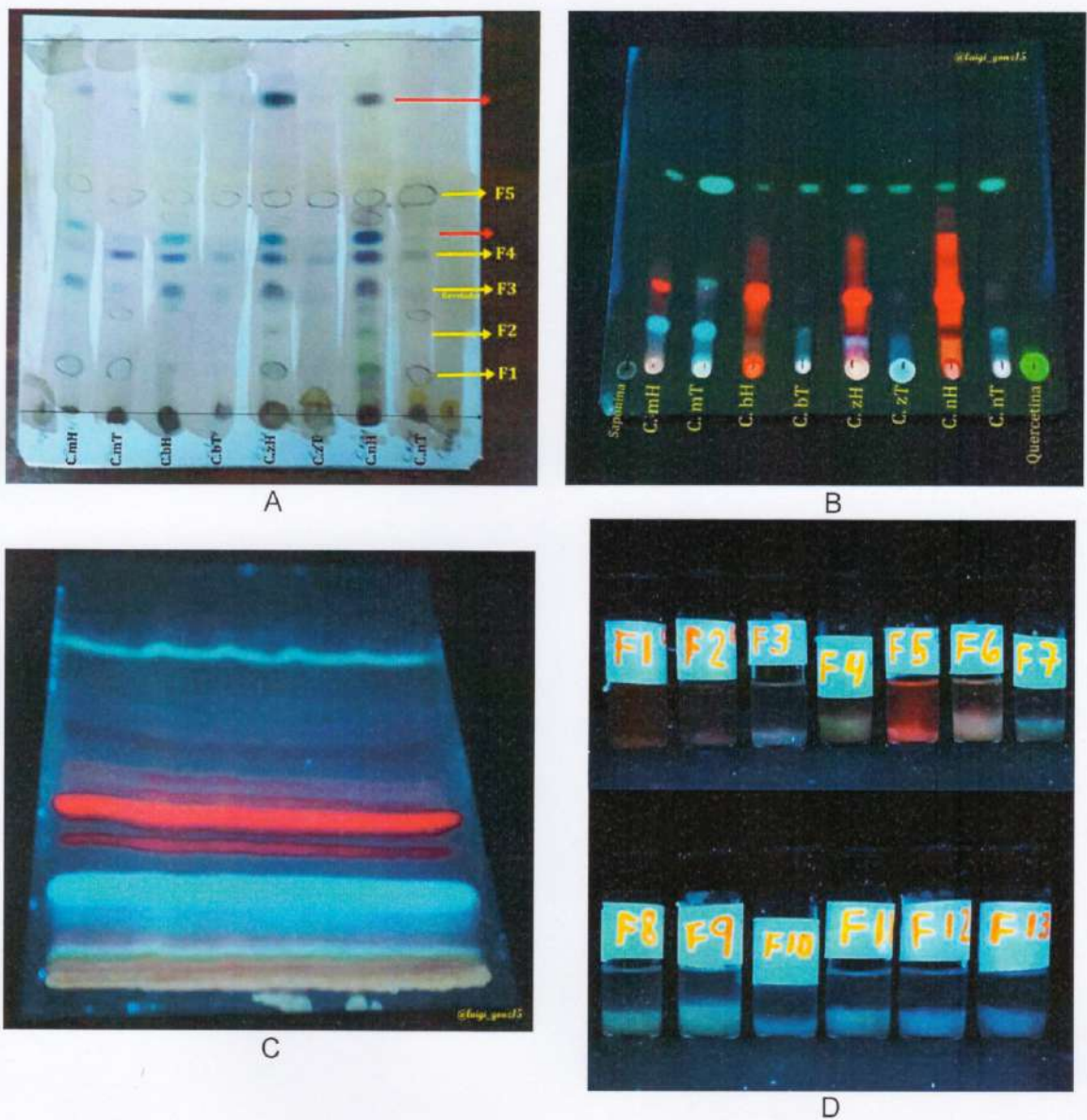


Figura 25: Espectroscopía UV-visible. A) Cromatograma con revelador vainillina. B) Cromatograma de hojas y tallos de especies de *Columnea* bajo luz 365 nm. C) Cromatograma de hojas de *C. maculata* en placas preparativa. D) Compuesto purificado en hojas de *C. maculata* disuelto en metanol.

Cuadro 15: Factor de retención en extractos etanólico de *Columnnea* spp.

Especies		F1	F2	F3	F4	F5
<i>C. maculata</i>	Hojas	0.18	0.36	-	-	0.63
	Tallos	0.13	0.31	-	-	0.69
<i>C. nicaraguensis</i>	Hojas	-	0.34	0.50	0.56	-
	Tallos	0.12	0.31	0.50	0.55	0.69
<i>C. zebrina</i>	Hojas	0.12	0.31	0.50	0.53	-
	Tallos	-	-	-	-	0.68
<i>C. billbergiana</i>	Hojas	-	0.3	-	-	-
	Tallos	-	-	0.50	-	0.60

Para este análisis se utilizó gel de sílice para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. El adsorbente interacciona con las sustancias mediante interacción dipolo-dipolo o mediante enlace de hidrógeno si lo presentan.

Espectro UV-visible para extracto acuoso

Con el análisis UV-visible se obtuvieron ciertas absorbancia para algunos compuestos mayoritarios en los rangos de 270 a los 300 nm para extractos acuosos, que corresponde a los grupos de flavonoides tipo antocianinas y taninos según la comparación con patrón de quercetina (Figura 20) y ácido tánico (Figura 21 A y B) y se observaron máximos correspondientes a los pigmentos tipo clorofila (665 nm).

Tabla 16: Longitudes de ondas absorbidas en el espectro UV-Visible en extractos acuoso de *Columnea* spp.

Especies	Órganos de la planta	Longitudes de ondas (nm)	
		Flavonoides	Clorofila
<i>C. maculata</i>	Hojas	266 y 295	-
	Tallos	258 y 294	-
<i>C. nicaragüenses</i>	Hojas	270	-
	Tallos	266	-
<i>C. zebrina</i>	Hojas	257 y 296	-
	Tallos	266, 292 y 412	665

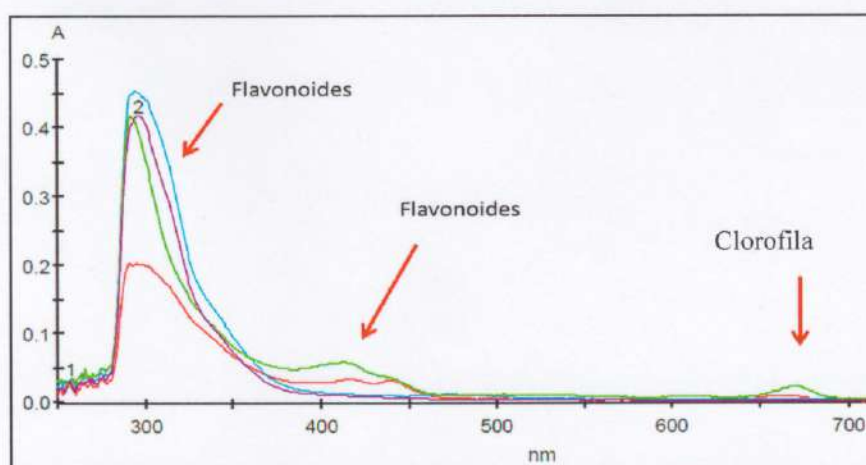


Figura 26: Espectro UV-Vis de extracto acuoso de *Columnea* spp.

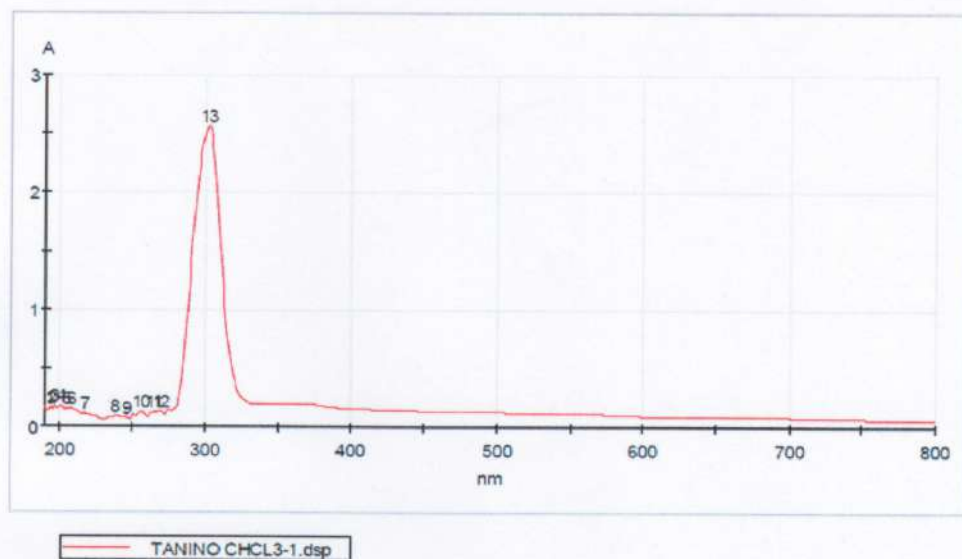


Figura 27. Espectro UV- visible de patrón de ácido tánico

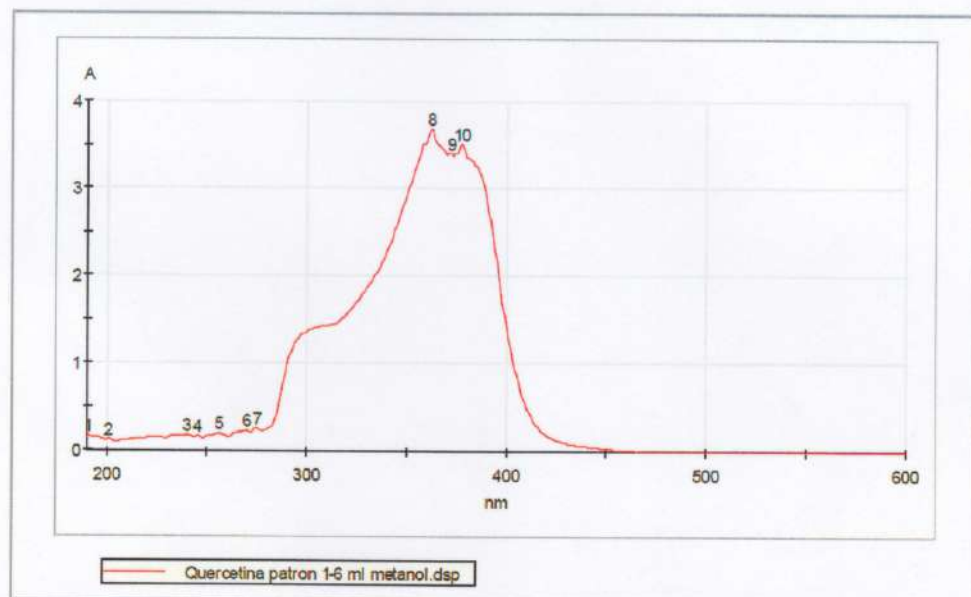


Figura 28. Espectro UV- visible de patrón de quercetina.

Espectro UV-visible para extracto etanólico

En el Cuadro 17 y figura 29 y 30, se aprecia las principales absorbancia para los extractos etanólico crudo, entre los rangos de los 270 nm a los 400 nm se observó absorbancia para grupo de flavonoides, la cuales se compararon con patrón de quercetina. Aparecen los máximos de absorción típicos de algunos núcleos de flavonoides, se observan máximos correspondientes a antocianinas en la zona de luz visible se observa una banda entre 400-500nm y otra en la región del UV entre 270-280nm (Andersen & Jordheim 2006), flavonas (se observa una banda entre 300-350 nm y otra entre 240-280 nm) bandas entre los 300 podría ser compuestos fenólicos tipo taninos según la referencia del ácido tánico y auronas (una banda entre 370-430nm, y se observaron máximos correspondientes a los pigmentos tipo clorofila (660-670nm).

Cuadro 17: Máximo de absorbancia en el espectro UV-Visible en extractos etanólico de *Columnea* spp.

Especies	Órgano de la planta	Máximos UV-vis (nm)
<i>C. maculata</i>	Hojas	668, 610, 501, 334, 270
	Tallos	670, 328, 270
<i>C. nicaragüenses</i>	Hojas	668, 610, 533, 503, 402, 320, 303, 275
	Tallos	668, 503, 402, 299
<i>C. zebrina</i>	Hojas	666, 324, 275, 270
	Tallos	668, 328, 299, 274

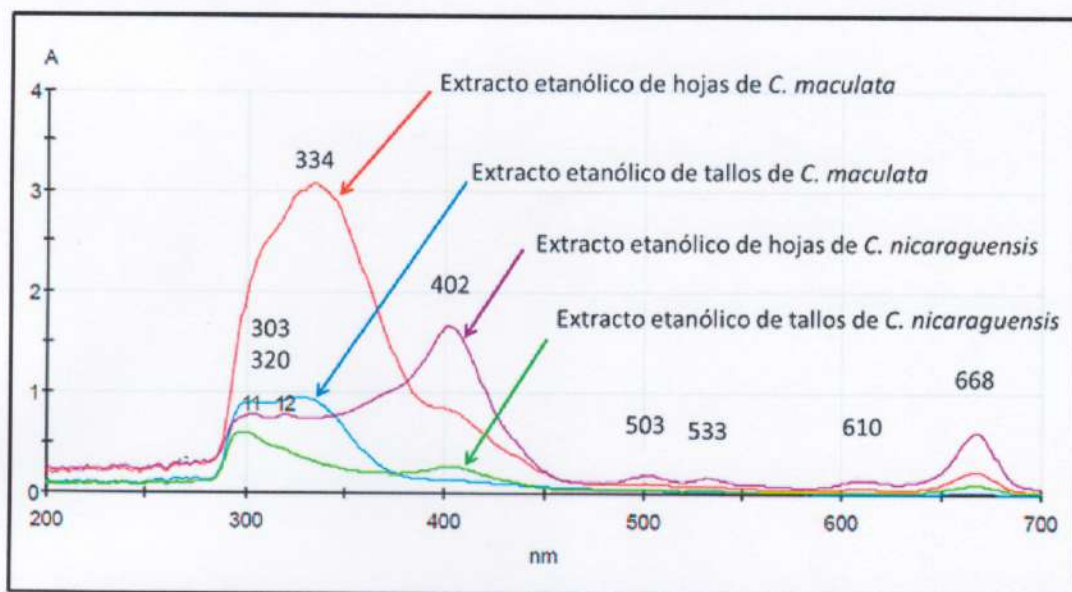


Figura 29. Máximo de absorbancia en el espectro UV- visible de extracto etanólico de *C. maculata* y *C. nicaraguensis*.

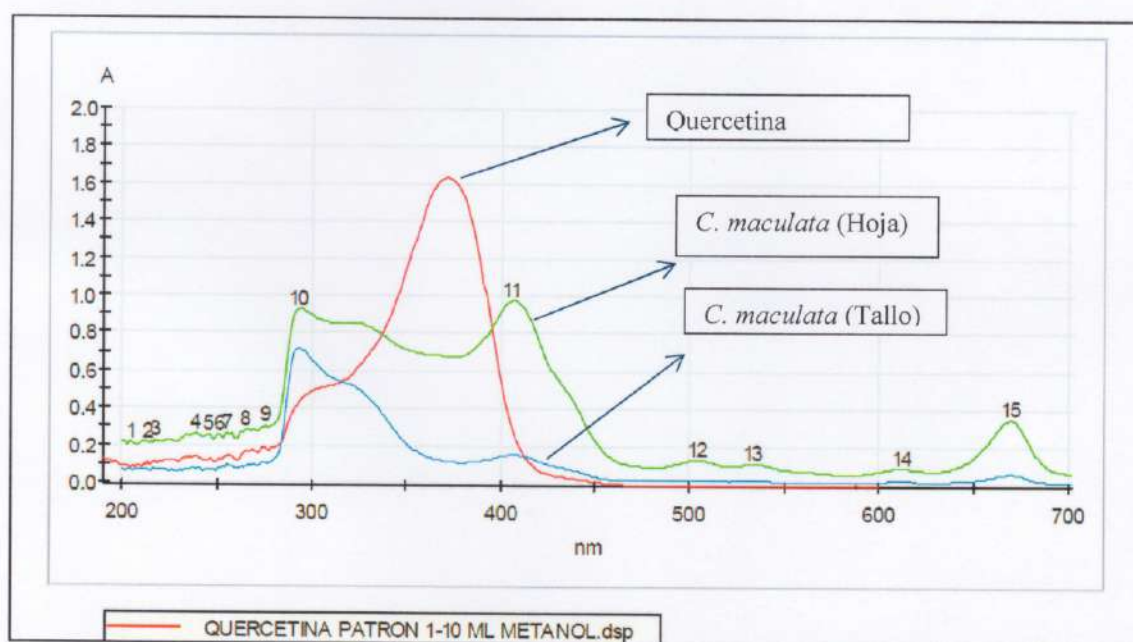


Figura 30. Espectro UV- visible de quercetina (patrón-rojo) y extracto etanólico de *C. maculata* (azul para tallos y verde para hojas)

Análisis por espectroscopía Infrarrojo (IR)

“La espectrofotometría en una medición de la cantidad de energía radiante que es absorbida por un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación” (Brunatti & Martín, 2010). Esta herramienta sirve para observar espectros vibracionales que son típicos de grupos funcionales particulares como alcanos, alquenos, alquinos, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas, ácidos, entre otros y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos (Gómez & Murillo, 2006). También se utiliza para deducir estructuras moleculares de compuestos orgánicos como inorgánicos y la energía a la que aparece cualquier pico de absorción corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de una molécula de muestra (Stuart, 2000).

En las figuras del 31-37 y el cuadro 18 resumida, se muestra el análisis del extracto acuoso crudo de hojas de *C. maculata* en el espectrofotómetro infrarrojo en donde se observaron bandas anchas entre los $\sim 3271.27 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 3334.92 \text{ cm}^{-1}$ asignables a las vibraciones del estiramiento -OH característico de grupo alcoholes y fenoles, así como señales a $\sim 1074.35 \text{ cm}^{-1}$, adjudicables a alargamiento del enlace C-OH, señales en $\sim 2935.66 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 2883.88 \text{ cm}^{-1}$ adjudicables a vibraciones de estiramiento C-H, y las vibraciones $\sim 1768.72 \text{ cm}^{-1}$ señales para estiramiento C=O de cetona posiblemente, señal a $\sim 1604.77 \text{ cm}^{-1}$ para tensión C=O, $\sim 1593.20 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a vibración de tensión C=C de un aromático, $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ señales para tensión O-H, $\sim 1394.53 \text{ cm}^{-1}$ señal para -CH₃ correspondiente al esqueleto carbonado, $\sim 1259.52 \text{ cm}^{-1}$ señal para vibraciones de flexión de un C-H y $\sim 1074.35 \text{ cm}^{-1}$ señal para un C-O de un éter tipo alifático, señales débiles entre $\sim 650 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 815 \text{ cm}^{-1}$ adjudicables a tensión C-H de aromáticos.

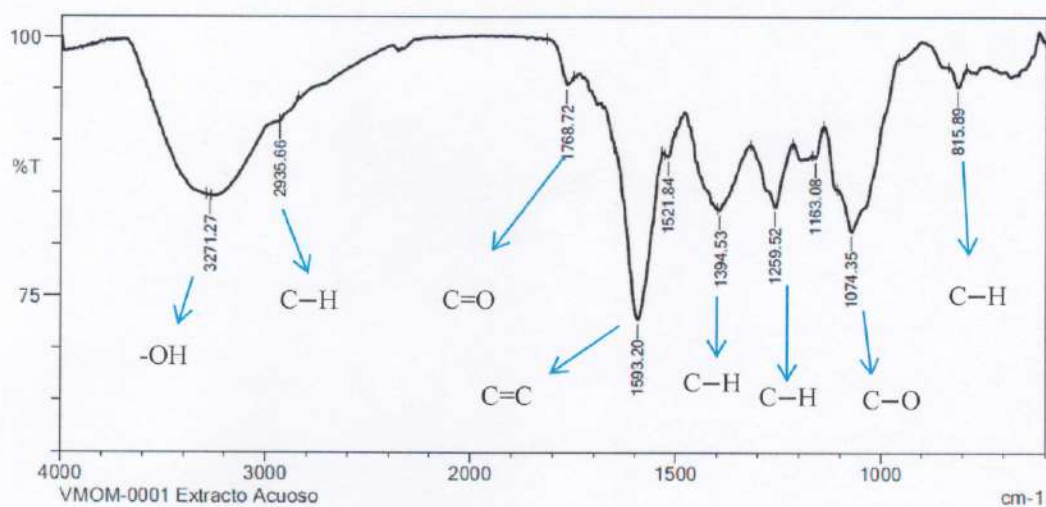


Figura 31: Principales señales de espectro infrarrojo para extracto acuoso crudo de hojas de *Columnnea maculata*: IR (KBr) cm⁻¹ 3271.27 (estiramiento -OH), 2935.66 cm⁻¹ (Tensión C-H), 1768.72 cm⁻¹ (Tensión C=O), 1593.20 cm⁻¹ (Estiramiento aromático C=C), 1394.53 cm⁻¹ (Flexión -CH), 1259.52 cm⁻¹ (Flexión C-H) 1074.35 cm⁻¹ (Tensión C-O), 815.89 cm (Tensión C-H).

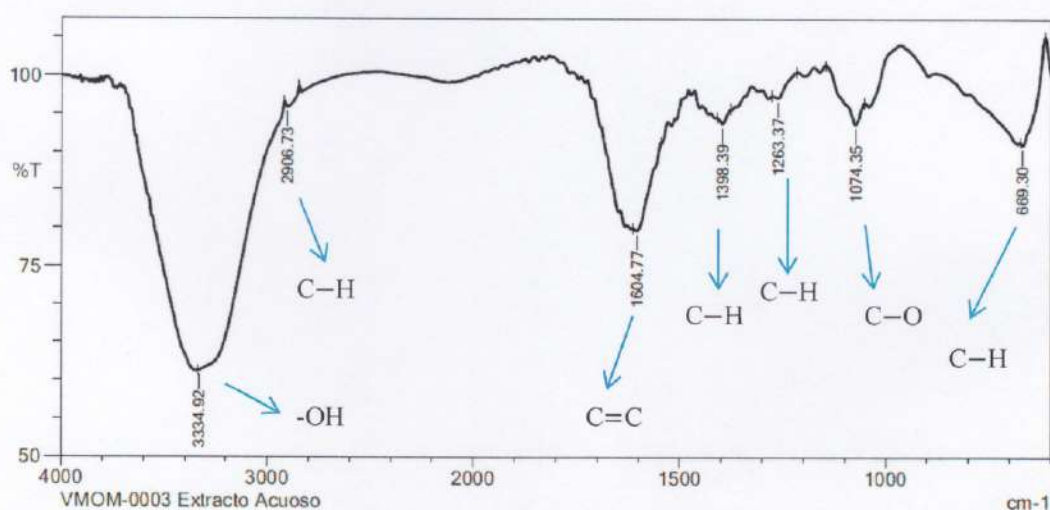


Figura 32: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto acuoso crudo de hojas de *Columnnea nicaraguensis*. IR (KBr) cm⁻¹ 3334.92 (estiramiento -OH), 2906.73 cm⁻¹ (Tensión C-H), 1604.77 cm⁻¹ (Tensión C=O), 1398.39 cm⁻¹ (Flexión C-H), 1263.37 y 1074.35 cm⁻¹ (Tensión C-O) y 669.30 cm⁻¹ (Tensión C-H)

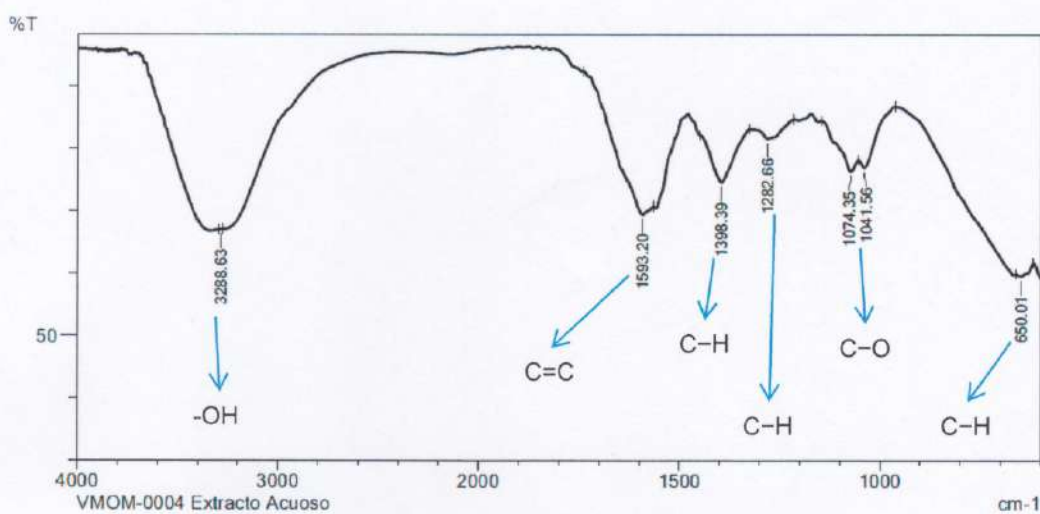


Figura 33: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto acuoso crudo de tallos de *Columnea nicaraguensis*. IR (KBr) cm^{-1} 3288.63 cm^{-1} (estiramiento -OH), 1593.20 cm^{-1} (Tensión C=C), 1398.39 cm^{-1} (Flexión C-H), 1282.66 cm^{-1} (Flexión C-H), 1074.35 y 1041.56 cm^{-1} (Tensión C-O) y 669.30 cm^{-1} (Tensión C-H).

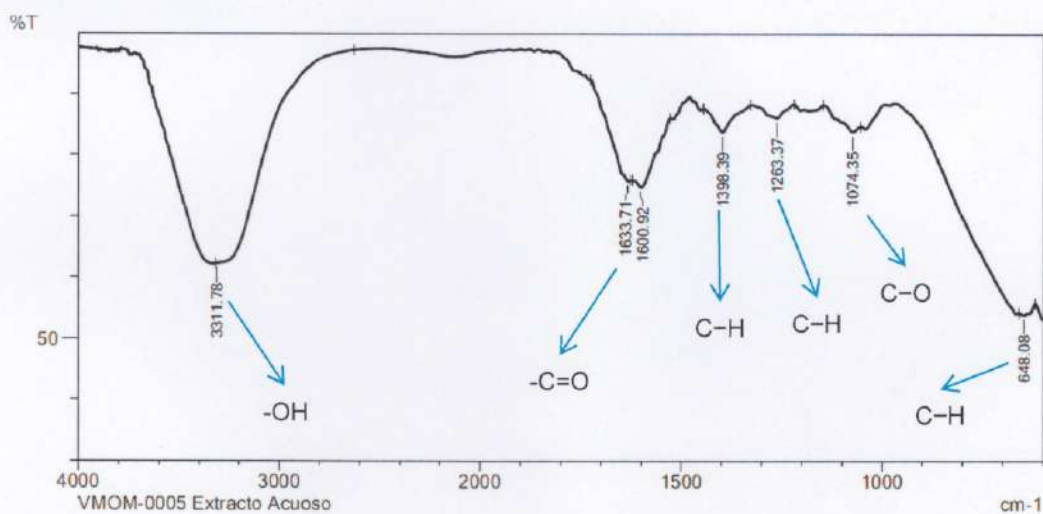


Figura 34: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto acuoso crudo de hojas de *Columnea zebrina*. IR (KBr) cm^{-1} 3311.78 cm^{-1} (estiramiento -OH), 1633.71 y 1600.92 cm^{-1} (Tensión anillo aromático C=C), 1398.39 cm^{-1} (Flexión C-H), 1263.37 cm^{-1} (Tención C-H), 1074.35 cm^{-1} (Tensión C-O) y 648.08 cm^{-1} (Tensión C-H).

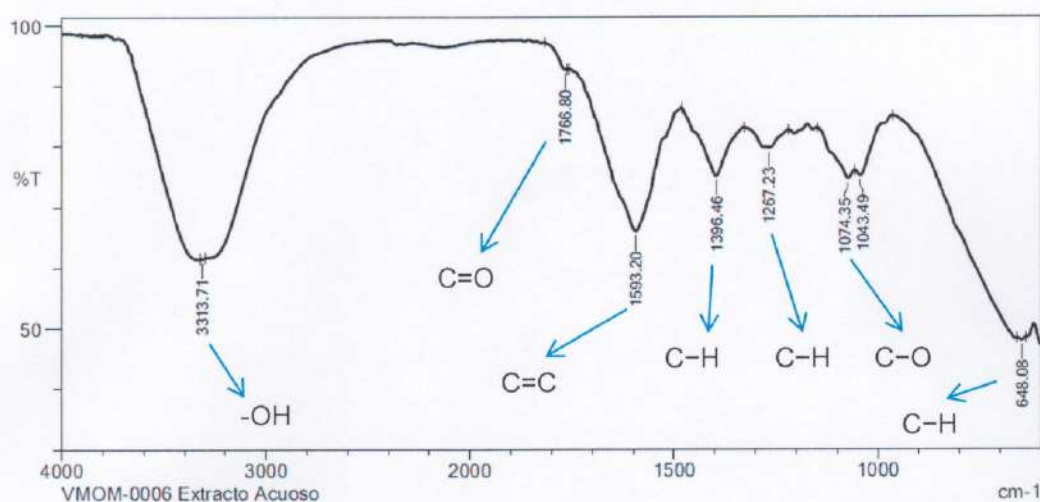


Figura 35: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto acuoso crudo de tallos de *Columnea zebrina*. IR (KBr) cm^{-1} 3313.71 cm^{-1} (estiramiento -OH), 1766.80 cm^{-1} (alargamiento C=O), 1593.20 cm^{-1} (Tensión C=C), 1396.46 cm^{-1} (Flexión C-H), 1267.23 cm^{-1} (Tención C-O), 1074.35 y 1043.49 cm^{-1} (Tensión C-H) y 648.08 cm^{-1} (Tensión C-H).

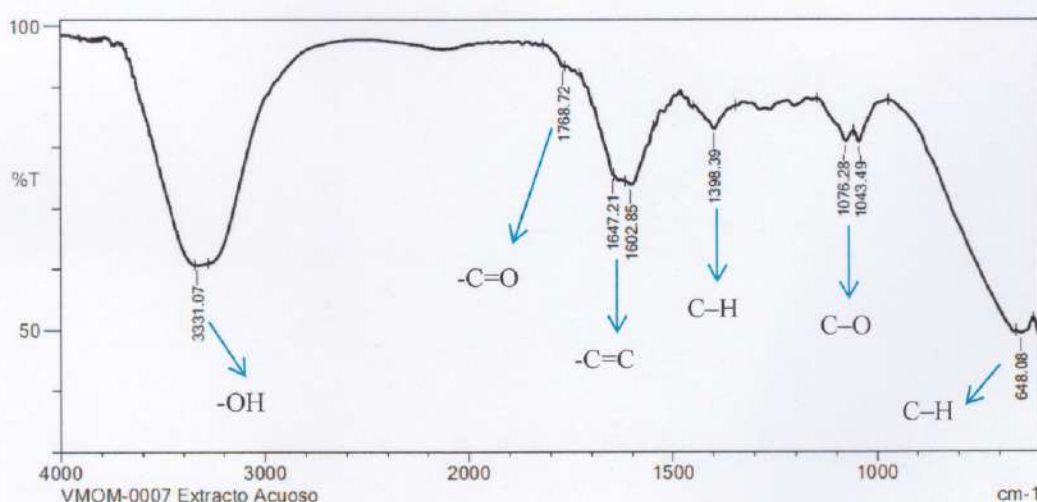


Figura 36: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto acuoso crudo de hojas de *Columnea billbergiana*. IR (KBr) cm^{-1} 3331.07 cm^{-1} (estiramiento -OH), 1768.72 cm^{-1} (Alargamiento C=O) 1647.20 cm^{-1} (Tensión C=C), 1398.39 cm^{-1} (Flexión C-H), 1076.28 y 1043.49 cm^{-1} (Tensión C-O) y 648.08 cm^{-1} (Tensión C-H).

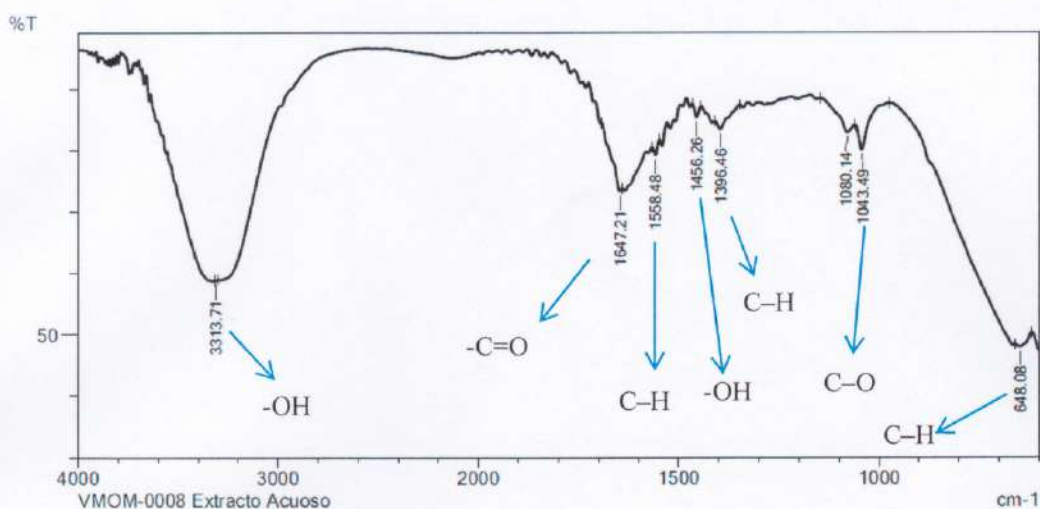


Figura 37: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto acuoso crudo de tallos de *Columnnea billbergiana*. IR (KBr) cm^{-1} 3313.71 cm^{-1} (estiramiento O–H), 1647.21 cm^{-1} (Tensión C=O), 1558.48 cm^{-1} (Tención C=C), 1396.46 cm^{-1} (Flexión C–H), 1080.14 y 1043.49 cm^{-1} (Tensión C–O) y 648.08 cm^{-1} (Tensión C–H).

Análisis por espectroscopía Infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo

En las figuras del 38-45 y el cuadro 18 resumida, se muestra el análisis del extracto etanólico crudo de hojas de *C. maculata* en el espectrofotómetro infrarrojo en donde se observaron bandas anchas entre los $\sim 3361.93 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 3253.91 \text{ cm}^{-1}$ bandas características del estiramiento O–H de grupo alcoholes y fenoles, señales entre ~ 1450 y $\sim 1455 \text{ cm}^{-1}$ para flexión del O–H, así como señales a $\sim 1076.28 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1072.42 \text{ cm}^{-1}$, adjudicables a alargamiento del enlace de los fenoles y alcoholes C–OH, señales en $\sim 2900.94 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 2883.88 \text{ cm}^{-1}$ de las vibraciones de estiramiento C–H de un aldehído, y señales débiles a $\sim 1766.80 \text{ cm}^{-1}$ para tensión C=O de posiblemente cetona, señales

entre $\sim 1676.14 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1502.99 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a vibraciones de tensión C=C de un aromático, $\sim 1396.46 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ señal para C-H₃ correspondiente al esqueleto carbonado, $\sim 1281.66 \text{ cm}^{-1}$ señal para vibraciones de flexión de un C-O, adjudicables a un aromático y $\sim 1074.35 \text{ cm}^{-1}$ señal para un C-O de un éter tipo alifático, señales débiles entre $\sim 650 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 815 \text{ cm}^{-1}$ adjudicables a tensión C-H de aromáticos.

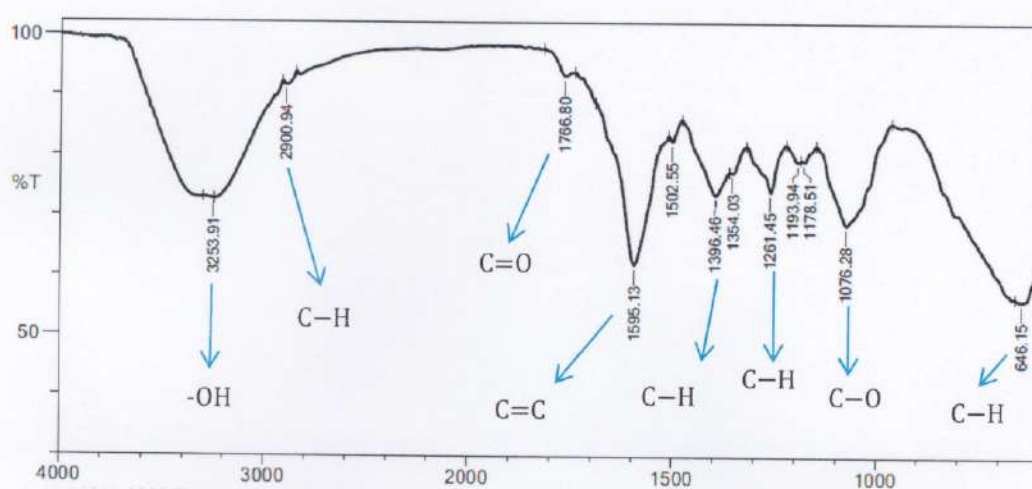


Figura 38: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de tallos de *Columnnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3253.91 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2900.94 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1766.80 cm^{-1} (Estiramiento C=O), 1595.13 cm^{-1} (Tensión C=C), 1396.46 cm^{-1} (Flexión C-H), 1261.45 cm^{-1} (Flexión C-H), 1076.28 cm^{-1} (Tensión C-O) y 646.15 cm^{-1} (Tensión C-H).⁴

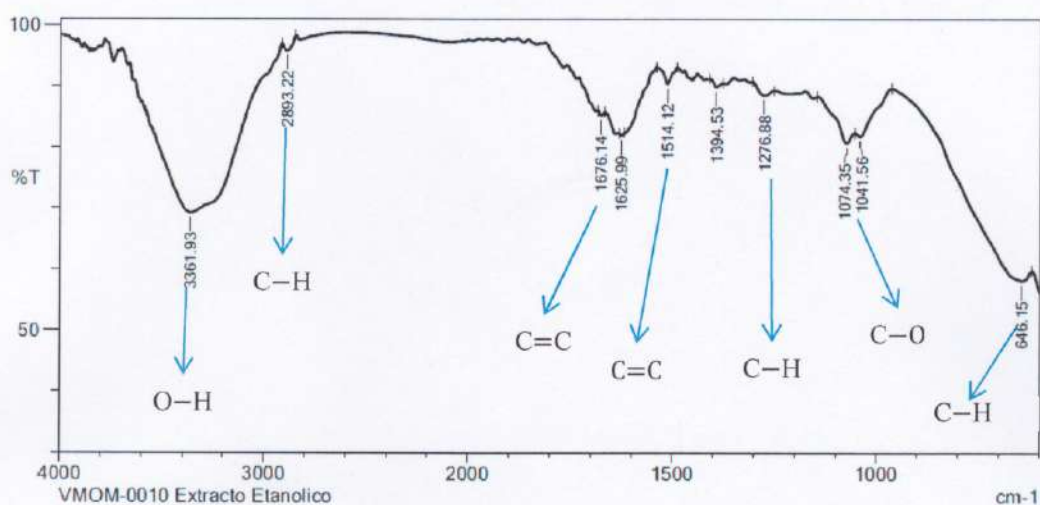


Figura 39: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de tallos de *Columnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3361.93 cm^{-1} (estiramiento O-H), 2893.22 (Estiramiento C-H), 1625.99 cm^{-1} (Tensión C=O), 1514.12 (Tención C=C), 1394.53 cm^{-1} (Flexión C-H), 1276.88 cm^{-1} (Flexión C-H), 1074.35 y 1041.56 cm^{-1} (Tensión C-O) y 646.15 cm^{-1} (Tensión C-H).

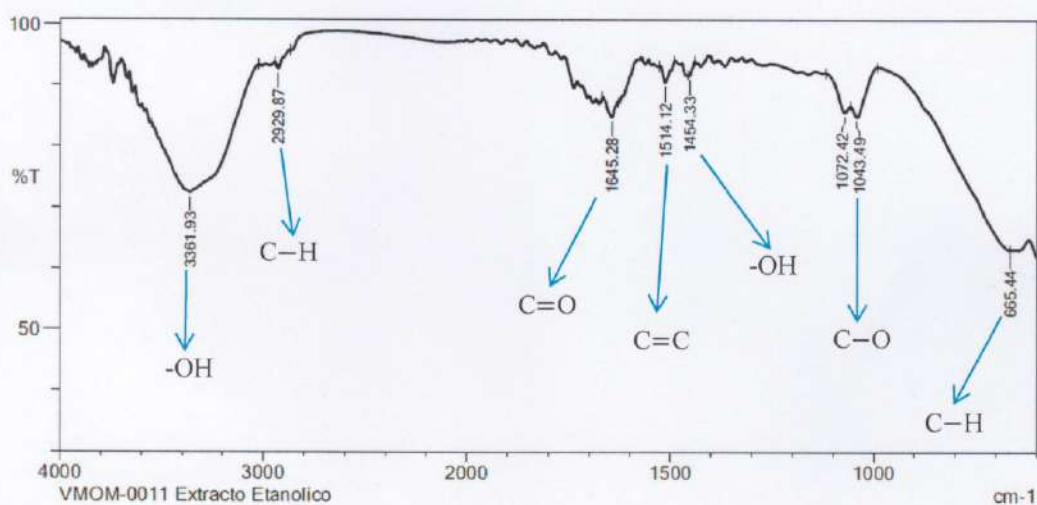


Figura 40: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de hojas de *Columnea nicaraguensis*. IR (KBr) cm^{-1} 3361.93 cm^{-1} (estiramiento O-H), 2929.87 (Estiramiento C-H), 1645.28 cm^{-1} (Tensión C=O), 1514.12 (Tención C=C), 1454.33 cm^{-1} (Flexión O-H), 1072.42 y 1043.49 cm^{-1} (Tensión C-O) y 665.44 cm^{-1} (Tensión C-H).

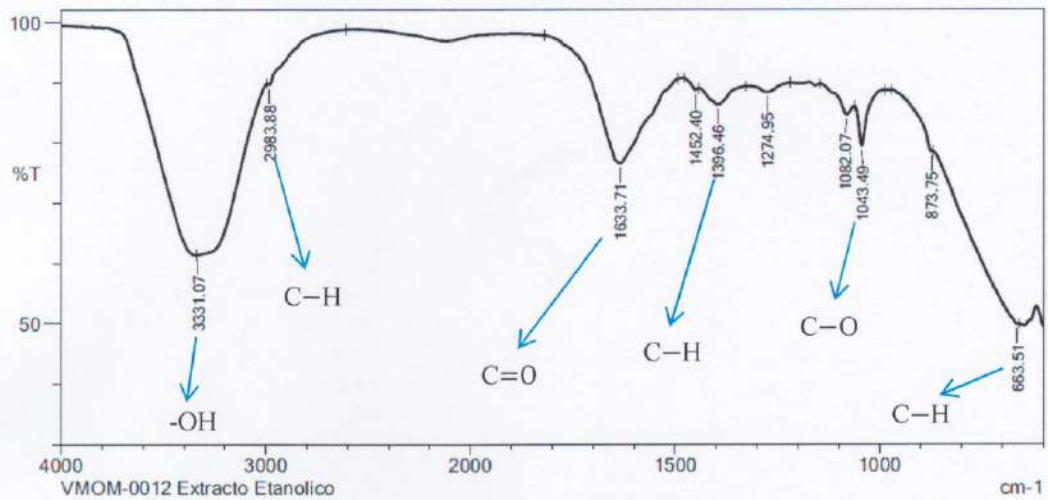


Figura 41: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de tallos de *Columnea nicaraguensis*. IR (KBr) cm⁻¹ 3331.07 cm⁻¹ (estiramiento O-H), 2983.88 (Estiramiento C-H), 1633.71 cm⁻¹ (Tensión C=O), 1452.40 cm⁻¹ (Flexión O-H), 1396.46 cm⁻¹ (Flexión C-H), 1072.42 y 1043.49 cm⁻¹ (Tensión C-O) y 663.51 cm⁻¹ (Tensión C-H).

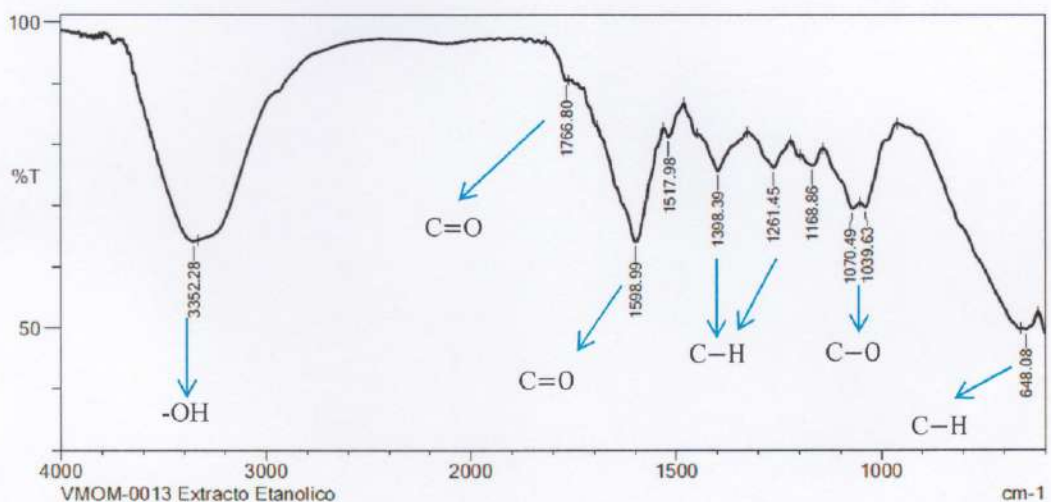


Figura 42: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de hojas de *Columnea zebrina*. IR (KBr) cm⁻¹ 3352.28 cm⁻¹ (estiramiento O-H), 1766.80 cm⁻¹ (Estiramiento C=O), 1598.99 (Tención C=O), 1398.39 cm⁻¹ (Flexión C-H), 1261.45 cm⁻¹ (Flexión C-H), 1168.86 cm⁻¹ (Flexión C-H), 1070.49 y 1039.63 cm⁻¹ (Tensión C-O) y 648.08 cm⁻¹ (Tensión C-H).

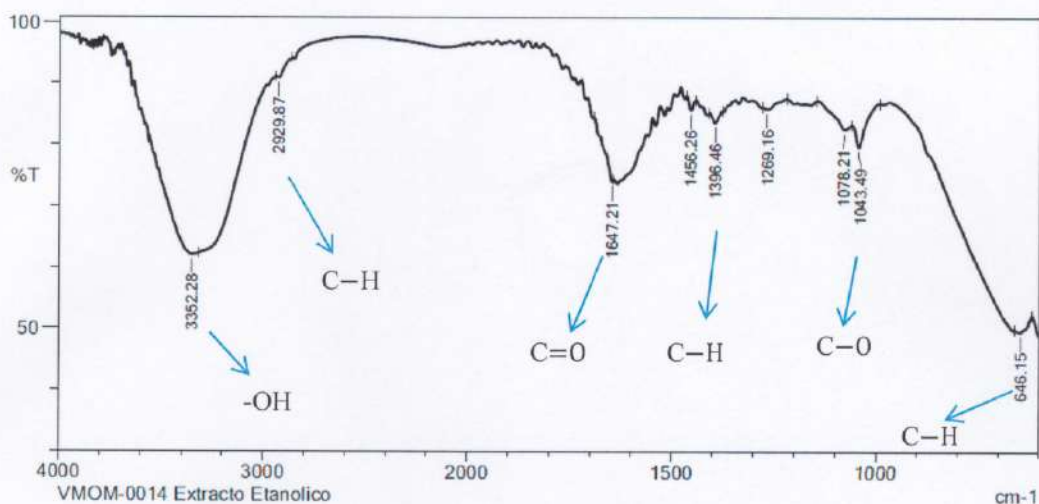


Figura 43: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de tallos de *Columnea zebrina*. IR (KBr) cm^{-1} 3362.28 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2929.87 (Estiramiento C-H), 1647.21 cm^{-1} (Tensión C=O), 1399.46 (Tención C-H), 1456.26 cm^{-1} (Flexión O-H), 1396.46 cm^{-1} (C-H) 1078.26 y 1043.49 cm^{-1} (Tensión C-O) y 646.15 cm^{-1} (Tensión C-H).

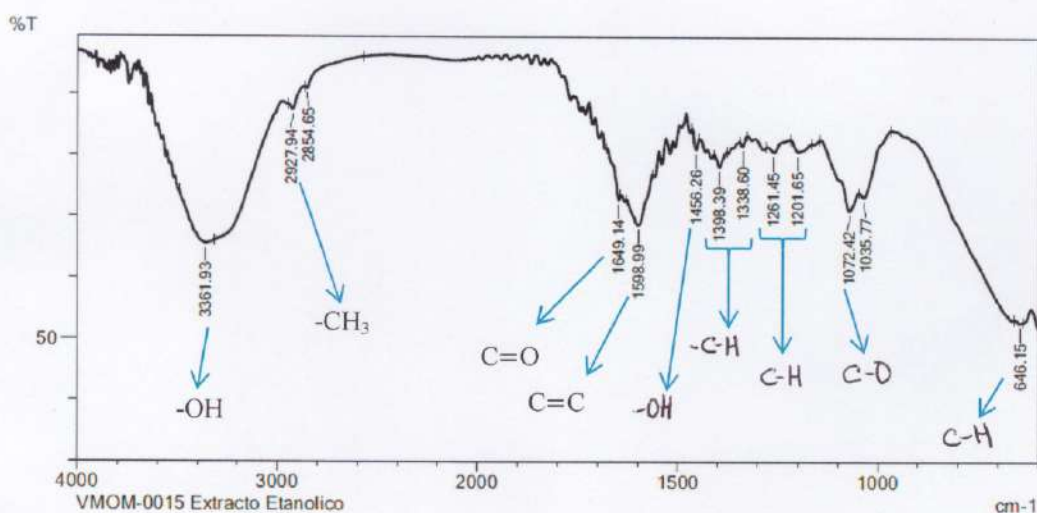


Figura 44: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de hojas de *Columnea billbergiana*. IR (KBr) cm^{-1} 3361.93 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2927.94 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 2854.65 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1649.14 cm^{-1} (Estiramiento C=O), 1598.99 cm^{-1} (Tensión C=C), 1398.39 y 1338.65 cm^{-1} (Flexión C-H), 1261.45 y 1201.65 cm^{-1} (Flexión C-H), 1072.42 y 1035.77 cm^{-1} (Tensión C-O) y 646.15 cm^{-1} (Tensión C-H).

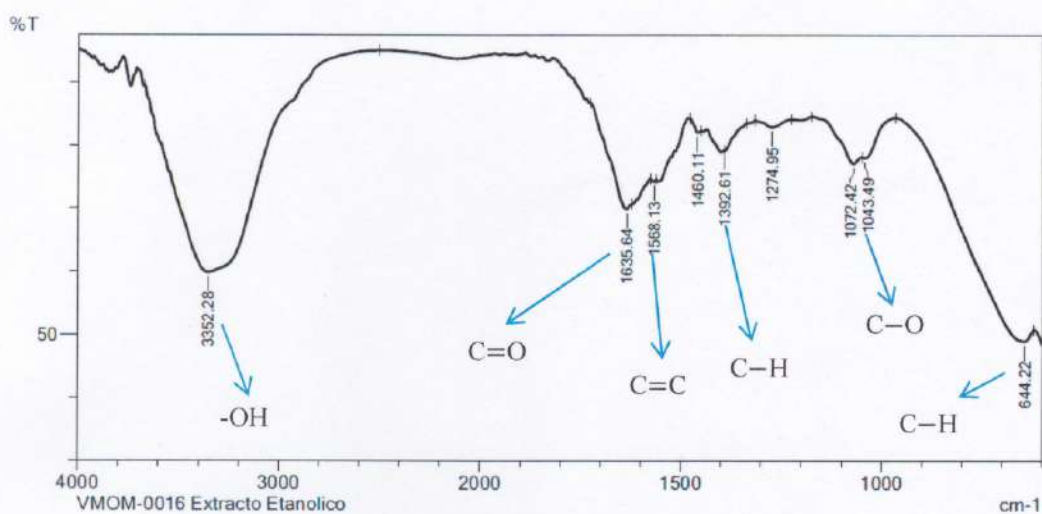


Figura 45: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para extracto etanólico crudo de tallos de *Columnea billbergiana*. IR (KBr) cm^{-1} 3352.28 cm^{-1} (Estiramiento O–H), 1635.64 cm^{-1} (Tensión C=O), 1568.13 cm^{-1} (Tensión C=C), 1392.61 cm^{-1} (Flexión C–H), 1274.95 cm^{-1} (Flexión C–H), 1072.42 y 1043.49 cm^{-1} (Tensión C–O) y 644.22 cm^{-1} (Tensión C–H).

Análisis por espectroscopía Infrarrojo (IR) para extracto etanólico purificado por cromatografía preparativa

En el cuadro 19 se resumen las principales frecuencias absorbidas en el espectro IR de extractos crudos de *Columnea maculata* y *Columnea nicaraguensis* para extractos etanólico y acuosos. En ambos extractos los patrones de frecuencias absorbidos son casi similares lo que podría indicar que ambas especies presentan los mismo metabolitos mayoritarios. Para estar más claro en este espectro se trató de purificar los extractos por cromatografía en capa fina para *Columnea maculata* tanto de hojas como para tallos y se obtuvieron cinco fracciones para hojas y cuatro para tallos.

Las fracciones F1- F5 (obtenidos de extractos etanólico de hojas y tallos) analizados por espectroscopía infrarroja presentaron bandas anchas entre $\sim 3400\text{-}3420 \text{ cm}^{-1}$ asignables a las vibraciones del estiramiento –OH de un alcohol, así como señales a

$\sim 1093\text{ cm}^{-1}$, adjudicables a alargamiento del enlace C-OH cuyas vibraciones de torsión aparecen entre $\sim 610\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ de ambos espectros de hojas de *Columnea maculata*.

De igual forma se observan estiramientos entre ~ 2850 y 2950 cm^{-1} , correspondientes al alargamiento C-H del esqueleto carbonado y a $\sim 1445\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente, de flexión de tijera C-H. Los extractos mostraron además señales típicas de presencia de doble enlaces ($\sim 1600\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$) (Figura 46-54)

Basándose en los resultados del tamizaje fitoquímico, se podría indicar que en los extractos se observan señales asignables a presencia de compuestos aromáticos oxigenados (flavonoides, fenoles) y según Ringuelet (2013) en un extracto etanólico se puede encontrar, Glucósidos triterpénicos, compuestos fenólicos como taninos y pigmentos flavonoides.

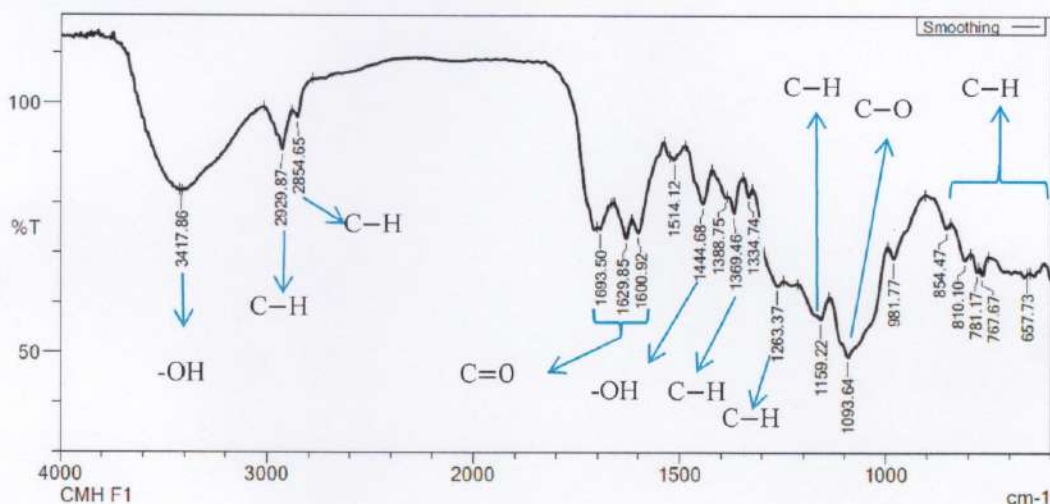


Figura 46: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para fracción F1 obtenido de la purificación de extracto etanólico de hojas de *Columnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3417.86 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2929.87 y 2854.65 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1693.50 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1629.85 y 1600.92 cm^{-1} (Tensión C=O), 1514.12 cm^{-1} (Tensión C=C), 1444.68 cm^{-1} (Flexión O-H), 1392.61 cm^{-1} (Tensión C-H), 1263.37 cm^{-1} (Flexión C-H), 1093.64 cm^{-1} (Tensión C-O) y 781.17 y 767.67 cm^{-1} (Tensión C-H).

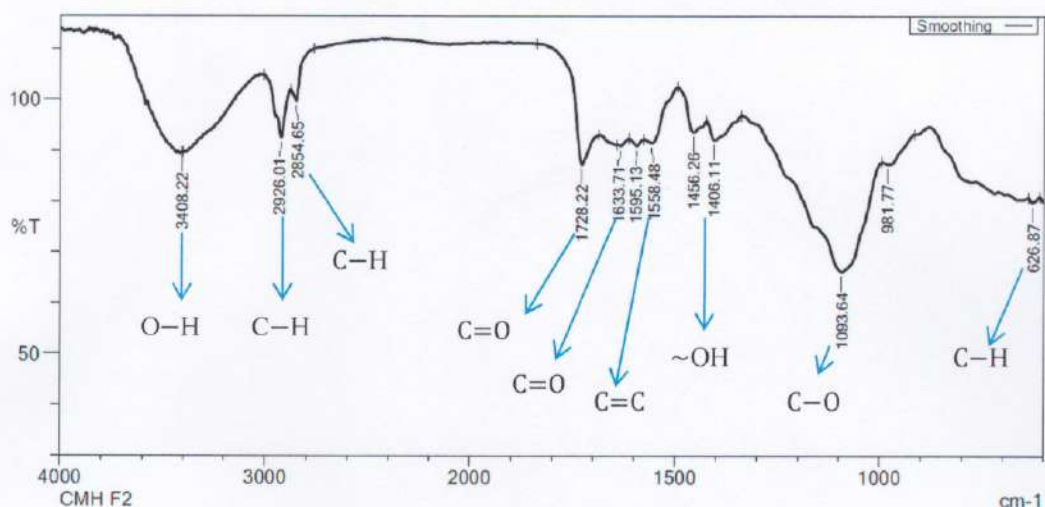


Figura 47. Principales señales del espectro infrarrojo (IR) para fracciones F2 obtenido de la purificación de extracto etanólico de hojas de *Columnnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3408.22 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2926.01 y 2854.65 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1728.22 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1633.71 cm^{-1} (Tensión C=O), 1595.13 y 1558.13 cm^{-1} (Tensión C=C), 1456.26 y 1406.11 cm^{-1} (Flexión O-H), 1093.64 cm^{-1} (Tensión C-O) y 627.87 cm^{-1} (Tensión C-H).

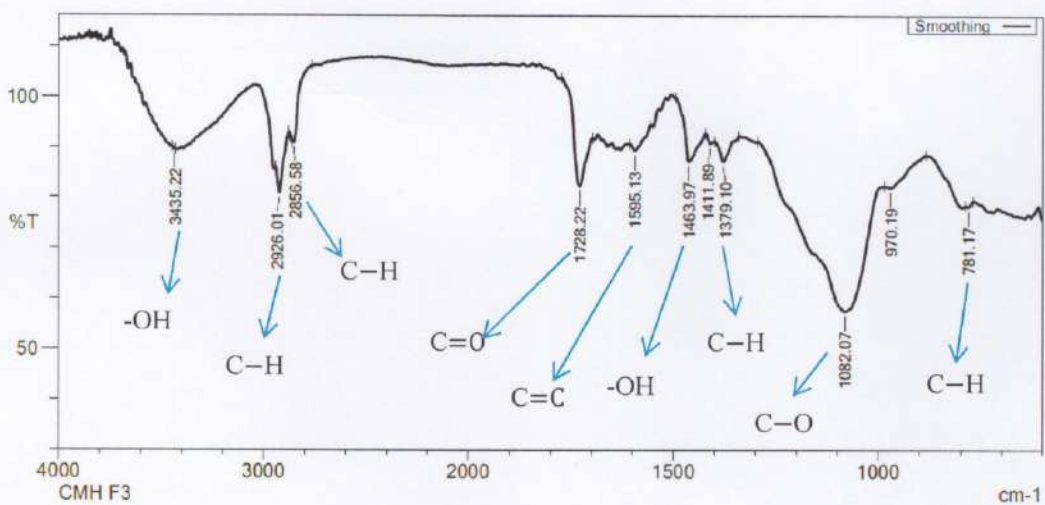


Figura 48: Espectro infrarrojo (IR) para fracciones F3 obtenido de la purificación de extracto etanólico de hojas de *Columnnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3435.22 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2926.01 y 2856.58 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1728.22 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1595.13 cm^{-1} (Tensión C=C), 1463.97 cm^{-1} (Flexión O-H), 1379.10 cm^{-1} (Tensión C-H), 1082.07 cm^{-1} (Tensión C-O) y 781.17 cm^{-1} (Tensión C-H).

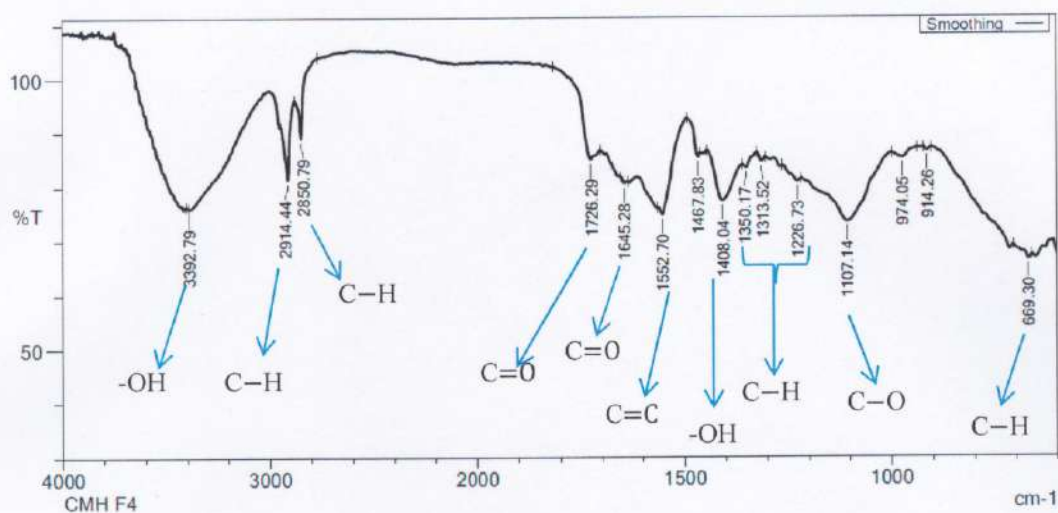


Figura 49: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para la fracción F4 obtenido de la purificación de extracto etanólico de hojas de *Columnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3392.79 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2914.44 y 2850.79 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1726.29 y 1693.50 cm^{-1} (Alargamiento y tensión C=O respectivamente), 1552.70 cm^{-1} (Tensión C=C), 1467.83 y 1408.04 cm^{-1} (Flexión O-H), 1350.27 y 1313.52 cm^{-1} (Tensión C-H), 1226.73 cm^{-1} (Flexión C-H), 1107.14 cm^{-1} (Tensión C-O) y 669.30 cm^{-1} (Tensión C-H).

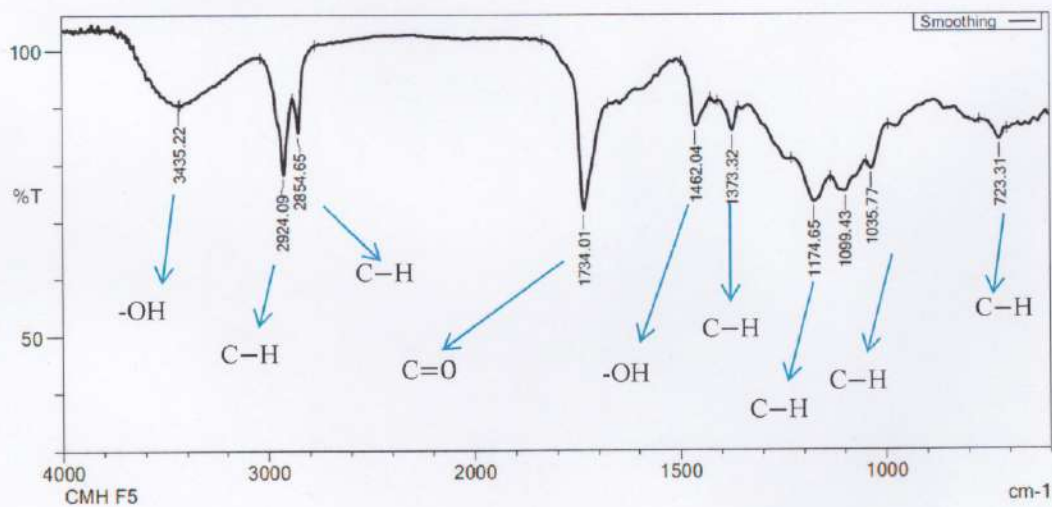


Figura 50: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para la fracción F5 obtenido de la purificación de extracto etanólico de hojas de *Columnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3435.22 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2924.09 y 2854.65 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1734.01 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1462.64 cm^{-1} (Flexión O-H), 1373.32 cm^{-1} (Tensión C-H), 1174.65 cm^{-1} (Flexión C-H), 1099.43 y 1035.77 cm^{-1} (Tensión C-O) y 723.31 cm^{-1} (Tensión C-H).

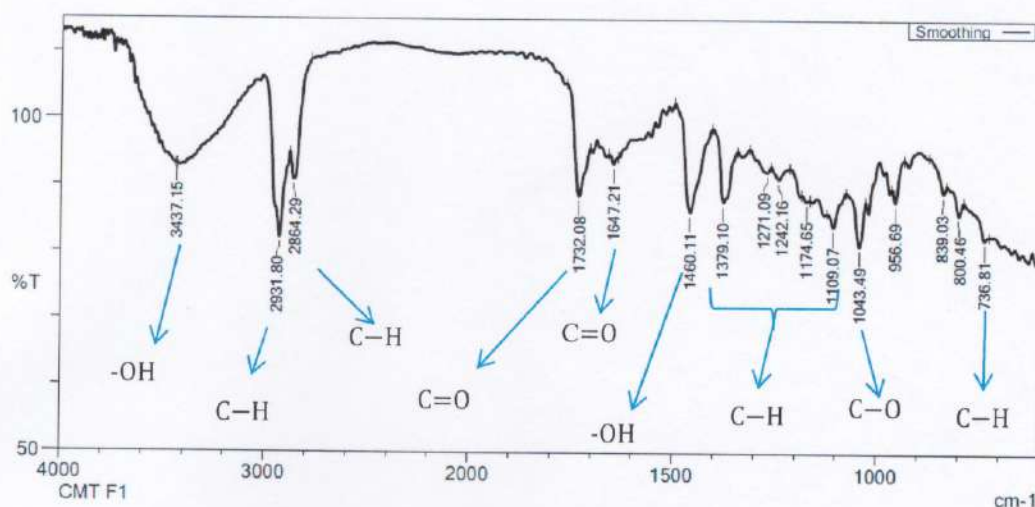


Figura 51: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para la fracción F1 obtenido de la purificación de extracto etanólico de tallos de *Columnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3437.15 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2931.08 y 2864.29 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1732.08 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1647.21 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1460.11 cm^{-1} (Flexión O-H), 1379.19 cm^{-1} (Tensión C-H), 1271.09-1242.16 cm^{-1} (Flexión C-H), 1043.49 cm^{-1} (Tensión C-O) y 736.81 cm^{-1} (Tensión C-H).

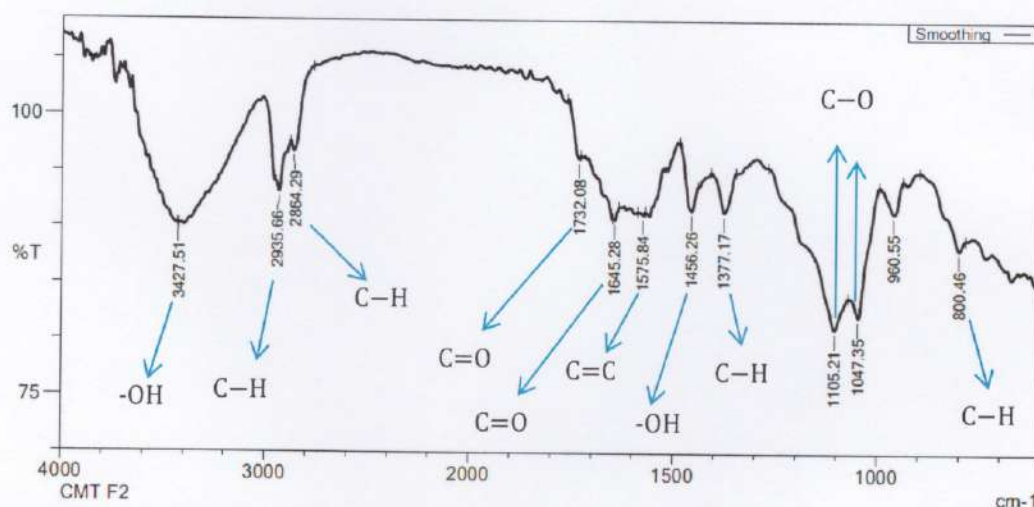


Figura 52: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para la fracción F2 obtenido de la purificación de extracto etanólico de tallos de *Columnea maculata*. IR (KBr) 3427.51 cm^{-1} (Estiramiento O-H), 2935.66 y 2864.29 cm^{-1} (Estiramiento C-H), 1645.28 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1578.84 cm^{-1} (Tensión C=C), 1456.26 cm^{-1} (Flexión O-H), 1377.17 cm^{-1} (Tensión C-H), 1105.21 cm^{-1} (Tensión C-O), 1047.35 cm^{-1} (Tensión C-O) y 800.46 cm^{-1} (Tensión C-H).

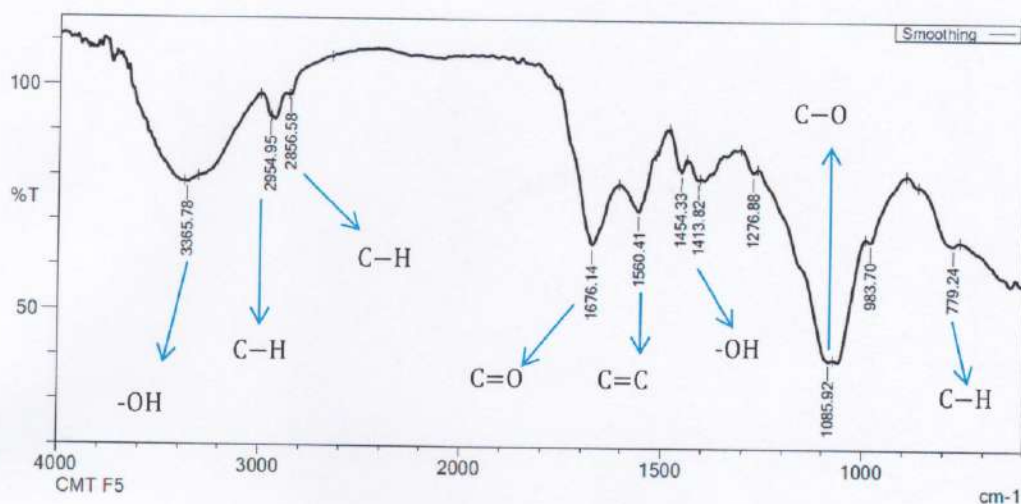


Figura 53: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para fracción F5 obtenidos de la purificación de extractos etanólico de tallos de *Columnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3305.78 cm^{-1} (Estiramiento O–H), 2954.95 y 2856.58 cm^{-1} (Estiramiento C–H), 1676.14 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1560.41 cm^{-1} (Tensión C=C), 1454.33 y 1413.82 cm^{-1} (Flexión O–H), 1085.92 cm^{-1} (Tensión C–O) y 779.24 cm^{-1} (Tensión C–H).

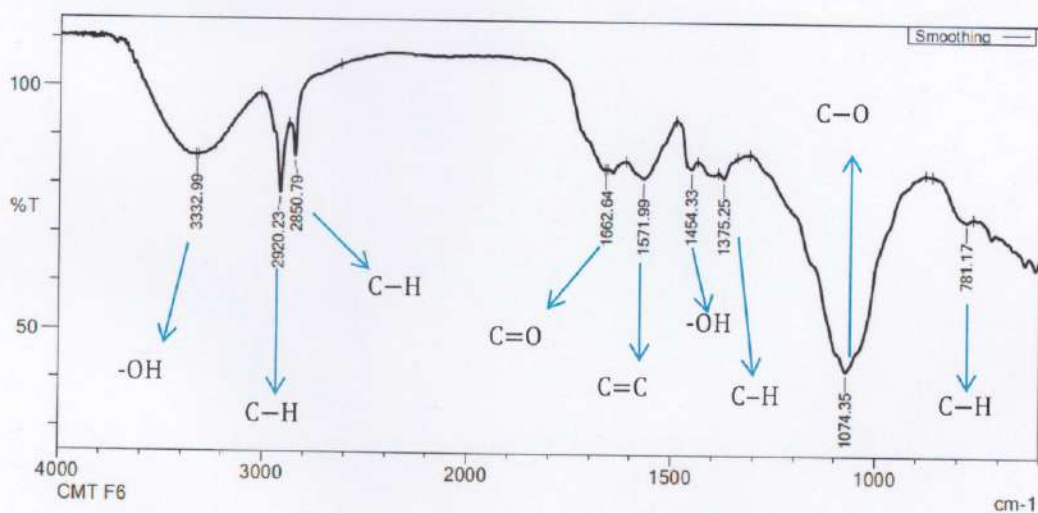


Figura 54: Principales señales de espectro infrarrojo (IR) para fracción F6 obtenidos de la purificación de extractos etanólico de tallos de *Columnea maculata*. IR (KBr) cm^{-1} 3232.99 cm^{-1} (Estiramiento O–H), 2920.21 y 2850.79 cm^{-1} (Estiramiento C–H), 1662.64 cm^{-1} (Alargamiento C=O), 1571.99 cm^{-1} (Tensión C=C), 1454.33 cm^{-1} (Flexión O–H), 1375.25 cm^{-1} (Tensión C–H), 1074.35 cm^{-1} (Tensión C–O) y 781.17 y cm^{-1} (Tensión C–H).

Tabla 18: Principales señales del espectro infrarrojo de los extractos crudo etanólico y acuoso de *Columnnea maculata* y *Columnnea nicaraguensis*.

Especi	Organo	Frecuencia (cm ⁻¹)										
		OH Estiramiento	C-H Alargamiento ₀	C=O Alargamiento ₀	C=O Tensión	C=C Tensión	O-H Flexión	-C-H Tensión	-C-H Flexión	C-O Tensión	C-H Tensión anillo aromático	
<i>C. maculata</i>	Hojas	EX. Acu	3271.27	2935.66	1768.72	-	1593.20 1591.84	-	1394.53	1259.52 1163.08	1074.35	815.89
		EX. Eta.	3253.91	2900.94	1766.80	-	1595.13 1502.55	-	1396.46 1354.03	1261.45 1193.94	1178.51 1076.28	646.15
	Tallós	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EX. Eta.	3361.93	2893.22	-	1676.14 1625.99	1514.12	-	1394.53	1276.88	1074.35 1041.56	646.15
	<i>C. nicaraguenses</i>	Hojas	EX. Acu	3334.92	2906.73	-	1604.77	-	1398.39	1263.37	1074.35	669.30
			EX. Eta.	3361.93	2929.89	-	1645.28	1514.12	1454.33	-	1072.42 1043.49	665.44
Tallós		EX. Acu.	3288.63	-	-	-	1593.20	-	1398.39	1282.66	1074.35 1041.56	650.01
		EX. Eta.	3331.07	2883.88	-	1633.71	-	1452.40	1396.46	1274.95	1082.07 1043.49	873.75 663.51

EX. Acu. = Extracto acuoso EX. Eta. = Extracto etanólico NR= NO realizado (no se logró realizar el IR)

Tabla 19: Principales señales del espectro infrarrojo de nueve fracciones de extracto etanólico de *Columnnea maculata* (Extracto de tallos y hojas purificadas)

Fracciones	Parte de la planta	Frecuencia (cm ⁻¹)											
		~OH Estiramiento	~CH Alargamiento	~C=O Alargamiento	~C=O Tensión	~C=C	~OH Flexión	~CH Sp ³	~CH Flexión	~CO Tensión	~CH Tensión ~ anillo aromático		
F1	Hojas	3417.86	2929.87	1693.50	1629.85	1514.12	1444.68	1388.75	1263.37	1093.64	781.17		
F2		3408.22	2926.01	1728.22	-	-	1456.26	-	-	1093.64	-		
F3		3435.22	2926.01	1728.22	-	1595.13	1463.97	1379.10	-	1082.07	-		
F4		3392.79	2914.44	1726.29	1645.28	1552.70	1467.83	-	1226.73	1107.14	-		
F5		3435.22	2924.09	1734.01	-	-	1408.04	1373.32	1174.65	1099.43	723.31		
		2854.65	2854.65	1600.92	1411.89	1462.04	1035.77						
F1	Tallos	3437.15	2931.80	1732.08	1647.21	-	1460.11	1379.10	1224.16	1043.49	800.46		
F2		3427.51	2935.66	1732.08	1645.28	1575.84	1456.26	1377.17	1174.65	1047.35	736.81		
F5		3365.78	2954.95	-	1676.14	1560.41	1454.33	-	1276.88	1105.21	960.55		
F6		3332.99	2920.23	-	1662.64	1571.99	1413.82	1375.25	-	1085.92	800.46		
		2850.79	2850.79	-	1454.33	1074.35					781.17		

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

En porcentaje de humedad para extractos de hojas de las cuatro especies presentaron alto contenido de agua de 80-90% y el contenido de agua en los tallos entre los 70-80%.

El contenido de sólidos totales en las hojas presentaron pequeñas diferencias entre las especies y entre los órganos, tanto en extracto acuoso, como en extracto etanólico. Con el estadístico U de Mann-Whitney se concluyó que había diferencia significativa entre las medias de los extracto con $P=0.000$.

Con el estadístico U de Mann-Whitney se rechazó la hipótesis nula (H_0) ya que el valor P calculado fue menor que 0.05 ($P=0.000$) por lo tanto había evidencia para concluir que existe diferencia significativa entre la media de pH de los extracto acuoso con respecto a la media de pH del extracto etanólico

El pH de los extractos acuoso fueron cambiando a medida que pasaba el tiempo; ya que los valores iniciales fueron de 4 (ácido) hasta llegar a los 7 (neutro) después de dos semanas; en cambio los extractos etanólico no presentaron cambios considerables en el pH con el pasar de los días.

Los compuestos mayoritario identificado por pruebas fitoquímico fueron tipo flavonoides, taninos condensados, triterpenos y saponinas triterpénicos.

Con el análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se logró realizar placas preparativas para la purificación del compuesto y la fase móvil final utilizada fue una combinación de Ciclohexano, acetato de etilo y metanol en proporción de 7:2:1; por otra parte no se logró conseguir una fase móvil para extracto acuoso.

Con esta técnica de CCF se logró observar que los extractos etanólico de tallos son más eficientes para realizar placas preparativas ya que no se observó mucha clorofila en el cromatograma.

Con el análisis UV-visible se obtuvieron principales absorbancia para algunos compuestos mayoritarios en los rangos de 270 a los 300 nm para extractos acuoso, de

270 a 532 nm para extractos etanólico, que corresponde a los grupos de flavonoides tipo antocianinas y taninos según el patrón de quercetina y ácido tánico y se observaron máximos correspondientes a los pigmentos tipo clorofila (665-670nm).

El análisis de los extractos de hojas de *Columnnea* spp. en el espectrofotómetro infrarrojo se observaron bandas anchas de estiramiento -OH de alcoholes y fenoles, así como vibraciones de alargamiento del enlace C-OH, vibraciones de estiramiento C-H de un aldehído, y las vibraciones de tensión C=O de posiblemente grupo funcional cetona, también se observaron vibraciones de tensión C=C de un aromático, señal para C-H₃ correspondiente al esqueleto carbonado, vibraciones de flexión de un C-O adjudicables a un aromático y señales de tensión C-O de tipo alifático.

Estos resultados confirma la presencia de compuestos polifenoles, ya que el extractos obtenidos presentaron aromas muy característicos y dos especies posee manchas marones en las hojas lo que indica la presencia de pigmentos tipos antocianinas, que pertenecen al grupo flavonoides.

Recomendaciones

Cuando se recolecta una muestra vegetal para análisis químico deben tomar en cuenta el clima y la distancia del sitio de muestreo; ya que mientras más lejos esté el sitio de recolecta más tarda en llegar al laboratorio que podría afectar el análisis.

Realizar estudios en más plantas y con mayor profundidad utilizando métodos más eficientes para conocer las estructuras químicas de los metabolitos mayoritarios.

Es importante tener presente que en el laboratorio se debe trabajar con mayor brevedad posible con las muestras, ya que al descomponerse los órganos vegetales se pierde gran cantidad de muestras y con ellos los metabolitos secundarios.

Para encontrar la fase móvil adecuado por correr muestra en cromatografía en capa fina es recomendable utilizar un solvente con polaridad media, e ir aumentando o disminuyendo la polaridad de los solventes solvente.

Mantener los extractos acuosos siempre bajo refrigeración, ya que es más propenso a descomponerse con mayor rapidez que el extracto etanólico.

Es necesario realizar análisis posteriores a los extractos de las especies en estudio para reforzar aún más esta investigación, que es de gran importancia debido a que, estas plantas son propensas a desaparecer por ser dependiente de sus hospederos y con actividad antropogénica se están destruyendo muchos bosques.

La población panameña debe velar por los recursos naturales que aún existen en los lugares más remotos del país, y que poseen gran valor bioquímico y posiblemente económico.

CAPÍTULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFARO, O. (2009). Plantas medicinales colectadas en Panamá. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).
- ALONSO O, M. J. (2010). *Plantas medicinales: del uso tradicional al criterio científico*. Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya.
- ÁLVAREZ C. E. & ORALLO C. F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Bioquímica. OFFARM*, 22(10).
- ANDERSEN, Ø.M. & M. JORDHEIM. 2006. The Anthocyanins, p. 472-511. In Ø.M. Andersen & R.K. Markham (eds.). *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca de Ratón, Florida, EEUU.
- ARANGO A. G. (2008). Alcaloides Y Compuestos Nitrogenados. [en línea]. Monografía. [Consulta: 16 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/biblioteca/pdf/100PM.pdf>.
- ARANGO A. G. (2010). Alcaloides Y Compuestos Nitrogenados. [en línea]. Monografía. [Consulta: 16 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/biblioteca/pdf/100PM.pdf>. [en línea]. Monografía.
- BENÍTEZ, N., & STASHENKO, E. (2009). Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 8(2), 145-150.

BRUNATTI, C., & MARTÍN, A. (2010). Introducción a la espectroscopía de absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano.

CABRERA, R., VALENZUELA-SOTO, E. M., REYES-VIDAL, Y., ESQUEDA, M., & ASAFF, A. (2013). Caracterización de los extractos metanólicos de poda de vid y paja de trigo y su oxidación por enzimas extracelulares de *Lentinula edodes*. *Revista mexicana de micología*, 37, 61-67.

CANO, N., G. (2015). Aislamiento e identificación de alcaloides oxindólicos en hojas de *Hamelia patens Jacq.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Chiriquí, Panamá

CHÁVEZ, J. O., PALADINES, J. O., & BACCA, C. (2007). Análisis fitoquímico preliminar de las hojas de la especie *Columnnea picta* (capitana), planta utilizada por la comunidad Awá cuaiquier como antiofídica. *Revista cubana de química*, 19(2), 59-63.

CORREA, M., GALDAMES, C. & STAPF, M. (2004). Catálogo de Plantas Vasculares de Panamá. Primera edición. Editorial Novo art S.A. Bogotá. Colombia. 601 Págs.

CORTÉS C. J., HERNÁNDEZ, J. C., GÓMEZ, M. D. R. Á., HERNÁNDEZ, J. L. F., INFANTE, M. R., LÓPEZ, L. M., & ASCENCIO, A. G. (2015). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo.

DE ERRATAS, F. E. (1985). Absorción de agua y nutrientes en plantas epífitas. *Actualidades Biológicas*, 14(52).

- ERAZO P., E. L. (2013). Separación y caracterización de los metabolitos secundarios de la hiedra (*Hedera helix*) del Ecuador con fines de aporte a una técnica de identificación (Bachelor's thesis).
- FAGUETTI, A. (2010). Fundamentos de la Medicina Tradicional Mexicana. [en línea]. Monografía. [Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2016]. Disponible en:
http://www.crim.unam.mx/drupal/crimArchivos/Colec_Dig/2011/Arturo_Arqueta/7_Funda_medicina_tradici_mex.pdf
- FONNEGRA, F. G., & JIMÉNEZ, J. R. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Universidad de Antioquia. [en línea]. Monografía. [Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2016].
- FREIRE-GONZÁLEZ, R. A., & VISTEL-VIGO, M. (2015). Caracterización fitoquímica de la *Curcuma longa* L. *Revista Cubana de Química*, 27(1), 9-18.
- GARCÍA LÓPEZ, A., CASTRO, P., & GUISELIA, A. (2019). Evaluación de la actividad antidiarreica del extracto acuoso de las hojas de Achiote (*Bixa Orellana*) en ratas albinas, Cepa Holtzman.
- GIMENO, C. E. (2004). Compuestos fenólicos: *Un análisis de sus beneficios para la salud*. Ámbitos farmacéuticos: nutrición. VOL 23 NÚM 6 JUNIO 2004.
- GÓMEZ, R., & MURILLO, R. (2006). Espectroscopía infrarroja. Universidad Nacional Autónoma de México.

- GONZÁLEZ, H., & RENÉ, E. (1995). Contribución al estudio fitoquímico y determinación de la acción antimicrobiana de *Senecio candidissimus* [por] Eder René Huacuja González.
- GUPTA, M. P. (2013). Cuatro Décadas De Investigaciones Farmacognósticas Sobre La Flora Panameña. *Tecnociencia*, Vol. 15, N° 2
- HALL, et al. 2002. Plantas Medicinales Volumen II. Centro Nacional de información de medicamento.
- HENRÍQUEZ, S., B. (2014). Análisis fitoquímico y actividad biológica de la corteza y hojas de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (Boraginaceae), Chiriquí, Panamá. (Tesis de Maestría inédita). Universidad Autónoma de Chiriquí, Panamá.
- HERNÁNDEZ-ROSAS, J. I. (2004). *Características del substrato de plantas del dosel de un bosque húmedo tropical de tierras bajas (Alto Orinoco, Venezuela)*. Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia.
- HERRERA Z., A. C. (2011). Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el Ingenio Pichichí SA (Doctoral dissertation, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira).
- HIJUELO, B, Y., (2013). Etnobotánica Y Medicina Herbolaria. *Revista Cubana de Antropología Sociocultural*. Vol. III Número 3. Año (2013).
- MARTINEZ, A., OSPINA, F., VALENCIA, G., & JIMENEZ, N. (2003). Manual de Practicas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica

2003. *Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Medellín. Colombia.*

MORALES, D. (2013). Características Fitoquímicas que determinan la herbivoría de *Epidendrum exasperatum* y *Epidendrum stamfordianum* (Orchidaceae) por *Acromyrmex coronatus* Formicidae, Hymenoptera, Fortuna, Panamá 2011-2012. (Tesis de maestría), UNACHI, Panamá.

MORALES, O. L. (2015). *Flora Medicinal De Uso Tradicional En El Corregimiento De Kankintú, Distrito De Kankintú; Comarca Ngäbe-Bugle, Panamá.* (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Chiriquí Panamá.

PINO-BENITES, N. (2006). Botánica y Screening fitoquímico de doce plantas usadas en medicina tradicional en el Departamento del Chocó, Colombia. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 2 (1): 33-44, 2006.

OCHOA PACHECO, A., ESCALONA ARRANZ, J. C., FECHINE TAVARES, J., & SOBRAL DA SILVA, M. (2015). Evaluación fitoquímica de hojas de *Excoecaria lucida* Sw.(Aité) (Euphorbiaceae) y Aislamiento e Identificación de un hemiterpenoide. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 117-130.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S.). (2002). *Medicina tradicional: necesidades crecientes y potencial* (No. WHO/EDM/2002.4). Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S.). (2003). Medicina Tradicional, Necesidades Crecientes y Potencial [en línea]. 2 de Mayo de 2002. [Fecha de consulta: 17 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2295s/s2295s.pdf>
- ORTIZ, O. O., FLORES, R., McPherson, G., CARRIÓN, J. F., CAMPOS-PINEDA, E., & BALDINI, R. M. (2019). Additions to the flora of Panama, with comments on plant collections and information gaps. *Check List*, 15, 601.
- PAREDES M., H. F., & ANN, M. (2007). Identificación y cuantificación de las saponinas contenidas en el fruto de la especie *Cucumis dipsaceus* por cromatografía de líquidos de alta resolución (hplc).
- PÉREZ-CALIX, E. (2000). Flora Del Bajío Y De Regiones Adyacentes: Gesneriaceae. Fascículo 84; [Fecha de consulta: 17 de Octubre de 2016]. Disponible en: http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/listado_floba_links.htm
- RAMÍREZ-ROA, A. (2008). Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Gesneriaceae. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología.
- RIAÑO, D., V, P., & CHUVIECO, E. (1999). Estimación del contenido de humedad en la jara (*Cistus ladanifer*) A PARTIR RADIOMETRÍA DE LABORATORIO. *Teledetección. Avances y Aplicaciones*, 92-95.
- RINGUELET, J. A., & VIÑA, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- RODAS, I. M. (2004). Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

RODRÍGUEZ P. & Félix M. (2000). Estudio fitoquímico de especies de la familia *celastraceae* (flora panameña): *Maytenus blepharodes* y *crossopetalum lobatum*. [Consulta: 16 de Octubre de 2016]. Disponible en <ftp://tesis.bbtk.ull.es/ccppytec/cp134.pdf>

RODRIGUEZ, R. (2011). Estudio de la Flora Medicinal en el Corregimiento de Umäni y Cerro Caña, Distrito de Muna, Comarca Ngäbe-Buglé, Panamá (224-629 m.s.n.m.). Universidad Autónoma Chiriquí. Panamá. 114 Págs.

RONDINA, R. V., PALACIOS, P., VACCARO, M. D. C., FILLIP, R., & COUSSIO, J. D. (1985). Metodología para la preparación y fraccionamiento Sistemático de extractos Vegetales con miras a su ensayo Farmacológico y eventual estudio químico. *Acta Farm. Bonaerense*, 4(1), 3-14.

SALAS, A. (2006). "Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro". Universidad Autonoma de Queretaro, Universidad Autonoma de Zacatecas: Queretaro, Zacatecas, Mexico.

SARKAR, R., HAQUE, A., RANJAN, S., & SARKER, M. (2015). Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial effects of *Abutilon Indicum* (Linn.) leaves extracts. *Pharmacologyonline*, 1, 94-103.

SOSA, G. R. (2010). El poder medicinal de las plantas. Séptima edición. Asociación Publicadora Interamericana. Miami, Florida. 239 Págs.

STUART, B. (2000). Infrared spectroscopy. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-18.

- SUAREZ, C. J. (2007). Más de 100 Plantas Medicinales; Medicina Popular Canaria [en línea]. Monografía. Primera Edición. [Consulta: 16 de Octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/biblioteca/pdf/100PM.pdf>.
- TANG, H., WEI, Y. B., ZHANG, C., NING, F. X., QIAO, W., HUANG, S. L., & GU, L. Q. (2009). Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of oxoisoaporphine and oxoaporphine derivatives as new dual inhibitors of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase. *European journal of medicinal chemistry*, 44(6), 2523-2532.
- TOSI, A. J. (1971). Investigación y Demostraciones Forestales, Panamá, Zona de Vida. Primera Edición. Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Panamá. 123 Pág.
- WOODSON, R. E., SCHERY, R. W., & SKOG, L. E. (1978). Flora of Panama. Part IX. Family 175. Gesneriaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 783-996.

CAPÍTULO VI

ANEXOS (Imágenes)

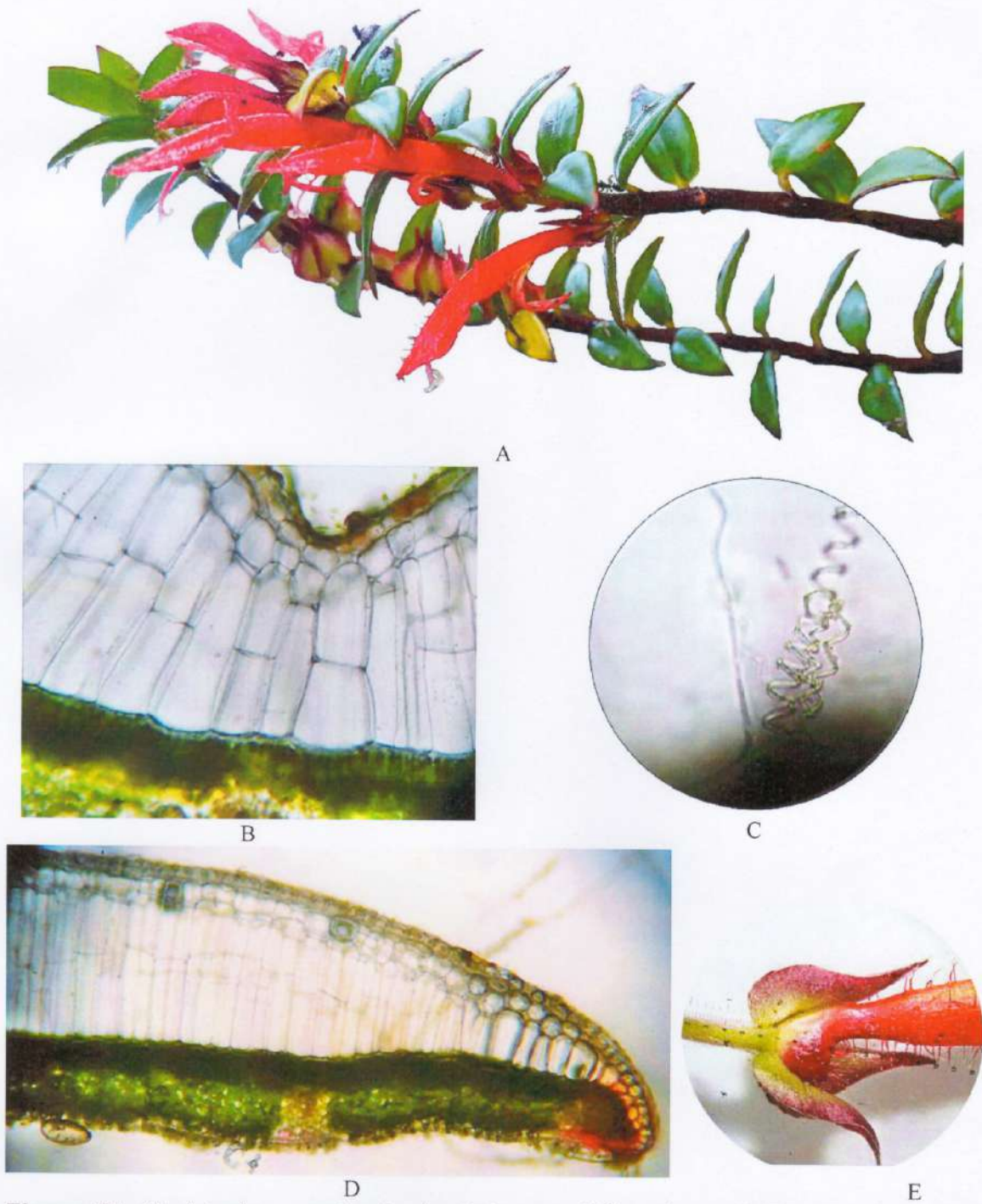


Figura 55. Morfología y anatomía de *Columnea billbergiana*. A) Ramas con flor, B) Células de parénquima acuíferos, C) Rafidios en forma de resortes, D) Corte transversal de hojas, E) Cáliz con la disposición de la corola vista en estereoscopio



Figura 56. Proceso realizado en el laboratorio. A) Hoja de *Columnea maculata*, B) Tallos de *Columnea maculata*, C) Extracción por método de percolación (por 8 días), D) *Columnea zebrina*, E) medición de hojas de *C. zebrina* con calibrador vernier.



Figura 57. Proceso realizado en el laboratorio. A) Refractómetro, B) Medición de grado Brix, C) Extracto etanólico de hojas, D) Extracción etanólico de tallos de *Columnnea nicaraguensis*, E) Extracción etanólico de hojas de *Columnnea nicaraguensis*.



Figura 58. Proceso realizado en el laboratorio. A) Extracto etanólico, B) Extracto acuoso, C) Extracto acuoso de hojas de *C. maculata* (rojo) y de tallos de *C. maculata* (amarillo), D) Ensayo de saponina con agua caliente (*C. nicaraguensis*), E) Ensayo de tanino de hojas de *C. nicaraguensis*.



Figura 59. Ensayo cromatográfica. A) Cromatograma de extracto etanólico de *Columnea* spp.; B) Cromatograma etanólico de tallos de *C. maculata*; C) Muestra obtenido de la purificación (placa preparativa, fase normal); D) Cromatograma observado bajo luz UV 254 nm (*C. maculata*); E) Cromatograma con revelador vainillina (señalado con flecha rojo).

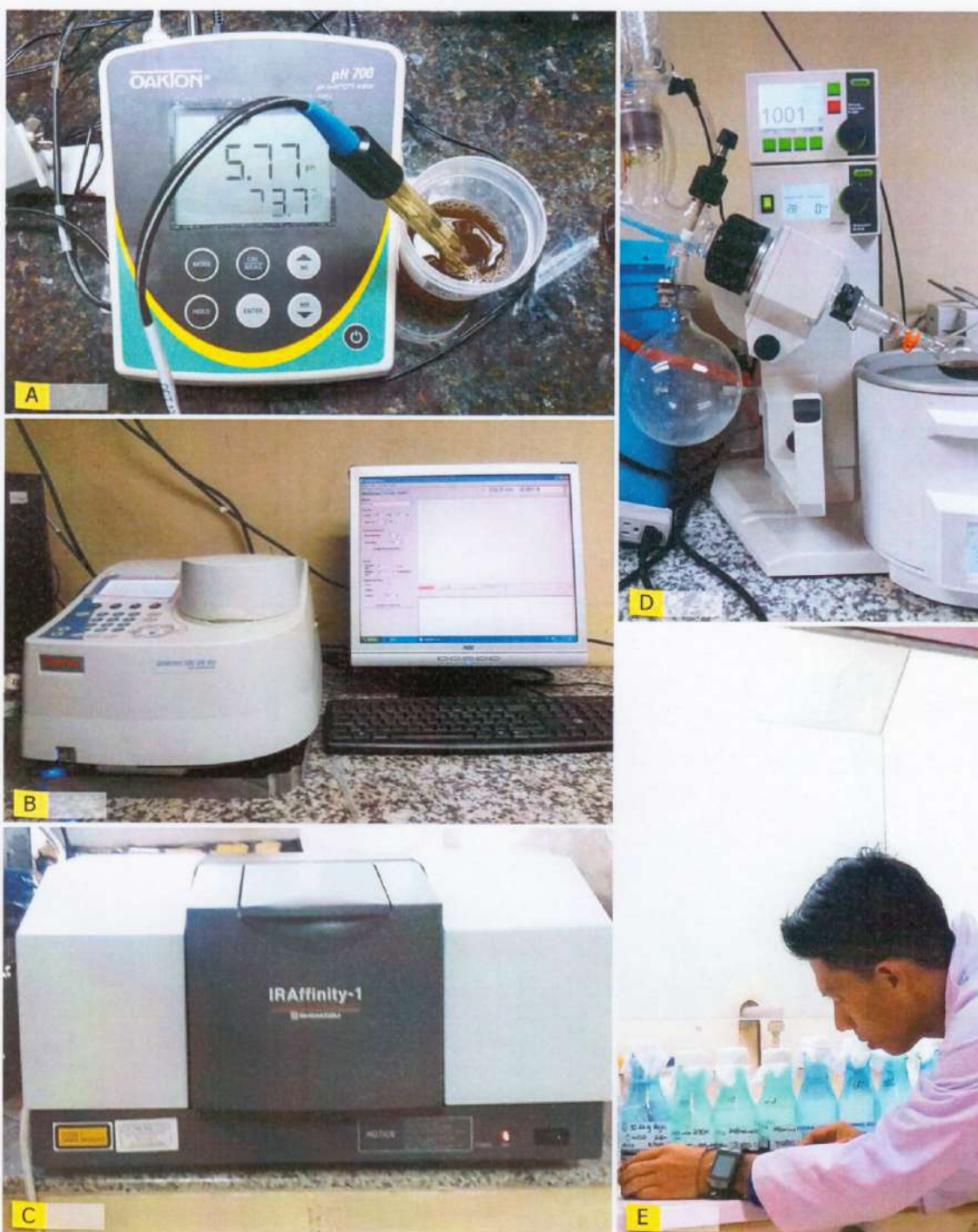


Figura 60. Equipos de laboratorio. A) Potenciómetro; B) Espectrofotómetro UV-visible; C) Espectrofotómetro infrarrojo; D) Rotavapor ; E) Proceso de decantación de extracto etanólico.