

DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CROMATOGRFIA EN CAPA DELGADA A ESPECIES CON USO ETNOMEDICINAL COMO ESTRATEGIA PEDAGÓGICA EN EL AULA DE CLASE

DETERMINATION OF SECONDARY METABOLITES BY THIN LAYER CROMATROGRAPHY ON SPECIES WITH ETHNOMEDICINAL USE AS A PEDAGOGICAL STRATEGY IN THE CLASSROOM

Nayive Pino^{1,2}, Rommel Álvarez¹, Gloria Prado¹

¹. Universidad Tecnológica del Chocó Diego Luis Cordoba, Facultad de Educación, Grupo de Productos Naturales, Quibdó-Chocó, Colombia.

². Bio-Red-CO-CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Recibido: Agosto 1 de 2017

Aceptado: Octubre 2 de 2017

*Correspondencia del autor: Nayive Pino. Universidad Tecnológica del Chocó Diego Luis Cordoba, Facultad de Educación, Grupo de Productos Naturales, Quibdó-Chocó E-mail: nayivepino@gmail.com

RESUMEN

Dado que desde hace algunos años se tiene la preocupación de la pérdida de la biodiversidad y la necesidad creciente de relacionar la experimentación y la aplicación de estrategias pedagógicas que permitan que instituciones como la Universidad Tecnológica del Chocó forme licenciados de la región en conocimientos que den alto valor agregado a nuestra biodiversidad para una importante educación ambiental que permita a los alumnos descubrir y comprender una serie de situaciones y conceptos frente al medio ambiente que nos rodea. En ese contexto los metabolitos secundarios es la denominación de los productos naturales que exhiben propiedades biológicas y algunas veces ecológicas, y de acuerdo a sus propiedades químicas se pueden clasificar como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes, entre otros. El objetivo del estudio fue identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en 11 especies vegetales mediante la técnica de cromatografía en capa delgada, se usaron como reveladores rayos UV, vainillina-ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y fast blue. Los resultados muestran que los principales compuestos evidenciados fueron: fenólicos en 8/11, cumarinas en 7/11 y terpenos en 6/11 de las muestras evaluadas. Estos resultados son acordes a los realizados previamente a dichas muestras mediante pruebas colorimétricas. Las especies con mayor familias de compuestos encontradas fueron la *V. macrophylla* en 4/5 seguida de *H. oblongifolia*, *C. silvestre* y *H. mancinella* en 3/5. De acuerdo con literatura consultada varios de los metabolitos identificados en estas especies son biológicamente activos, lo que hace potencial a dichas especies para validar el uso que ancestralmente se les atribuye como etnomedicinales.

Palabras claves: Plantas medicinales, CCD, fenoles, cumarinas, terpenos.

ABSTRACT

Given that for some years now, there is a concern about the loss of the biodiversity of Colombia, and also about the increasing necessity for linking experimentation and application of pedagogical strategies, which allow institutions, such as Technological University of Chocó, to train professionals from the region in the knowledge of generating a high value-added biodiversity. This is for an important environmental education, through which students are enabled to find and comprehend a series of concepts and situations regarding their surrounding environment. In that context, secondary metabolites are the denomination of natural products that demonstrate biological and, sometimes, ecological properties. According to the chemical properties, secondary metabolites may be classified as medicine, insecticides, herbicides, perfumes, artificial colorings, among others. The objective of this study is to qualitatively identify and characterize secondary metabolites from 11 ethnobotanical species, by using the thin layer chromatography method. UV rays, vanillin - sulfuric acid, sodium hydroxide, and fast blue were used as the developer solutions. The obtained results determined the following, as the major evidenced compounds (secondary metabolites) in the samples tested from ethanolic extracts of leaves and bark species: phenols in 8/11, coumarins in 7/11, and terpenes in 6/11. These results match the preliminary studies carried out by other researchers through colorimetric techniques at the laboratory of the natural products research group. *V. macrophylla* in 4/5 followed by *H. oblongifolia*, *C. silvestre* y *H. mancinella* en 3/5 were the found species with the highest number of families of secondary metabolites. According to literature review, some species of identified compounds in this study have biological activity, which could validate the use that is ancestrally attributable as ethnomedicine.

Keywords: Medicinal plants, TLC, phenols, coumarin, terpenes.

INTRODUCCIÓN

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales, García (2009).

El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas especializadas las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora (García 2004).

“Actualmente es reconocida la utilización empírica de

las plantas como agentes curativos en los estados no deseados de la salud en múltiples culturas del mundo, y este conocimiento ha sido transmitido a través de generaciones. Este saber ha ido perfeccionándose a lo largo de la historia, teniendo su aplicación en la medicina actual” Cañigual *et al.* (2003).

Muchas familias de plantas como las Myrtaceae, Asteraceae y Piperaceae son bien conocidas por tener principios activos como los terpenoides y grupos de amidas que tienen efecto antialimentario, repelente e insecticida que inhibe el desarrollo y el crecimiento de muchos insectos del orden Lepidóptera (Celis *et al.* 2008). Según Pino (2009) en la localidad de Quibdó, las hojas de *Syzygium malaccense* (Myrtaceae) son usadas como adelgazante y para el tratamiento de la diabetes, lo que puede estar soportado por la presencia de esteroides. En las comunidades locales las hojas amasadas de *Clibadium silvestre* (Asteráceae) son usadas como ictiotóxicas para adormecer a los peces y pescarlos fácilmente. Las especies utilizadas en este trabajo tienen usos medicinales en las localidades estudiadas, tales como: *Solanum nudum* (Solanaceae) rica en alcaloides, las hojas amasadas de esta planta son usadas frecuentemente en ventas callejeras como quita guayabo (para los que

han ingerido alcohol), contra afecciones del hígado y la bilis, para controlar problemas menstruales y contra la malaria, Pino (2009).

Este trabajo se realiza con el objetivo de motivar la investigación científica en estudiantes de la Licenciatura en Biología y Química de la Universidad Tecnológica del Chocó, llegando a caracterizar e identificar cromatográficamente las familias de metabolitos secundarios presentes en las especies vegetales con frecuencia de uso medicinal en la región, dichas especies son: *Solanum nudum*, *Hymenaea oblongifolia*, *Symphonia globulifera*, *Columnnea parviflora*, *Bellucia pentamera*, *Vismia macrophylla*, *Crotón cf. fragans*, *Clibadium silvestre*, *Hippomane mancinella*, *Sabicea colombiana* y *Syzygium malaccense*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: El trabajo de investigación se realizó en el departamento del Chocó, el cual está localizado en una de las zonas de mayor pluviosidad en Colombia y el mundo, alcanzando los 10.749 mm en promedio al año, tiene una temperatura promedio de 28°C y humedad relativa entre 85 y 95%. El corregimiento de Pacurita, se encuentra a una distancia aproximada de 6.5 km de la cabecera municipal de Quibdó, llegando por vía carretable. Geográficamente este corregimiento está ubicado sobre la margen izquierda del río Cabí, a los 5° 41' de latitud norte y a 76° 40' de longitud al oeste de Greenwich, limita al norte con el río Cabí y los corregimientos de Guadalupe y la Troje, pertenecientes al municipio de Quibdó, al oriente con el corregimiento de Guadalupe y el municipio del Atrato, al sur con el municipio del Atrato; se encuentra a 40 metros sobre el nivel del mar y presenta una extensión de 180 km². En este lugar predominan las formaciones vegetales típicas de la selva pluvial central (CODECHOCÓ, 1997).

Muestras vegetales: los extractos totales puros y secos fueron proporcionados por el grupo de investigación de productos naturales de la Universidad Tecnológica del Chocó (UTCH), los cuales se extrajeron por maceración en frío durante 15 días en frascos de vidrio con etanol al 96%, filtrado y concentrado a presión reducida en rotaevaporador Buchi modelo R-210-215.

Cromatografía en capa delgada (CCD): Se disolvieron aproximadamente 50 ml de cada extracto de hojas en etanol hasta obtener una solución, se utilizaron para la siembra de los extractos placas de sílica gel 60 F 50

de aluminio, para la fase móvil se realizaron ensayos con: Tolueno - Acetato de etilo 8:2. Para revelar las placas se utilizó cámara de rayos UV y soluciones de reactivo de dragendorff, vainillina - ácido sulfúrico, Fast blue y KOH, que al reaccionar con los extractos toman una coloración determinada según el metabolito secundario presente en el extracto.

Revelado en cámara UV: una vez sembradas las muestras en las placas estas son llevadas a la cámara UV para visualizar los compuestos que no pueden ser visualizados por el ojo humano, gracias a esto se forman muchas fluorescencias, los puntos azules que se pueden determinar como cumarinas, y los puntos amarillos como antraquinonas (Murillo 2004).

Revelado con reactivo de Dragendorff: El reactivo de Dragendorff se utiliza para determinar la presencia de alcaloides en las muestras, se asperja el reactivo sobre la placa a analizar, una prueba positiva se presenta si se colorean puntos naranja sobre la placa.

Revelado con vainillina-ácido sulfúrico: Se aplica una solución de vainillina ácido sulfúrico sobre la placa a revelar, luego se calienta la placa a 100 °C; la formación de puntos violeta sobre la placa da positivo para compuestos terpenicos (García 2004).

Revelado con Fast Blue: Se asperja una solución de este reactivo sobre la placa y luego se agrega carbonato de sodio para terminar la reacción, este es un revelador muy común para detectar la presencia de compuestos fenólicos y alilresorcinoles, una prueba es positiva si se forman puntos rojos sobre la placa (Suaza-García y Coy-Barrera. 2014)

Revelado con KOH y observación a 366 nm en cámara UV: Las cumarinas son compuestos derivados de la -benzopirona. Dado que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o azul-verdosa en la cámara UV que se aprovecha para su detección. Este tipo de compuestos pueden ser revelados usando una solución de KOH (García *et al.* 2009).

RESULTADOS

Cromatografía de capa delgada (CCD)

Después de sembradas las muestras y realizado el revelado de las mismas, se observan diferentes puntos en las placas, por lo cual se puede deducir que tipo de com-

puesto se encuentra en cada extracto, como se muestra en las figuras 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Estos resultados se resumen en la tabla 3, donde todas las especies mostraron resultados en al menos una de las pruebas colorimétricas de identificación de metabolitos secundarios. Las muestras de *Hymenaea oblongifolia*, *Clibadium silvestre* e *Hippomane mancinella* mostraron resultados en la aparición de tres tipos de metabolitos secundarios diferentes siendo las que mayor variedad de metabolitos mostraron.

Revelado con reactivo de Dragendorff: Al aplicar el reactivo se observa la aparición de coloraciones naranjas en las muestras de *Solanum nudum*, *Vismia macrophylla* y *Crotón cf. fragans*, (ver Figura 2)

Revelado con vainillina-ácido sulfúrico: se asperjó el reactivo sobre la placa de sílica donde estaban las muestras sembradas obteniendo resultados positivos en algunas de las especies como: *Vismia macrophylla*, *Clibadium silvestre*, *Bellucia pentamera* e *Hippomane mancinella*, (ver Figura 3).

Tabla 1: Número de registro de las especies usadas en el estudio de cromatografía en capa fina

Nº	Nombre científico	Nº Voucher	Determinó o confirmó
1	<i>Solanum nudum</i>	1573	W. D`Aray
2	<i>Hymenaea oblongifolia</i>	12399	Duberney Botero, Jesus A. Palacio
3	<i>Symphonia globulifera</i>	520024	Adolfo Jara
4	<i>Columnnea parviflora</i>	12960	L. clavijo
5	<i>Bellucia pentamera</i>	3225	N. Pino
6	<i>Vismia macrophylla</i>	520026	Adolfo Jara
7	<i>Crotón cf. fragans</i>	2097	H. Leon
8	<i>Clibadium silvestre</i>	138	H. Robinson
9	<i>Hippomane mancinella</i>	9933	James L. Zarucchi, P. Velasquez
10	<i>Sabicea colombiana</i>	519980	L.C. Jimenez y R. Galindo- T
11	<i>Syzygium malaccense</i>	520029	Adolfo Jara

Revelado en cámara UV: La cámara de rayos ultravioleta permite visualizar fluorescencias amarilla sin tratamiento químico en la especie *Vismia macrophylla* y los puntos azules como se observa en las especies: *Hymenaea oblongifolia*, *Bellucia pentamera*, *Crotón cf. fragans*, *Clibadium silvestre*, *Hippomane mancinella* (ver Figura 1).

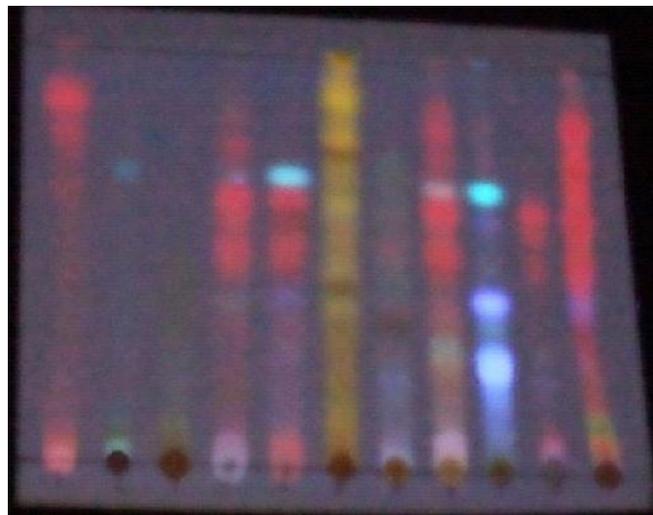


Figura 1: Revelado de muestras con rayos UV a 366 nm de longitud de onda para las muestras 1 a 11.

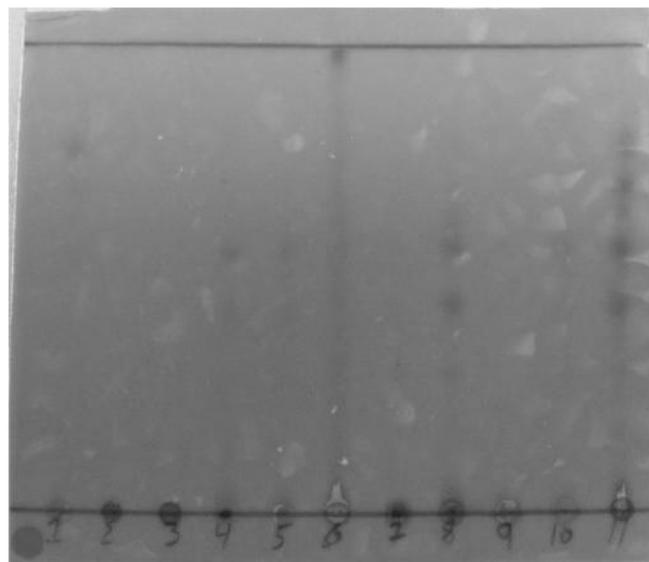


Figura 2: Revelado con reactivo de Dragendorff, para las muestras 1 a 11.

Revelado con Fast Blue: Las manchas muestran las coloraciones y la ubicación de los compuestos con intensidad roja donde se describe la presencia de compuestos fenólicos en las muestras: *Columnnea parviflora*, *Hymenaea oblongifolia*, *Vismia macrophylla*, *Sabicea*

colombiana, *Clibadium silvestre* (ver Figura 4).

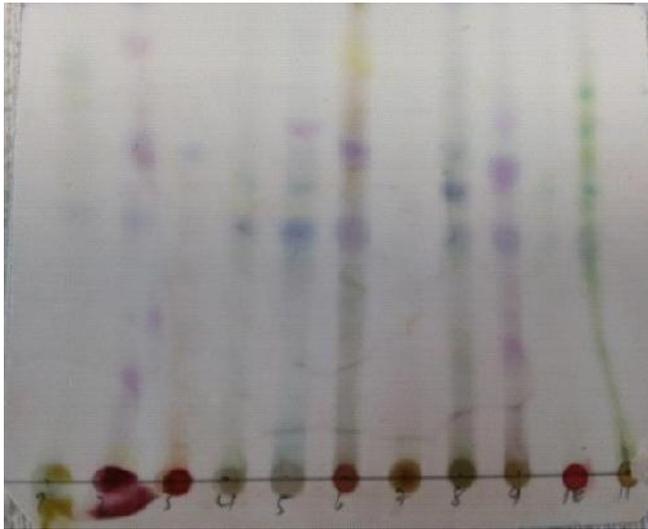


Figura 3: Revelado con vainillina ácido sulfúrico para las muestras 1 a 11.

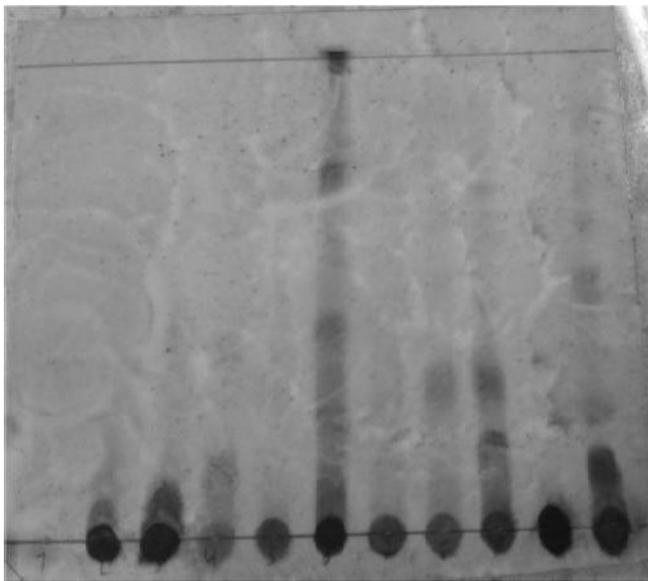
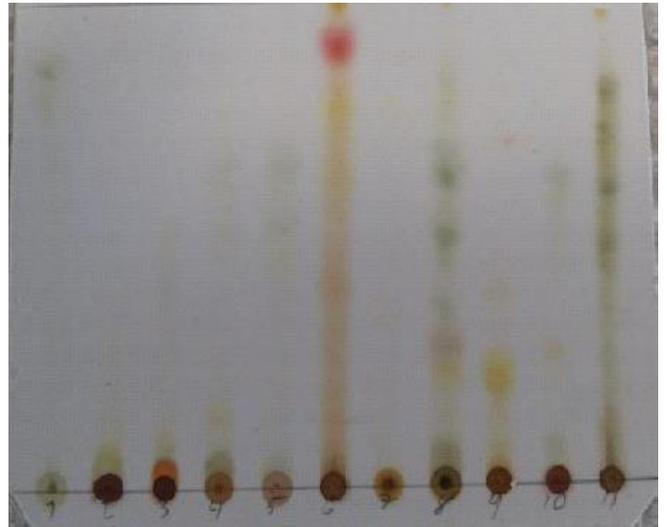
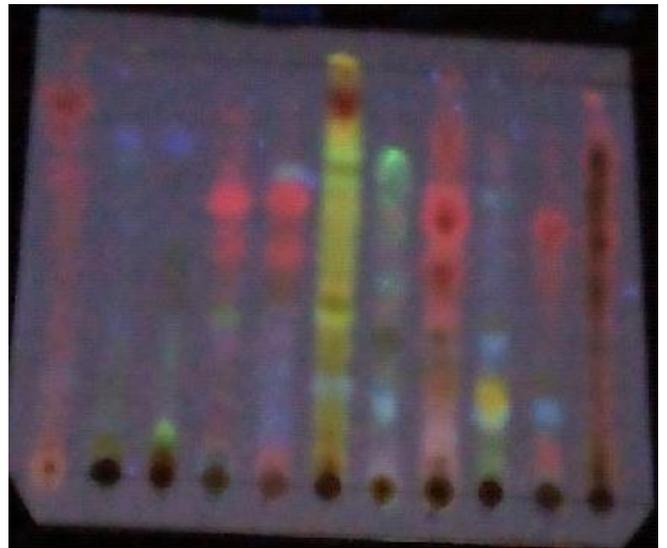


Figura 4: Revelado con Fast Blue, para las muestras 1 a 11.

Revelado con KOH y observación a 366 nm en cámara UV: Se realiza el rociado con spray de una solución de KOH al 5% sobre la placa cromatográfica y posteriormente se observa en cámara de UV a 366 nm, aparecen compuestos fluorescentes de color azul en las muestras *Hymenaea oblongifolia*, *Symphonia globulifera*, *Bellucia pentamera*, *Sabicea colombiana*, *Hippomane mancinella*, *Clibadium silvestre* y *Crotón cf. fragans*. (ver Figuras 5 y 6)



Figuras 5. Revelado con KOH a 366 nm para las muestras 1 a 11.



Figuras 6. Revelado con KOH + UV a 366nm para las muestras 1 a 11 (Para identificación de las muestras en las figuras uno al seis ver tabla dos).

DISCUSIÓN

A partir de las hojas y cortezas secas de los extractos etanólicos de once especies vegetales se encontraron metabolitos como cumarinas, fenoles, alcaloides y triterpenos. Se encuentra documentado en la literatura que especies pertenecientes a la familia Solanáceae producen alcaloides conocidos como chaconina, solanina, tomatina, atropina y escopolamina, lo que coincide con la aparición de alcaloides durante el revelado en la placa con el reactivo de Dragendorff de la especie *Solanum nudum*, perteneciente a esta familia, de otro lado las

especies *Crotón cf. fragans* y *Hippomane mancinella* pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, durante las pruebas muestran la aparición de cumarinas, terpenos, fenoles y alcaloides; según lo reportado en la literatura, esta familia reporta metabolitos secundarios como tri-terpenoides y la presencia de alcaloides para el género *crotón* según Bittner *et al* (2001), lo que está de acuerdo con estos resultados. Según Celis, *et al.* (2008), Muchas familias de plantas como las Myrtaceae, Asteraceae y Piperaceae son bien conocidas por tener principios como los terpenoides y grupos de amidas que tienen efecto repelente e insecticida que inhibe el desarrollo y el crecimiento de muchos insectos del orden Lepidóptera, esto es acorde con la presencia de compuestos terpénicos encontrados en la especie *Clibadium silvestre* perteneciente a la familia Asteraceae, además de la aparición de compuestos fenólicos y cumarinas.

Rojas *et al* (2011) en el estudio de gases masas del aceite esencial de *Vismia macrophylla* consiguió compuestos terpénicos lo cual está asociado a los aceites esenciales por ser compuestos volátiles, lo que hace que los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas realizadas a esta planta se ajusten a lo antes mencionado. De otro lado, la especie *Symphonia globulifera* mostró en las pruebas cualitativas compuestos fenólicos, que coinciden con los estudios realizados por Ngouelaa *et al* (2006) en los cuales encontró compuestos fenólicos diferentes con propiedades antioxidante, corroborando así la presencia de compuestos fenólicos de esta especie.

De acuerdo con Isaza (2007) la especie *Bellucia pentamera* perteneciente a la familia Melastomataceae contiene compuestos terpénicos como el escualeno, además de tener compuestos como cumarinas; de acuerdo con Pino (2009), estos resultados de las pruebas cromato-

Tabla 2. Especies utilizadas para determinar los metabolitos secundarios.

Nº	Nombre científico	Familia	Nombre vulgar	Parte usada
1	<i>Solanum nudum</i>	Solanaceae	Sauco amargo	Hojas
2	<i>Hymenaea oblongifolia</i>	Leguminosae	Algarrobo	Corteza
3	<i>Symphonia globulifera</i>	Clusiaceae	Chucho nuevo	Hojas
4	<i>Columnea parviflora</i>	Gesneriaceae	Golondrina	Hojas
5	<i>Bellucia pentamera</i>	Melastomataceae	Coronillo	Hojas
6	<i>Vismia macrophylla</i>	Clusiaceae	Manchara	Corteza
7	<i>Crotón cf. fragans</i>	Euphorbiaceae	Sangre de gallo	Hojas
8	<i>Clibadium silvestre</i>	Asteraceae	Mata pescado	Hojas
9	<i>Hippomane mancinella</i>	Euphorbiaceae	Manzanillo	Hojas
10	<i>Sabicea colombiana</i>	Rubiaceae	Vinito, hierba de vino	Hojas
11	<i>Syzygium malaccense</i>	Myrtaceae	Marañón	Hojas

Tabla 3. Metabolitos secundarios expresados por CCD en las plantas mediante el tratamiento con los diferentes reveladores.

Nº	Nombre científico	Metabolitos expresados mediante las pruebas
1	<i>Solanum nudum</i>	Alcaloides
2	<i>Hymenaea oblongifolia</i>	Cumarinas, terpenos, fenoles
3	<i>Symphonia globulifera</i>	Cumarinas y fenoles
4	<i>Columnea parviflora</i>	Terpenos y fenoles
5	<i>Bellucia pentamera</i>	Cumarinas y terpenos
6	<i>Vismia macrophylla</i>	Terpenos, alcaloides, fenoles y antraquinonas
7	<i>Crotón cf. fragans</i>	Alcaloide y cumarina
8	<i>Clibadium silvestre</i>	Cumarina, terpenos, fenoles
9	<i>Hippomane mancinella</i>	Cumarina, terpenos, fenoles
10	<i>Sabicea colombiana</i>	Cumarina y fenoles
11	<i>Syzygium malaccense</i>	Fenoles

gráficas realizadas, coinciden y corroboran estudios previos en pruebas cualitativas coloreadas en estas plantas. Savhita *et al* (2011) en sus trabajos científicos describe que la especie *Syzygium malaccense* es una planta con muchas características antioxidante por la presencia de compuestos fenólicos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio cualitativo en capa delgada confirma lo reportado en los estudios preliminares realizado a estas especies por autores como Pino (2009), Ngouelaa *et al* 2006, Rojas *et al* 2011, Celis, *et al.* 2008, y Bittner *et al* (2001), lo que sugiere hacer un seguimiento a cada uno de los extractos para futuros procesos de cuantificación de fenoles y flavonoides, perfilamiento cromatográfico y/o separación de compuestos por cromatografía en columna y por otros

procesos instrumentales y llegar a separar cada uno de los compuestos antes mencionados y seguir aportando a la ciencia.

Llevando desde el aula de clase estudios de este tipo, permite al docente estimular acciones ambientales de conservación y aprovechamiento de la diversidad biológica del entorno con miras a mayor valoración y aprovechamiento por parte de sus pobladores.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica del Chocó y la Bio-Red CO-Cenivam, por su apoyo financiero, a la Universidad Militar Nueva Granada, especialmente al Dr. Coy- Barrera Ericsson por su ayuda técnica recibida.

REFERENCIAS

- Bittner M., Alarcón J., Aqueveque P., Becerra J., Hernández V., Hoeneisen M., y Silva M. (2001). Estudio químico de especies de la familia euphorbiaceae en Chile. Bol. Soc. Chil. Quím. (46) 4.
- Cañigueral S., Dellacassa E., Bandoni A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. Lat. Am. J. Pharm. 22 (3), 265-278
- Celis A., Mendoza, C., Pachón M., Cardona J., Delgado W., y Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Agronomía Colombiana 26(1), 97-106.
- CODECHOCÓ-Corporación autónoma para el desarrollo sostenible del Chocó. (1997). Plan de Gestión urbano, Municipio de Quibdó y Lloró. Promotora editorial de autores chocoanos, Quibdó, Chocó. pp11-12.
- García D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forrajes, 27 (1), 1-12.
- García A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. [Revista en línea]. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3), 119-145. (Acceso 23 de febrero de 2015, en: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)
- García P. Caridad M., Nguyen K.B., Nguyen B.T., (2009). Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L., y *Morinda citrifolia* L. Rev Cubana Plant Med 14 (2), 1-7
- Isaza J. I. (2007). Perfiles Cromatográficos Preliminares Por GC-MS de Algunas especies de Plantas Melastomatáceas. Scientia et Technica 33(1), 0122-1701.
- Murillo E. (2004). Guía metodológica para la investigación de fitoquímica preliminar en plantas medicinales. Ibagué: Facultad de ciencias, Universidad del Tolima
- Ngouelaa S., Ndjakou B., Ngoupayoa J., Fekam ,F., Tsamoia E. (2006). Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. Science Direct 67(2), 302-306
- Pino N. (2009). Plantas útiles del departamento del Chocó parte 1: Extractos. Editorial Uryco, Medellín, Colombia 193-280 p.
- Rojas, J., Buitrago A., Rojas L., y Morales A. (2011). Essential oil composition of *Vismia macrophylla* leaves (Guttiferae). Natural Product Communications, 6 (1), 85-86.

- Savitha R., Padmavathy S. & Sundhararajan A. (2011) .Invitro Antioxidant Activities on Leaf Extracts of Syzygium Malaccense L. *Anc Sci Life* 30(4), 110–113.
- Suaza-García, Eleana R., y Ericsson D. Coy -Barrera. (2014). Alquilresorcinoles: Compuestos Naturales con importancia Biológica. *Rev. Facultad de ciencias básicas.* 10 (2), 210-222.