

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE *Clethra fimbriata*  
Kunth (CLETHRACEAE) A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE  
HOJAS Y TALLOS.**

**Wilson Leonardo Villarreal Romero**

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de Ciencias**

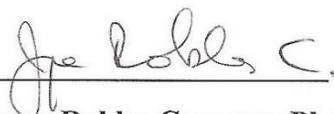
**Carrera de Biología**

**Bogotá**

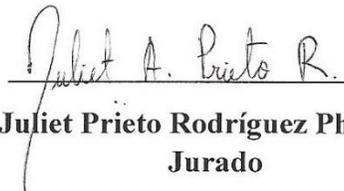
**2015**

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE *Clethra Fimbriata* Kunth  
(CLETHRACEAE) A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE  
HOJAS Y TALLOS.**

**Wilson Leonardo Villarreal Romero**



**Jorge Robles Camargo Ph.D**  
**Director**



**Juliet Prieto Rodríguez Ph.D**  
**Jurado**

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de Ciencias**

**Carrera de Biología**

**Bogotá**

**2015**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco especialmente a mi director de trabajo de grado el profesor Jorge Robles por guiar este trabajo y por su ayuda para llevarlo a cabo.

A mí jurado la profesora Juliet Prieto por su tiempo y su ayuda.

Al laboratorio de fitoquímica y sus profesores asociados por su ayuda.

Al profesor Néstor Julio García profesor asociado al herbario de la Pontificia Universidad Javeriana por su ayuda con la identificación taxonómica.

A Andrés Orejuela del Jardín Botánico José Celestino Mutis por facilitarme el material bibliográfico necesario y su colaboración con la identificación taxonómica.

Al departamento de biología y a mis compañeros con los que fraternicé.

Finalmente agradezco a mi hermana, mi tío y mis padres por su ayuda, apoyo y confianza.

A mi madre.

## Tabla de contenido

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	3
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	4
<b>5. MARCO TEÓRICO</b> .....	6
<b>5.1. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO</b> .....	7
<b>5.2. CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA</b> .....	10
<b>5.2.1</b> Orden Ericales .....	10
<b>5.2.2</b> Familia Clethraceae .....	10
<b>5.2.3</b> Genero <i>Clethra</i> .....	11
<b>5.2.4</b> <i>Clethra fimbriata</i> Kunth .....	11
<b>5.2.5</b> Clasificación taxonómica de <i>Clethra fimbriata</i> .....	12
<b>5.2.6</b> Descripción taxonómica de <i>Clethra fimbriata</i> .....	12
<b>5.3. DISTRIBUCIÓN</b> .....	13
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	14
<b>6.1. Objetivos Específicos</b> .....	14
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	14
<b>7.1. Colecta del material</b> .....	14
<b>7.2. Procesamiento del material</b> .....	15
<b>7.3. Obtención de extractos</b> .....	15
<b>7.4 Fraccionamiento de los extractos</b> .....	16
<b>7.5 Análisis fitoquímico preliminar</b> .....	17
<b>8. RESULTADOS</b> .....	20
<b>8.1. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR</b> .....	20
<b>8.1.1 Flavonoides</b> .....	22
<b>8.1.2 Alcaloides</b> .....	23
<b>8.1.3 Cumarinas</b> .....	25
<b>8.1.4 Saponinas</b> .....	26
<b>8.1.5 Taninos y fenoles</b> .....	27

8.1.6 Triterpenos y esteroides.....	29
8.1.7 Heterósidos cardiotónicos.....	30
8.1.8 Lactonas .....	32
8.1.9 Quinonas.....	33
8.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO .....	35
9. DISCUSIÓN .....	38
10. CONCLUSIONES .....	44
11. RECOMENDACIONES .....	45
12. BIBLIOGRAFÍA .....	45
13. ANEXOS.....	48

## **ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE *Clethra fimbriata* Kunth (CLETHRACEE) A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS Y TALLOS.**

### **1. RESUMEN**

Con el fin de aumentar y contribuir en el conocimiento de la flora colombiana, específicamente del bosque Alto Andino, páramo y subpáramo en cuanto a la composición química, se eligió a la especie *Clethra fimbriata* género *Clethra*, con el objetivo de determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios. Esta especie ha sido reportada como medicinal debido a su capacidad como febrífugo, pero no se le han realizado ningún tipo de estudios fitoquímicos. En este estudio se realizó un análisis fitoquímico preliminar del material vegetal previamente colectado a partir de extractos etanólicos de dos de sus órganos: hojas y tallos, los cuales se fraccionaron con un solvente de polaridad media; diclorometano y posteriormente se les realizaron pruebas cualitativas de tubo para identificar los principales metabolitos secundarios, a saber: flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, lactonas, heterósidos cardiotónicos, taninos y fenoles. Se realizó un estudio cromatográfico posterior utilizando la técnica de cromatografía en capa delgada, esto con el fin de corroborar los resultados obtenidos en las pruebas de tubo. Esta caracterización fitoquímica preliminar se presenta como base para posteriores estudios; estudios más amplios y específicos que permitan una utilización racional de recursos que sirvan como fuente de desarrollo regional y nacional, contribuyendo al conocimiento químico de este género presente en los ecosistemas de alta montaña, así como al conocimiento de la biodiversidad en general. Los grupos de metabolitos secundarios encontrados en esta especie coincidieron con los reportados para *Clethra arborea*; flavonoides, saponinas, triterpenos y esteroides, además de otros compuestos como alcaloides y quinonas.

### **2. INTRODUCCIÓN**

Las plantas han sido útiles para el hombre desde hace siglos principalmente con propósitos medicinales y aún hoy, y a pesar de los avances de la industria y la medicina moderna, se siguen utilizando de forma tradicional y de forma sistemática. De esta manera las plantas se utilizan en

diferentes formas que van desde decocciones e infusiones en zonas rurales y países en vía de desarrollo hasta productos fitoterapéuticos, principios activos y medicamentos en países desarrollados. Esto ha llevado a una expansión en el área fitoquímica y por lo tanto a la utilización de extractos, producción y aislamiento de sustancias puras naturales, extraídos de plantas medicinales cuyo mercado aumentó en un 2000%, desde 1980 en Europa, Norte América y Asia, en parte debido a la creciente demanda y preferencia de productos de origen natural (**Sharapin 2002; Calixto 2000**).

Existen plantas medicinales en todo el mundo pero son más abundantes en las zonas tropicales (**Calixto 2000**). Colombia es uno de los países con mayor riqueza y biodiversidad, y la mayor cantidad de registros de riqueza vegetal se encuentra en la región andina o cordillerana, teniendo al páramo como área geográfica representativa de la biodiversidad colombiana y fuente de materias primas importantes en agricultura, salud y biotecnología, cuyo aprovechamiento favorece el desarrollo socioeconómico del país (**Rangel 2001**).

Pese a las caracterizaciones, registros y estudios de plantas útiles presentes en Colombia, principalmente por el instituto Von Humboldt, todavía existe una gran cantidad de plantas de importancia económica y científica que no han sido estudiadas. ” Entre 1.656 plantas medicinales reportadas, solo 206 especies (12,5%) presentan más de tres referencias documentadas en las que se evidencia su uso terapéutico tradicional, mientras que 1.452 (87,5%) especies no presentan este número de registros” (**Bernal et al., 2011**). La especie *Clethra fimbriata* ha sido reportada y enunciada como medicinal por algunas comunidades, principalmente en Boyacá, debido a su capacidad como febrífugo, su corteza se hace polvo y se disuelve para su ingestión, pero se desconoce su composición química y sus principios activos con actividad biológica específica. No existe información de su perfil químico y muy poca acerca de su biología. *Clethra fimbriata* pertenece a la familia Clethraceae, orden Ericales, es originaria de Sudamérica y se encuentra en los boques de alta montaña; bosque alto andino, bosque de niebla, páramo y subpáramo entre los 2500 y 3600 msnm, es una especie cuya forma de vida es arbustiva o de árbol pequeño, sus hojas son levemente coriáceas, aserradas con pubescencias en el envés y de color verde-amarillo, sus flores en racimos son blancas pubescentes y están ubicadas en el ápice de las ramas y sus frutos son capsulares (**Flores et al., 2010**).

Para conocer la composición química y los constituyentes biológicamente activos se realizan estudios fitoquímicos preliminares como primer acercamiento y posteriormente estudios de actividad biológica con el fin de conocer los compuestos presentes en una planta (u organismo) determinada, y de esta forma reconocer los principales grupos de metabolitos secundarios que poseen o pueden poseer propiedades medicinales o de importancia industrial. La investigación fitoquímica consiste en una investigación cualitativa preliminar y una posterior estructural, para este estudio se desarrollaron únicamente pruebas fitoquímicas preliminares cualitativas a partir de extractos etanólicos de hojas y tallos de la especie *Clethra fimbriata* teniendo en cuenta que de los tallos viene su capacidad como febrífugo (Amin 2011; Plazas 2012; Carvajal *et al.*, 2009). El objetivo de este estudio consistió en determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios; flavonoides, alcaloides, cumarinas, quinonas, lactonas, saponosidos, heterósidos cardiotónicos, esteroides, triterpenos, taninos y fenoles, a partir de extractos de hojas y tallos de *Clethra fimbriata* utilizando pruebas de tubo y posteriormente el método de cromatografía en capa delgada, aportando al vacío en el conocimiento que hay en cuanto a esta especie y este género.

Este estudio se centra en la composición química (caracterización de los principales grupos de metabolitos secundarios) de forma cualitativa; presencia/ausencia y no cuantitativa ni funcional (actividad).

### 3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Países en desarrollo como Colombia han sido proveedores de materias primas durante décadas permitiendo a los países industrializados el aprovechamiento de compuestos extraídos de la naturaleza, principalmente de las plantas. En Sudamérica, Asia y África hay cierto desinterés para desarrollar programas de estudio de las riquezas autóctonas que permitan ofrecer soluciones a ciertas necesidades o problemas relacionados con la salud y el desarrollo industrial. Sin embargo a medida que se van adquiriendo nuevas tecnologías países como Colombia se concientizan de su propia riqueza y sus beneficios (Bilbao 1997; Bernal *et al.*, 2011). Las plantas a partir de su metabolismo secundario generan compuestos que aunque no son estrictamente vitales tienen una función importante para su supervivencia. Estos compuestos son metabolitos secundarios que poseen características propias relacionadas con la bioquímica de la planta y el factor ambiental.

Los principales usos de estos metabolitos secundarios son: medicinales (en el caso de principios activos), plaguicidas, cosméticos, edulcorantes y colorantes, entre otros. En la actualidad la mayoría de medicamentos provienen de fuentes naturales en su mayoría plantas y microorganismos, aunque solo cerca del 5-10% de las plantas superiores han sido estudiadas en investigaciones fitoquímicas lo que representa una muy pequeña fracción de la biodiversidad **(Sarker 2006; Toscano 2006)**.

Existe información sobre la utilización de especies vegetales en muchos países y se encuentra recopilada y registrada formalmente en documentos como; farmacopeas o vademecum de plantas medicinales, también en congresos, monografías, artículos y estrategias de políticas nacionales donde algunas de las especies que han sido reportadas como medicinales, de uso industrial, ornamental o maderero, aún no se les han realizado estudios que permitan conocer su biología y su composición química. Tal es el caso de la especie *Clethra fimbriata* la cual ha sido reportada como planta medicinal en el marco del proyecto páramo andino de fundetrópico en el páramo el Rabanal. Y a la cual no se le ha realizado ningún tipo de estudio químico, terapéutico o farmacéutico. Esta especie constituye un patrimonio fitoquímico (en cuanto a su uso cultural, y se espera que también científico) importante a pesar de desconocer su composición química, teniendo en cuenta que existen pocos estudios químicos de la flora alto andina y de páramo **(Plazas 2012)**.

En general el género *Clethra* no ha sido muy estudiado, la mayoría de las especies de este género no han sido investigadas a la fecha, en cuanto a biología, ecología o química, solo se han reportado estudios fitoquímicos para algunas pocas especies, tales como *Clethra arbórea* y *Clethra barbanervis*, en estos estudios se ha evidenciado a partir del extracto metanólico de sus hojas, la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenos y saponinas **(Llorent et al., 2015)**. Estos estudios señalan la falta de conocimiento científico del género *Clethra* así como de datos bibliográficos que permitan conocer cuáles son los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en este género y esta especie.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Colombia ha sido catalogada como uno de los países más diversos en flora silvestre en el mundo y posee la extensión más grande de páramos, los cuales albergan cerca de 118 familias con 566

géneros y 3379 especies, aproximadamente el 12% del total de especies vegetales de todo el país. Muchas de estas especies pueden ser la base para la elaboración de medicinas, fibras y alimentos **(Plazas 2012)**. En el caso de las plantas medicinales exclusivas para Colombia, sin mencionar plantas con potencial industrial y otros, solo 5 especies (lo que corresponde al 2%) tienen 3 referencias documentadas de uso terapéutico, mientras que 208 de estas especies (98%) no. Esto demuestra el poco valor que se le ha otorgado a las investigaciones sobre el patrimonio natural nacional, probablemente debido al insuficiente desarrollo investigativo, que además debe incentivar investigaciones etnobotánicas y culturales generando una mayor apreciación de la flora (y la biodiversidad en general) nativa de Colombia y por lo tanto logrando que estas especies puedan persistir en los diversos ecosistemas nacionales y sean aprovechadas de forma sostenible **(Bernal et al., 2011)**.

El conocimiento y para este caso específicamente el conocimiento de la composición química (en cuanto a los principales grupos de metabolitos secundarios) y el registro de plantas es importante en la medida en que ofrece una base científica y teórica, que puede orientar investigaciones posteriores las cuales pueden determinar compuestos con posible actividad biológica (principios activos) o de interés industrial, ofreciendo ingredientes o sustancias alternativas y adicionales, para suplir necesidades importantes no solo en la industria a nivel económico, sino además en comunidades y etnias de todo el mundo que utilizan estas plantas de acuerdo a su conocimiento cultural, para este caso el uso de la especie *C. fimbriata* **(Sukumaran 2012)**.

Por esto es pertinente el estudio fitoquímico preliminar de las plantas de interés medicinal e industrial, principalmente las reportadas como medicinales en Colombia, (y específicamente para este estudio el de *Clethra fimbriata*) esta evaluación debe ser un análisis continuo y permanente, con el fin de que sus resultados aumenten el conocimiento científico y sean una herramienta para la toma de decisiones respecto a la investigación científica, la tecnología, la conservación y el uso sostenible de los recursos, que contribuyan a la seguridad social en salud y por lo tanto al desarrollo del país **(Bernal et al., 2011)**. Y teniendo en cuenta que existen pocos estudios químicos de la flora alto andina y de páramo en el país **(Plazas 2012)** en el presente estudio se realizó un análisis fitoquímico preliminar que permitió evidenciar la presencia de algunos de los principales grupos de metabolitos secundarios en *C. fimbriata*, estableciendo una base teórica que podría guiar

estudios específicos posteriores. Además de aumentar y aportar al conocimiento en cuanto a la composición química de especies andinas de nuestro país.

Los resultados de este estudio podrían soportar investigaciones donde se aislen componentes específicos y se estudie la actividad biológica específica de los compuestos obtenidos, en caso de que esta especie los presente.

## 5. MARCO TEORICO

En la actualidad se han reportado y estudiado diversas especies, géneros y familias botánicas a nivel etnobotánico, biológico y químico, muchas de estas especies son endémicas y foráneas naturalizadas, entre las familias más representativas y estudiadas en Colombia están: Asteraceae, Piperaceae, Fabaceae, Malvaceae, Rubiaceae, Poaceae y Euphorbiaceae, una familia presente en los bosques alto andinos, páramos y subpáramos es la familia Clethraceae (género *Clethra*) con pocas especies reportadas en Colombia, entre ellas *Clethra fagifolia*, *Clethra arbórea* y *Clethra fimbriata*, de las cuales se encuentra poca bibliografía especialmente respecto a estudios fitoquímicos que para *Clethra fimbriata* son nulos y solo existe información en la literatura de su biología y distribución. Especies del género como *Clethra barbinervis* y *Clethra arborea* han sido estudiadas químicamente en otros países (**Rivera & Córdoba. 1998; Flores et al., 2010; Bernal et al., 2011**).

Los constituyentes que se busca identificar se agrupan según como se generen biosintéticamente, de esta forma se tienen; terpenos, esteroides, flavonoides, cromenos, benzofuranos, cumarinas, quinonas, lignanos, saponinas, taninos, lactonas y alcaloides, que se encuentran en los diferentes órganos de las plantas y que tienen propiedades antioxidantes, antifúngicas, antibacteriales, antileucémicas, citotóxicas, antipiréticas, coagulantes y muchos otros beneficios a nivel farmacológico e industrial. Para el caso de *Clethra fimbriata* su capacidad como febrífugo proviene del tallo (específicamente de su corteza) (**García et al., 2012; Amin & Emilio 2011; Flores et al., 2010**). Estudios fitoquímicos en especies relacionadas como *Clethra arbórea* (**Anexo 1**) y *Clethra barbinervis* han mostrado que estas especies poseen **ácidos fenólicos** como el ácido tartárico, ácido cafeico y oleuropeína, y **flavonoides** como kaempferol, catequina, quercetina (flavonoles) y rutina. Y **triterpenos** y **saponinas** en el caso de *Clethra barbinervis* (**Llorent et al., 2015**).

## 5.1. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Los Ericales muestran una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos poco comunes y/o restringidos (específicos) para cada familia. Las principales clases de metabolitos secundarios en los Ericales son en orden decreciente: flavonoides, triterpenos, saponinas, quinonas, ácidos fenólicos, lignanos, alcaloides, cumarinas, taninos y esteroides (**do Nascimento *et al.*, 2015**).

**Flavonoides:** los flavonoides son compuestos fenólicos. Se distribuyen principalmente en las hojas, semillas y frutos. Los flavonoides son pigmentos y copigmentos responsables de la coloración de las flores y frutos, además protegen la planta de la oxidación ultravioleta al ubicarse en la cutícula foliar, en las células epidérmicas de las hojas y en el mesófilo (en las vacuolas de este). Generalmente son hidrosolubles.

Gran parte de los flavonoides tienen una estructura básica, el 2-fenilcromano, los flavonoides se pueden agrupar en varias clases según el grado de oxidación del anillo piránico central, que puede estar abierto. Los flavonoides lipófilos presentes en los tejidos superficiales de las hojas se pueden extraer con solventes de polaridad media como el diclorometano. La caracterización de flavonoides se realiza generalmente en cromatografía en papel, con vapores de amoníaco estos dan colores amarillo, naranja y rojo (**Claus 1968**).

**Taninos:** los taninos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, generalmente se localizan en las hojas, frutos (inmaduros) y tallos. Se ha sugerido que los taninos protegen a la planta debido a su acción antiséptica, también que son productos de desecho de las plantas debido a la alta concentración que poseen las hojas de especies caducifolias (hojas destinadas a caer).

Los taninos son compuestos químicos formados por polifenoles, algunos pueden ser de naturaleza glicosídica no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales. Generan soluciones color azul oscuro o negro grisáceo con sales férricas, color rojo con ferricianuro de potasio y amoníaco. Y se precipitan al mezclarse con sales de cobre, plomo, estaño y con soluciones acuosas concentradas de bicarbonato de potasio (**Claus 1968**).

**Alcaloides:** son compuestos orgánicos nitrogenados, generalmente contienen un átomo de nitrógeno procedente de un grupo amino, aunque algunos pueden poseer más de cuatro nitrógenos. Generalmente los alcaloides son solubles en éter, cloroformo y otros solventes relativamente no polares, estos son insolubles o muy poco solubles en agua, pero en presencia de ácidos forman

sales solubles. También forman sales con compuestos de mercurio, oro, platino y otros metales pesados obteniéndose precipitados. Los reactivos o reveladores más comunes de alcaloides son: reactivo de Wagner (yodo en yoduro de potasio), reactivo de Mayer (yoduro mercuríco potásico) y reactivo Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)

Son de distribución más restringida, entre las angiospermas algunas familias presentan especies que sintetizan alcaloides; Leguminosas, Liliáceas, Papaveráceas, Rubiáceas, Solanáceas y Berberidáceas, otras como las Labiadas y las Rosáceas no los presentan. Las Gimnospermas rara vez los presentan (solo Taxáceas). Los alcaloides se localizan en las semillas, hojas, frutos, tallos, raíces y cortezas. También se pueden encontrar en hongos como: *Amanita citrina* (**Claus 1968**).

**Saponinas:** Las saponinas o saponósidos son heterósidos naturales frecuentes, se caracterizan por sus propiedades tenso-activas; forman disoluciones espumosas en agua. La saponaria "*Saponaria officinalis*" ha sido ampliamente utilizada como detergente por lo tanto las saponinas han sido utilizadas en la explotación industrial y cosmética. La mayor parte de los saponósidos son hemolíticos y son tóxicos para animales de sangre fría, especialmente los peces.

Las saponinas se diferencian en dos grupos según su genina (aglicona o aglucona) la cual se une a diferentes azúcares simples. Estos heterósidos pueden contener hasta 11 osas (generalmente entre 4 y 5) formando una cadena (monodesmósidos) o dos cadenas (bidesmósidos) (**Bruneton 2001**).

**Fenoles:** los ácidos fenólicos, derivados hidroxilados del ácido benzoico son muy frecuentes ya sean libres o unidos a un heterósido o a ésteres. Algunos como el ácido gálico son constituyentes de taninos hidrolizables. Estos ácidos esterifican los hidroxilos de varios metabolitos secundarios como los flavonoides, saponósidos y algunos alcaloides. Los fenoles simples son restringidos en la naturaleza.

Los fenoles son solubles en disolventes orgánicos polares en medio ligeramente ácido, su extracción se lleva a cabo generalmente sobre el material fresco con una disolución hidroalcohólica, y dada la inestabilidad de estos compuestos se debe evitar trabajar con pH excesivo y concentrar las disoluciones a menos de 30°C (**Bruneton 2001**).

**Cumarinas:** las cumarinas son 2H-benzopirán-2-onas que se pueden considerar como lactonas de los ácidos 2-hidroxi-Z-cinámicos. Las cumarinas se encuentran distribuidas en todas las familias

botánicas. Las cumarinas provienen de un precursor denominado umbeliferona (7-hidroxicumarina).

Las cumarinas provienen del metabolismo de la fenilalanina y quedan constituidas una vez se ha hidroxilado la umbeliferona. Las cumarinas libres son solubles en alcoholes y solventes orgánicos, para su purificación se pueden utilizar las propiedades específicas de las lactonas; solubilización en medio alcalino (por ejemplo KOH), se pueden revelar cumarinas mediante cromatografía en capa fina examinada por luz ultravioleta que en presencia de amoníaco genera colores que varían del azul y el amarillo al violeta (**Bruneton 2001**).

**Quinonas:** las quinonas son compuestos oxigenados, son el producto de la oxidación de derivados aromáticos, las quinonas pueden estar conjugadas con un núcleo bencénico (benzoquinonas) o con un sistema aromático policíclico (naftoquinonas, antraquinonas), también pueden asociarse con otros metabolitos secundarios formando flavonoides-quinonas y quinonas con esqueleto terpénico. Se han descrito más de 1200 quinonas distribuidas ampliamente en el reino vegetal (también en hongos, líquenes y algunos artrópodos).

Los precursores de las quinonas son principalmente fenilalanina, mevalonato y acetato y su síntesis ocurre por vía: acetato/malato, ácido mevalónico y vía ácido 4-hidroxibenzoico. Las quinonas libres son prácticamente insolubles en agua (aunque las naftoquinonas y las benzoquinonas son arrastrables por vapor de agua) pero se pueden extraer con solventes orgánicos. La principal reacción para su determinación es la de Borntrager-Krauss (medio alcalino acuoso) la cual genera coloraciones de rojo-naranja a violeta-purpura (**Bruneton 2001**).

**Triterpenos y esteroides:** Los triterpenos se basan en más de 40 esqueletos diferentes, generalmente de 30 carbonos ( $\leq 27$  para esteroides) formando varios ciclos (esqueletos tetra y pentacíclicos) y generalmente hidroxilados. Se ha mencionado que no existen diferencias fundamentales entre triterpenos y esteroides, los esteroides son considerados como triterpenos tetracíclicos que han perdido tres o más grupos metilo, aunque su diferenciación es compleja y generalmente se tiene en cuenta la biosíntesis de cada compuesto. El paso de un esqueleto de 30 C a un esteroide ( $\leq 27$  C) implica al menos una desmetilación en C-14 y C-4, además estos compuestos pueden presentar modificaciones secundarias como hidroxilaciones secundarias, insaturaciones y lactonizaciones (saponósidos) (**Bruneton 2001**).

**Lactonas:** Las lactonas forman ciclos de carbono que se nombran según su número, de esta forma se tienen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  lactonas. Estas se pueden asociar con terpenos formando sequiterpelactonas; poseen un esqueleto fundamental de 15 carbonos derivados de tres unidades de isopreno, son compuestos insolubles en agua, se disuelven en metanol, etanol y cloroformo. Se han encontrado principalmente en las partes aéreas de las plantas, especialmente en las asteráceas. A este grupo de metabolitos se los ha caracterizado por su actividad citotóxica, pudiendo ser antibacterianas, antifúngicas y antihelmínticas (**Domínguez 1985**).

**Heterósidos cardiotónicos:** constituyen un grupo bien diferenciado de metabolitos utilizados en tratamientos de insuficiencia cardíaca. Solo están presentes en algunas familias botánicas y se distribuyen en todos los órganos. Estructuralmente constan de una genina (aglicona) esteroídica y una parte osídica, comúnmente oligosídica. Generalmente son solubles en agua, etanol y menos soluble en cloroformo (**Bruneton 2001**).

## 5.2. CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

El género *Clethra* pertenece a la familia Clethraceae, la cual pertenece al orden Ericales, aunque han habido cambios y actualizaciones en la nomenclatura, el género *Clethra* se mantiene en su posición inicial según la taxonomía APG (2009) y apoyada por estudios moleculares usando secuencias de ADN de dos plásmidos mitocondriales que soportan las relaciones filogenéticas dentro del orden (**do Nascimento et al., 2015**).

### 5.2.1. Orden Ericales

En Cundinamarca, de este orden se pueden encontrar las familias: Clethraceae, Pyrrolaceae y Ericaceae. Este orden presenta hojas simples sin estipulas, flores bisexuales, pentacíclicas (cinco verticilos), perianto heterómero (cáliz y corola), corola gamopétala (pétalos unidos) estambres obdiplostémonos (dos verticilos de estambres), libres. Gineceo isocarpelar, con ovario súpero en los géneros primitivos y rudimentos seminales unitegumentados (**Camargo 1979**).

### 5.2.2. Familia Clethraceae

Esta es una familia nativa de Asia y América. Arbustos y árboles pequeños con pelos estrellados, hojas alternas, pubescentes o tomentosas, aserradas, con nervaduras prominentes en el envés, flores bisexuales, pentámeras, actinomorfas (simétricas), inflorescencias generalmente terminales en racimos o en panículas sin bractéolas, cáliz 5 bífido, pétalos (5) blanco marfil o crema, libres

imbricados. Estambres (10) repartidos en dos verticilos pueden ser glabros o pubescentes, libres, filamentos filiformes, anteras con dos tecas con dehiscencia por poros apicales; polen con granos sueltos. Un único pistilo con un ovario 3 carpelar, 3 lócular, súpero, pubescente, con placentación axial, rudimentos seminales (óvulos) numerosos, estilo (1), estigma 3-lobado. Fruto en capsula. Semillas comprimidas a veces aladas. Endosperma presente (**Camargo 1979; Vargas 2002**).

### 5.2.3. Genero *Clethra*

Sinónimos: Cuellaria R & P., 1798; Crossophrys Klotzsch, 1851.

Este género comprende a la fecha 80 especies distribuidas desde el sureste de Estados Unidos hasta el neotrópico, presente entre los 1800 y > 3000 msnm. Arbustos de hojas alternas, simples, a veces coriáceas, de margen dentada (aserrada), envés con pelos simples, inflorescencias terminales en racimo, pétalos libres o a veces connados (más o menos unidos) en la base. Estambres de 9 – 11, ovario súpero, tricarpelar, con tres lóculos. Fruto capsular, loculicida (se abre por el medio de los carpelos), cáliz persistente (**Camargo. 1979; Vargas. 2002**).

### 5.2.4. *Clethra fimbriata* Kunth

Se le conoce con el nombre común de manzano, falso manzano, azafrán y en algunos lugares como encenillo. Es una especie originaria de Norte de Suramérica, poco frecuente, se puede encontrar en bosques secundarios y bordes de caminos. Su tronco puede llegar a medir hasta 40 cm de diámetro, su corteza se desprende como escamas, es de copa grande que cuando es joven presenta un color grisáceo y al madurar su color se vuelve parecido al óxido (ferrugíneo). *Clethra fimbriata* es una especie de crecimiento rápido, crece en suelos rocosos poco profundos. Generalmente es atacada por insectos especialmente en los tejidos de crecimiento secundario (ramas). Su floración es de mayo a septiembre, fructificación de octubre a diciembre. Es una especie perennifolia. Su corteza se ha reportado como febrífugo, sus semillas sirven como alimento para algunas aves, su madera se utiliza en carpintería y ebanistería y en algunos lugares como el páramo El Rabanal es empleada como cerca viva y es plantada para la protección de cuencas hidrográficas (**Flores et al., 2010**).



**Figura 1.** *Clethra fimbriata*. Hojas

Autor foto: Villarreal, L



**Figura 2.** *Clethra fimbriata*.

Autor foto: Villarreal, L

### 5.2.5. Clasificación taxonómica de *Clethra fimbriata*

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: CLETHRACEAE (Klotzsch. 1851)

Género: *Clethra* (Klotzsch. 1851)

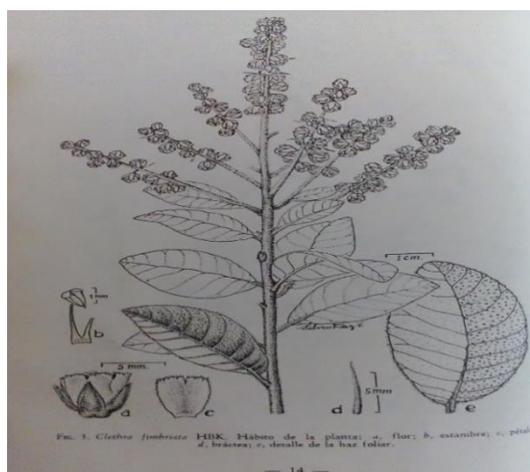
Especie: *Clethra fimbriata* Kunth [( H.B.K) – Humboldt, Bonpland, Kunth. 1818]

**Tomado de:** <http://www.biodiversidad.co/fichas/1763>. SIB PORTAL DE DATOS

### 5.2.6. Descripción taxonómica de *Clethra fimbriata*

Es un arbusto, árbol o arbolito que puede llegar a medir hasta 8 metros, ramas con pelos estrellados y ferrugíneos. Hojas simples alternas (**Fig 1 y 2**), obovadas (elíptico-oblongas), de textura cartácea, margen crenada (o semi -aserrada), de color verde olivo brillante, ferrugíneas (ocráceas) en el envés

(Fig. 4), pubescentes (pelos estrellados), con nervaduras prominentes, de 3 – 7 cm de largo y 1-5 cm de ancho. Inflorescencias en racimos, 10 cm de largo, terminales con indumento ferrugíneo. Flores de color blanco o crema, 8 mm de diámetro, tomentosas, pétalos con margen fimbriado, con brácteas generalmente más largas que la flor. Fruto capsular que se abre en tres partes,  $\pm$  5 mm, globoso, con estilo persistente (manteniéndose como un apéndice del fruto) e indumento ferrugíneo. Las semillas miden aproximadamente 3 mm de ancho por 2 mm de largo, elípticas de color marrón claro (Camargo. 1979; García *et al.*, 2006).



**Figura. 3** *Clethra fimbriata*. Ilustración.

Tomado de: Camargo. 1979



**Figura. 4** *Clethra fimbriata*

Autor foto: Villarreal, L

### 5.3.DISTRIBUCIÓN

Especie de piso térmico frío que se encuentra en las cordilleras Central y Oriental, en páramos, subpáramos, bosques alto andinos y bosques de niebla, también se ha reportado en la Sierra Nevada de Santa Marta. Entre los 2500 y 3600 msnm.

En Bogotá se encuentra entre los matorrales de los cerros orientales; Monserrate, sierra de siete picos, en la quebrada El Chicó, en El Retiro vertiente oriental, valle del río San Cristóbal, alto La Horqueta, cerro Guadalupe, cerros vecinos de Suba entre la Calera y Bogotá, páramo la Calera, sabana de Bogotá, páramo de Chipaque, Zipaquirá, El Mortiño (entre Zipaquirá y Pacho), en la

localidad de Usme, la quebrada La Vieja, páramo El Rabanal y el páramo de Gutiérrez (Camargo, 1979; García *et al.*, 2006).

## 6. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento químico de *Clethra fimbriata* (Clethraceae) mediante un estudio fitoquímico preliminar.

### 6.1. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios mediante pruebas cualitativas en tubo de ensayo a partir de extractos etanólicos de hojas y tallos
2. Corroborar la presencia de los metabolitos secundarios mediante análisis cromatográfico empleando reveladores específicos.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Colecta del material

Las muestras vegetales de *Clethra fimbriata* se colectaron en el cerro Manjui (**Fig. 5**), municipio de Cota, departamento Cundinamarca, coordenadas 4°48'40"N 74°07'15"O a una altitud de 2850 msnm. Se colectaron varios ejemplares, solamente tomando tallos y hojas, no se encontraron plantas en periodo floración o fructificación, por lo tanto no se colectaron estos órganos. Se tuvo en cuenta que en la literatura reportada la parte utilizada como medicinal (febrífugo) es la corteza del tallo (**Flores *et al.*, 2010**). En el momento de la colecta, siguiendo el debido procedimiento (**Sanabria 1997; Plazas 2012; Calderón 1963**) parte de los ejemplares se guardaron en bolsas ziploc y dos muestras se prensaron en papel periódico (**Fig 6 y 7**) con el fin de utilizar estos ejemplares en la determinación taxonómica la cual se llevó acabo con ayuda de material bibliográfico del jardín botánico, en el herbario de la Pontificia Universidad Javeriana, en donde se registró debidamente en la colección con el numero HPUJ:028040



**Figura 5.** Cerro Manjui

Autor foto: Villarreal, L



**Figura 6.** Material prensado

Autor foto: Villarreal, L



**Figura 7.** Material prensado

Autor foto: Villarreal, L

## 7.2. Procesamiento del material

Las muestras colectadas, tallos y hojas se secaron a condiciones normales; presión y temperatura ambiente durante 8 días. Posteriormente se maceró el material seco por separado, las hojas se trituraron en una picadora y luego se maceraron con un mortero. Los tallos se disminuyeron con tijeras de poda, hasta que se obtuvieron pequeñas partículas (Sanabria 1997; Carvajal, 2009; Plazas 2012).

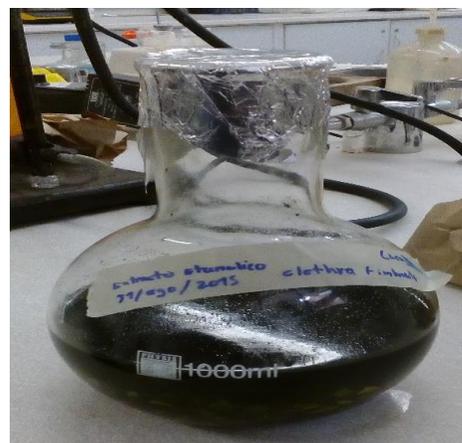
## 7.3. Obtención de extractos

Las dos fracciones de material seco y molido de hojas y tallos se pesaron y se sometieron separadamente a extracción por maceración en frío con etanol al 95% en un balón de fondo plano 1000 mL (Fig. 9) para las hojas y en un beaker 500mL (Fig. 8) para los tallos, a temperatura ambiente durante 8 días agitando frecuentemente. Se agregó solvente suficiente hasta cubrir las muestras.



**Figura 8.** Extracto etanólico tallos

Autor foto: Villarreal, L



**Figura 9.** Extracto etanólico Hojas

Autor foto: Villarreal, L

Posteriormente se filtraron y se concentraron los extractos (**Fig. 10**) a presión reducida (rota vapor) durante una hora, a una temperatura de 65°C, recuperando el solvente (**Fig. 11**), el cual se empleó nuevamente para repetir el proceso de extracción (**Carvajal, 2009; Plazas 2012**).



**Figura 10.** Extracto concentrado. Hojas

Autor foto: Villarreal, L



**Figura 11.** Segunda extracción

Autor foto: Villarreal, L

#### 7.4. Fraccionamiento de los extractos

Los extractos etanólicos obtenidos de hojas y tallos de *C. fimbriata* se secaron al vacío, posteriormente se fraccionaron mediante extracción sólido-líquido discontinua utilizando como solvente de polaridad media el diclorometano. Las soluciones con diclorometano se filtraron separando así la fracción o parte apolar de la polar, este procedimiento se realizó hasta que el

solvente no presentó ningún color. Se obtuvieron 4 extractos, 2 extractos polares (fracción etanólica) de hojas y tallos, y dos extractos apolares (fracción diclorometano) de hojas y tallos.

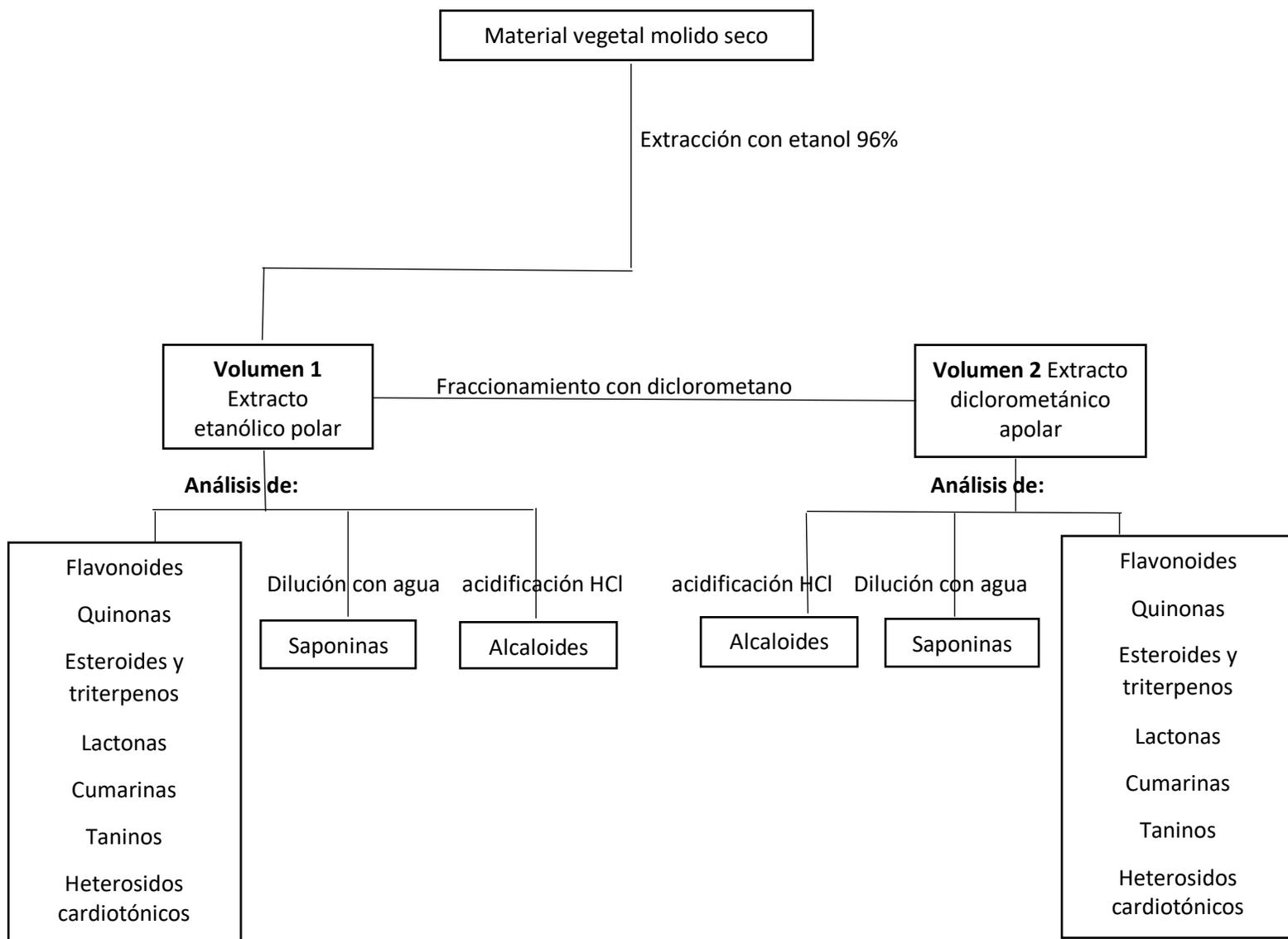
### 7.5. Análisis fitoquímico preliminar

El análisis fitoquímico preliminar se realizó siguiendo una metodología basada en los protocolos propuestos por; Calderón (1963), Domínguez (1985), Bilbao (1997) la guía de farmacognosia de la universidad de Antioquia (2013, 2009) y la guía de fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. (Fig. 12). Se realizaron pruebas cualitativas en tubo de ensayo para los siguientes grupos de metabolitos secundarios: Flavonoides, Alcaloides, Saponinas, Heterósidos cardiotónicos, Cumarinas, Lactonas, Quinonas, taninos, esteroles y triterpenos. A cada grupo de metabolitos secundarios se le realizaron 2 pruebas fitoquímicas y dichas pruebas se emplearon tanto para las fracciones apolares como las polares de tallos y hojas (Tabla 1). Para la pruebas de alcaloides a los extractos se les eliminó el solvente y se acidificaron con ácido clorhídrico al 5%. Como control negativo se usó el reactivo de cada prueba y el extracto diluido en el respectivo solvente (Tabla 3).

Posteriormente se utilizaron pruebas de coloración en cromatografía de capa delgada con el fin de corroborar los resultados obtenidos en la primera parte. El análisis cromatográfico se realizó empleando placas cromatográficas de silica gel F<sub>254</sub> (Merck) como fase estacionaria y como fase móvil se usaron dos mezclas diferentes: primero se usó una mezcla de éter de petróleo-acetato de etilo en proporción 7:3 y luego una mezcla de diclorometano-acetato de etilo en proporción 8:2. Las placas se revelaron con luz UV de longitud de onda corta 254nm y larga 365nm, se revelaron además con amoníaco, reactivo de Wagner y con vainillina 1% en ácido sulfúrico y temperatura (se calentaron las placas después de agregar vainillina).

**Tabla 1.** Pruebas cualitativas empleadas para cada grupo de metabolitos secundarios y extractos a los que se les aplico.

Metabolitos secundarios	Prueba	Reactivos	Extractos	Órganos de la planta
Flavonoides	Shinoda	HCl 20% y Mg	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Leucoantocianidinas	HCl y temperatura (T)		
Alcaloides	Mayer	HgCl <sub>2</sub> , KI y agua destilada	Polar y apolar (acidulado)	Hojas y tallos
	Dragendorff	Bi <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , HCL y KI		
Saponinas	Espuma	Agua destilada	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Rosenthaler	Vainillina 1% en etanol		
Quinonas	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , tolueno, NaOH 5% en NH <sub>3</sub> 2% , (T)	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Borntrager-Krauss	KOH 5% y benceno		
Lactonas	Legal	Piridina, nitroprusiato de sodio y KOH 2N	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Kedde	Acido 3,5-dinitrobenzoico 3% en metanol y KOH 6%		
Cumarinas	NaOH	NaOH 10%	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Hidroxamato férrico	Clorhidrato de hidroxilamina 2%, NaOH 2N, HCL 2N,		
Heterosidos cardiotónicos	Keller Killiani	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> 5%, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , FeCl <sub>3</sub> 1% en etanol, (T)	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Raymond	m-dinitrobenzeno 1% en etanol		
Esteroles y triterpenos	Salkowski	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Liebermann-Buchard	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y anhídrido acético		
Taninos y fenoles	Gelatina-sal	Gelatina NaOH	Polar y apolar	Hojas y tallos
	Cloruro férrico	FeCl <sub>3</sub> 1%		



**Figura 12.** Metodología pruebas cualitativas análisis fitoquímico preliminar

## 8. RESULTADOS

### 8.1. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar para pruebas cualitativas en tubo se resumen en la tabla 4.

La cantidad de material vegetal empleada fue menor a la propuesta por Calderón (1963) 50gr. Pero se consideró suficiente para realizar las pruebas, las cuales se hicieron a nivel cualitativo y no cuantitativo.

**Tabla 2.** Porcentajes de rendimiento de los extractos

Órgano	Peso material seco (g)	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
Hojas	38.4	7,91	20.5
Tallos	16.0	2,26	14

**Tabla 3.** Convenciones utilizadas

<b>C-</b>	control negativo	Reactivo utilizado
<b>C1-</b>	control negativo	Extracto etanólico de hojas
<b>C2-</b>	control negativo	Extracto etanólico de tallos
<b>C3-</b>	control negativo	Extracto diclorometano de hojas
<b>C4-</b>	control negativo	Extracto diclorometano de tallos
<b>HP</b>	prueba	Extracto más reactivo. Hojas (hojas polar)
<b>TP</b>	prueba	Extracto más reactivo. Tallos (tallos polar)
<b>HAP</b>	prueba	Extracto más reactivo. Hojas (hojas apolar)
<b>TAP</b>	prueba	Extracto más reactivo. Tallos (tallos apolar)
Extracto polar = etanólico		Extracto apolar = diclorometano

**Tabla 4.** Resultados del análisis fitoquímico preliminar de hojas y tallos de *C. fimbriata*.

Metabolito	Prueba	Extracto polar		Extracto apolar	
		Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	+	+	-	-
	Leucoantocianidinas	+	+	-	-
<b>Alcaloides</b>	Mayer	+	+	-	-
	Dragendorff	+	+	-	-
<b>Cumarinas</b>	NaOH	-	-	-	-
	Hidroxamato férrico	-	-	-	-
<b>Saponinas</b>	Espuma	+	-	-	-
	Rosenthaler	-	-	-	-
<b>Taninos y fenoles</b>	Gelatina-sal	+	+	-	-
	Cloruro férrico	+	+	-	-
<b>Esteroides y triterpenos</b>	Salkowski	+	+	+	+
	Liebermann-Buchard	+	+	+	+
<b>Heterósidos cardiotónicos</b>	Keller Killiani	-	-	+	+
	Raymond	-	-	-	-
<b>Lactonas</b>	Legal	-	-	-	-
	Kedde	-	-	-	-
<b>Quinonas</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+	+	-	-
	Borntrager-Krauss	+	+	-	-

(+) Prueba positiva (-) Prueba negativa

El análisis de flavonoides mediante la prueba Shinoda fue positivo para el extracto polar de hojas y tallos, la prueba de leucoantocianidinas fue positiva para los extractos polares de hojas y tallos. Las pruebas Shinoda y Leucoantocianidinas para flavonoides fueron negativas en los extractos apolares de tallos y hojas.

### 8.1.1. Flavonoides

#### Shinoda



HP C1- C- C2- TP C-

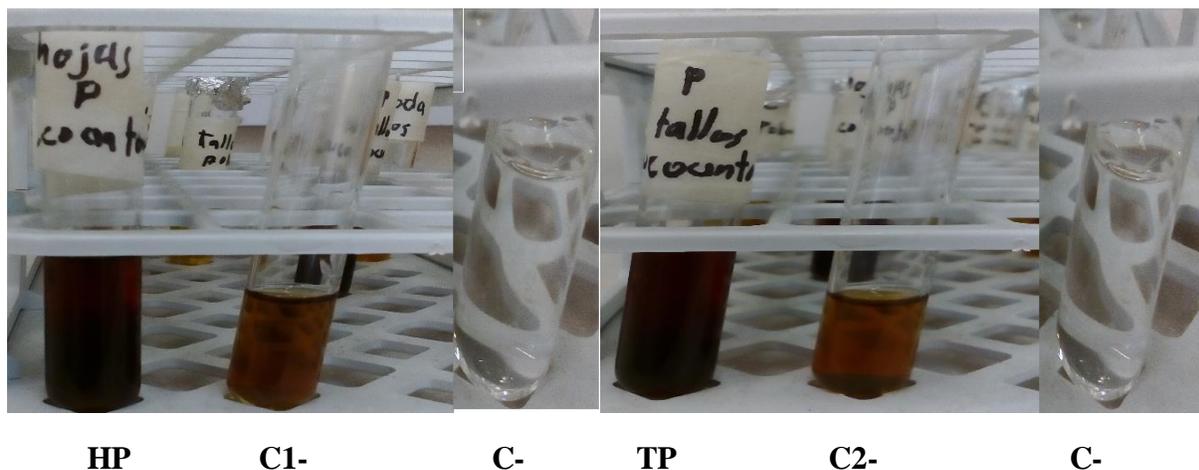
Figura 13. Prueba Shinoda para Flavonoides de extractos polares de hojas y tallos



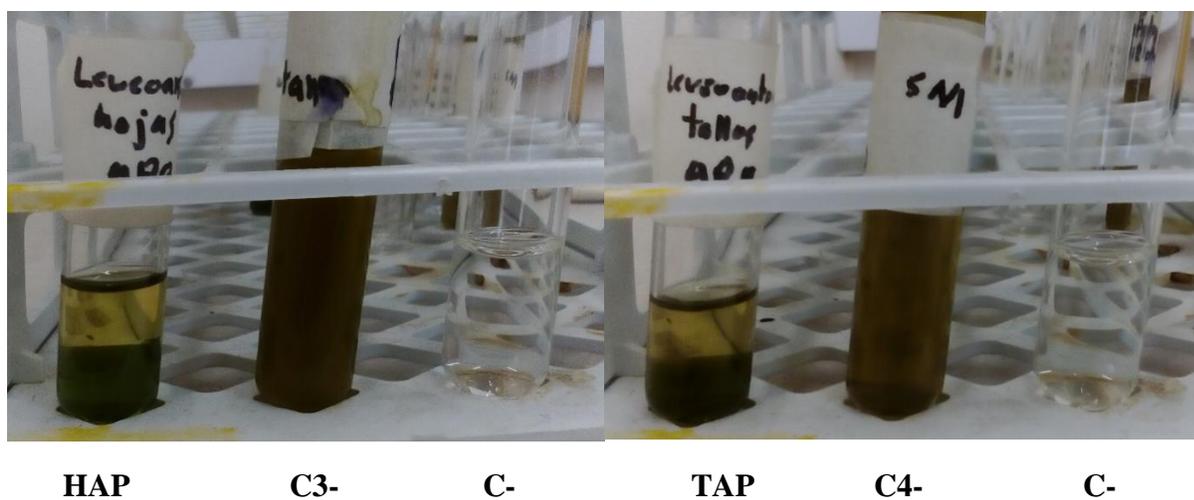
HAP TAP C3- C4-

Figura 14. Prueba Shinoda para extractos apolares de hojas y tallos

### Leucoantocianidinas



**Figura 15.** Prueba Leucoantocianidinas para extractos polares de hojas y tallos



**Figura 16.** Prueba Leucoantocianidinas para extractos polares de hojas y tallos

#### 8.1.2. Alcaloides

Para el análisis de alcaloides se realizaron las pruebas Dragendorff y Mayer las cuales fueron positivas para los extractos polares de hojas y tallos. A diferencia de los extractos apolares para los cuales las pruebas fueron negativas.

### Dragendorff



HP

C-

C1-

TP

C-

C2-

**Figura 17.** Prueba Dragendorff para alcaloides de extractos ácidos de la fracción polar de hojas y tallos



HAP

C3-

C-

TAP

C4-

C-

**Figura 18.** Prueba Dragendorff para extractos ácidos de la fracción apolar de hojas y tallos

### Mayer



HP

C-

C1-

TP

C-

C2-

**Figura 19.** Prueba Mayer para alcaloides para extractos polares de hojas y tallos



HAP C3- C- TAP C- C4-

Figura 20. Prueba Mayer para alcaloides para extractos apolares de hojas y tallos

### 8.1.3. Cumarinas.

Las pruebas NaOH e hidoxmato férrico fueron negativas para todos los extractos

#### NaOH



C1- C- HP C2- C- TP

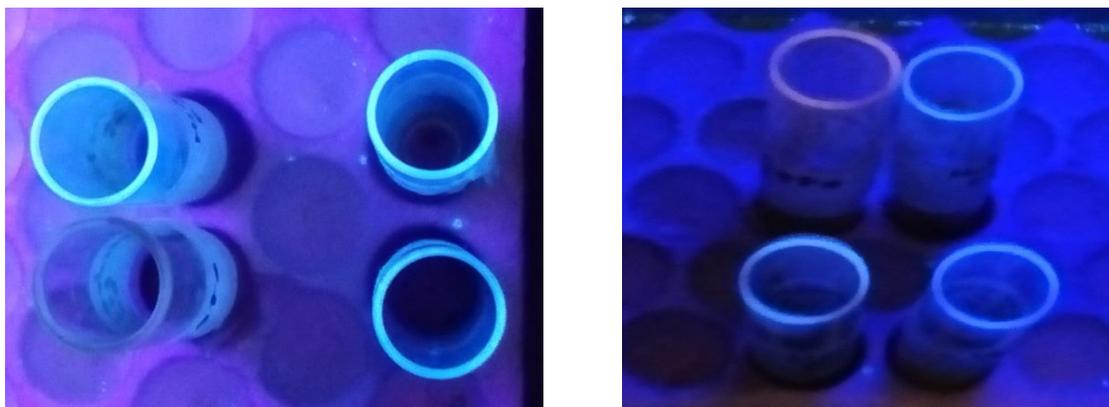
Figura 21. Prueba NaOH para cumarinas para extractos polares de hojas y tallos



HAP C3- C- TAP C4- C-

Figura 22. Prueba NaOH para cumarinas para extractos apolares de hojas y tallos

### Hidroxamato férrico

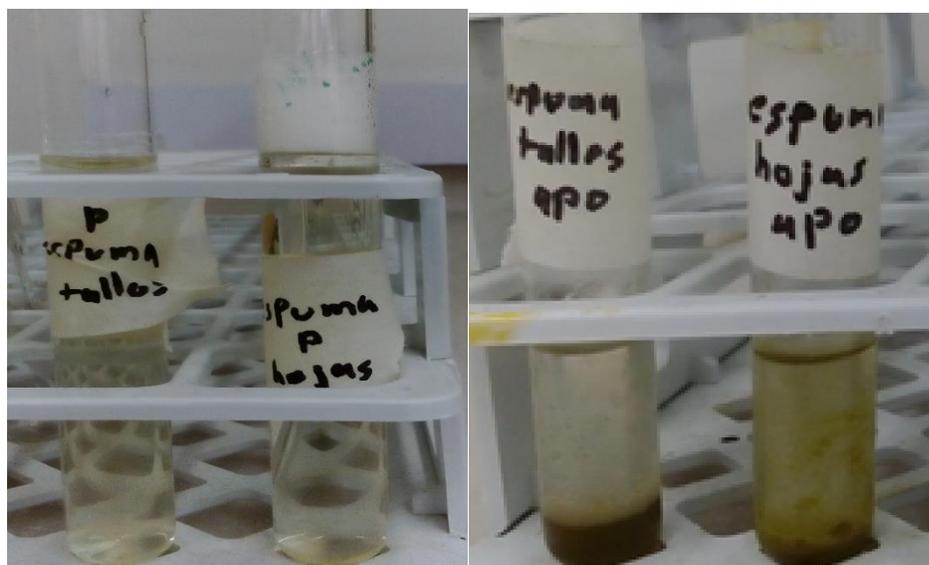


**Figura 23.** Prueba de hidroxámato férrico para cumarinas extractos polares y apolares de hojas y tallos

#### 8.1.4. Saponinas

La prueba de la espuma para determinar la presencia de saponinas fue positiva únicamente para el extracto polar de hojas. En los demás extractos no se evidenció la presencia de saponinas ni con la prueba de la espuma ni con la prueba de Rosenthaler.

#### Espuma



TP

HP

TAP

HAP

El control (C-) para esta prueba fue agua

**Figura 24.** Prueba de la espuma para saponinas. Extractos polares y apolares de hojas y tallos

### Rosenthaler



C1-            HP            C-            TP            C2-            C-

Figura 25. Prueba Rosenthaler para saponinas para los extractos polares de hojas y tallos



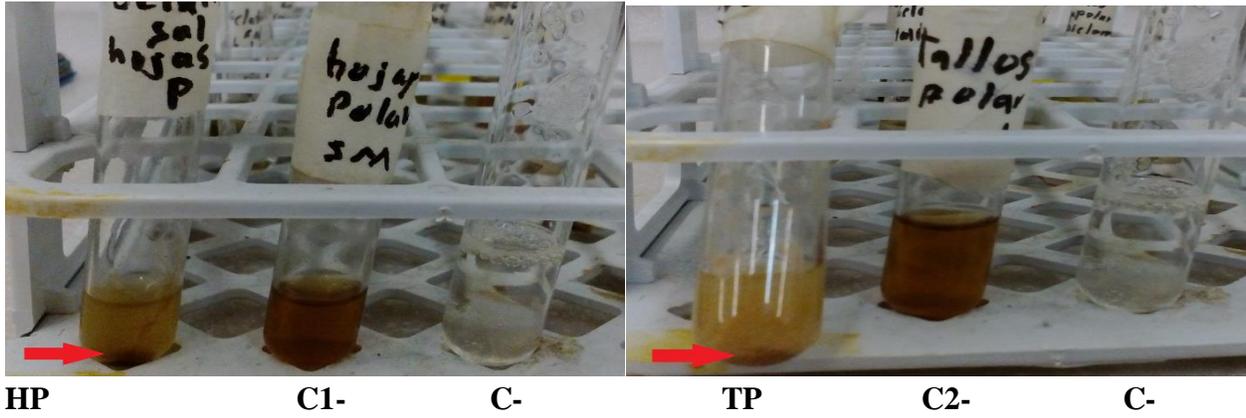
HAP            C3-            C-            C-            TAP            C4-

Figura 26. Prueba Rosenthaler para saponinas para los extractos Apolares de hojas y tallos

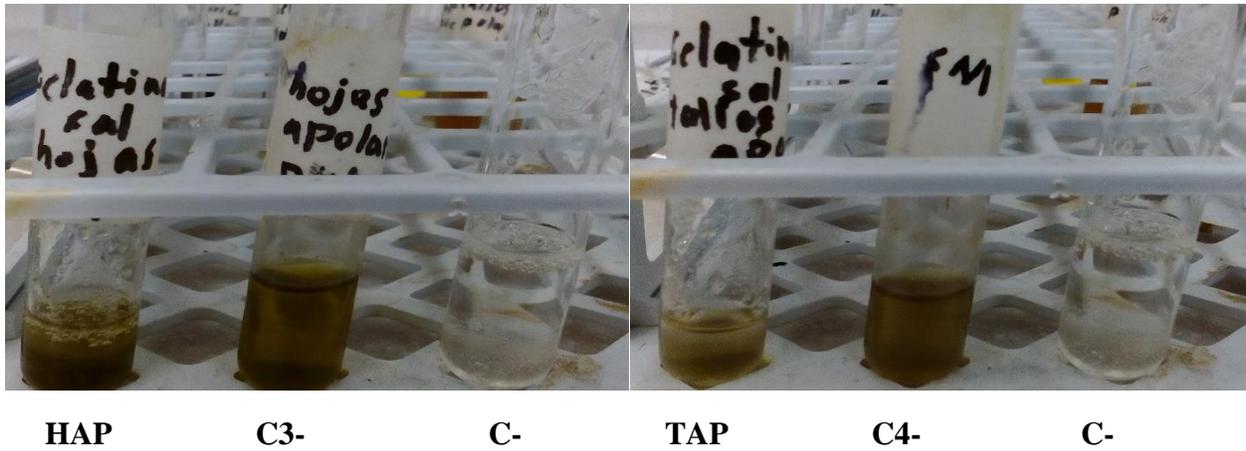
#### 8.1.5. Taninos y fenoles

Se determinó la presencia de taninos y fenoles únicamente en los extractos polares de hojas y tallos, mediante las pruebas gelatina-sal y cloruro férrico.

**Gelatina-sal**

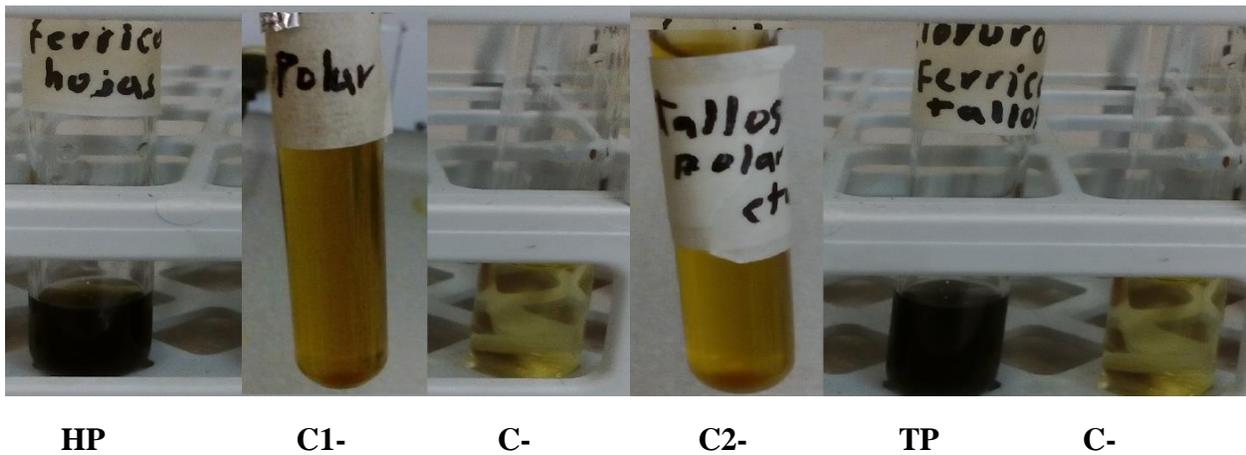


**Figura 27.** Prueba gelatina sal para taninos para extractos polares de hojas y tallos



**Figura 28.** Prueba gelatina sal para taninos para extractos apolares de hojas y tallos

**Cloruro férrico**



**Figura 29.** Prueba cloruro férrico para taninos para extractos polares de hojas y tallos

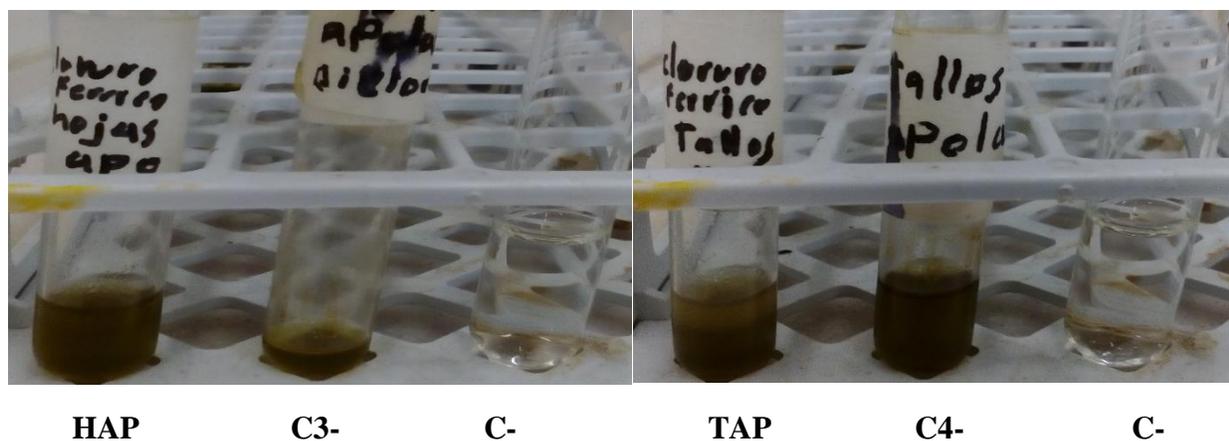


Figura 30. Prueba cloruro férrico para taninos para extractos apolares de hojas y tallos

### 8.1.6. Triterpenos y esteroides

Las pruebas Salkowski y Liebermann-Buchard fueron positivas para todos los extractos.

#### Salkowski

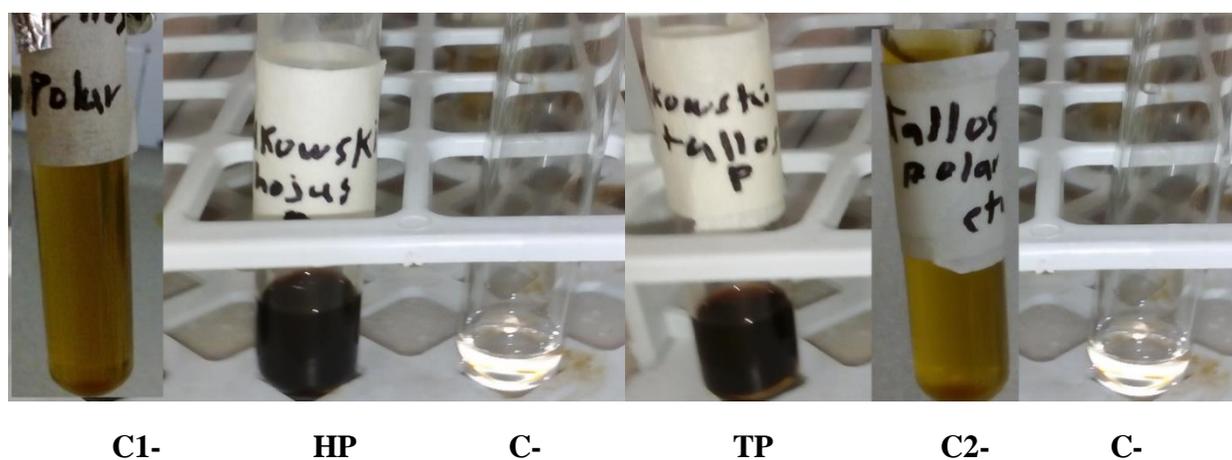


Figura 31. Prueba Slakowski para esteroides y triterpenos para extractos polar de hojas y tallos

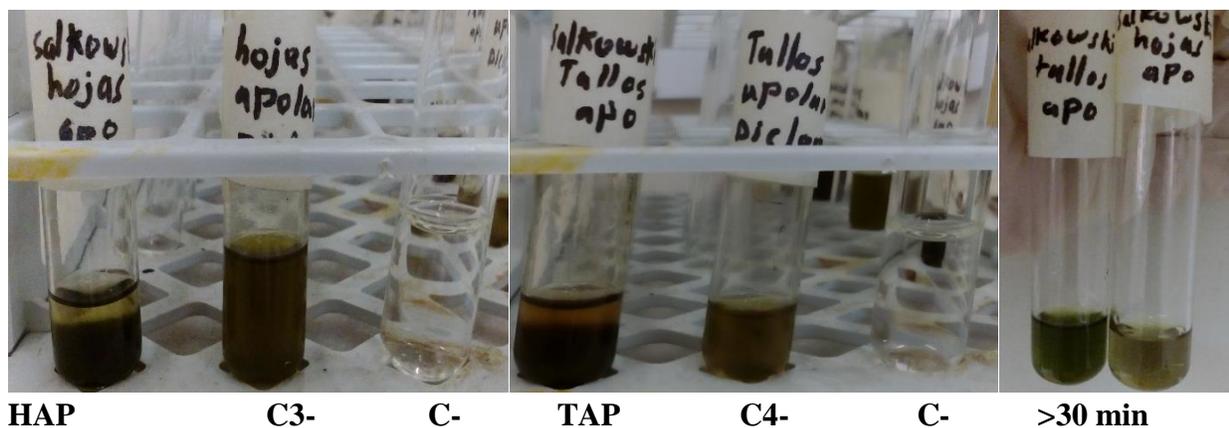


Figura 32. Prueba Slakowski para esteroides y triterpenos para extractos apolar de hojas y tallos

### Liebermann-Buchard



HP C1- C- C2- TP C-

Figura 33. Prueba Liebermann- Buchard para esteroides y triterpenos para extractos polares de hojas y tallos



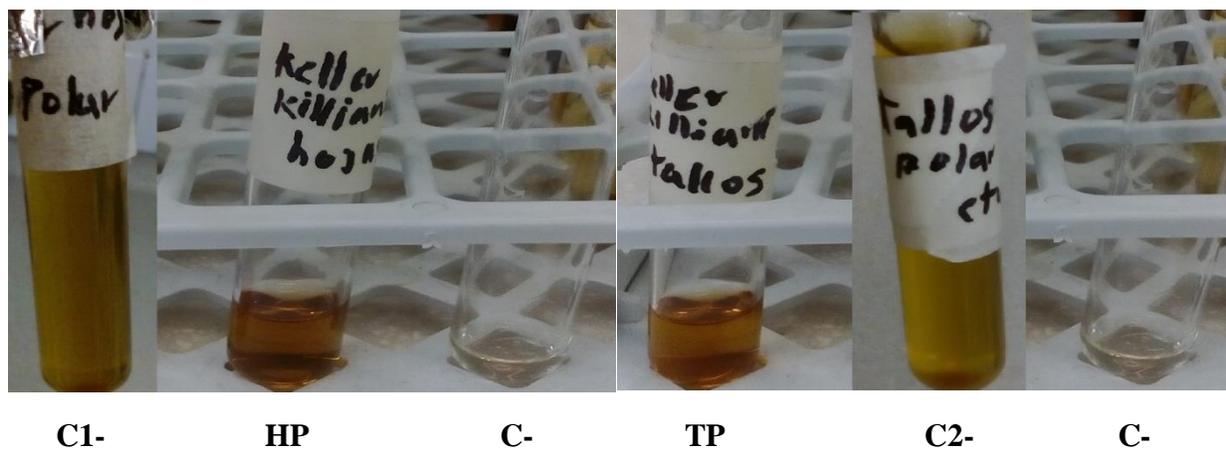
C3- HAP C- C4- TAP C-

Figura 34. Prueba Liebermann- Buchard para esteroides y triterpenos para extractos apolares de hojas y tallos

#### 8.1.7. Heterósidos cardiotónicos

Las pruebas cualitativas para determinar la presencia de heterósidos fueron las pruebas Keller Killiani y Raymond. Solo fue positiva la prueba de Keller-Killiani en el extracto apolar de hojas y tallos.

### Keller-Killiani



C1-

HP

C-

TP

C2-

C-

Figura 35. Prueba Keller-Killiani para heterósidos cardiotónicos para extractos polares de hojas y tallos



HAP

C3-

C-

TAP

C4-

C-

Figura 36. Prueba Keller-Killiani para herósidos cardiotónicos para extractos apolares de hojas y tallos

### Raymond



C1-

HP

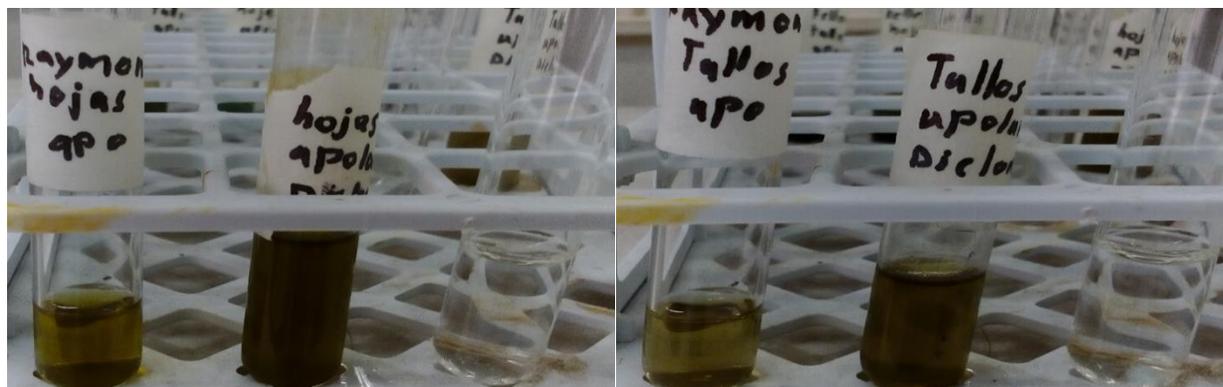
C-

TP

C2-

C-

Figura 37. Prueba Raymond para heterósidos cardiotónicos para extractos polares de hojas y tallos



HAP C3- C- TAP C4- C-

**Figura 38.** Prueba Raymond para heterósidos cardiotónicos para extractos apolares de hojas y tallos

### 8.1.8. Lactonas

No se evidenció la presencia de lactonas en ninguno de los extractos polares o apolares.

### Legal



HP C1- C- TP C2- C-

**Figura 39.** Prueba de Legal para lactonas para extractos polares de hojas y tallos



C- C3- HAP C- C4- TAP

**Figura 40.** Prueba de Legal para lactonas para extractos apolares de hojas y tallos

## Kedde

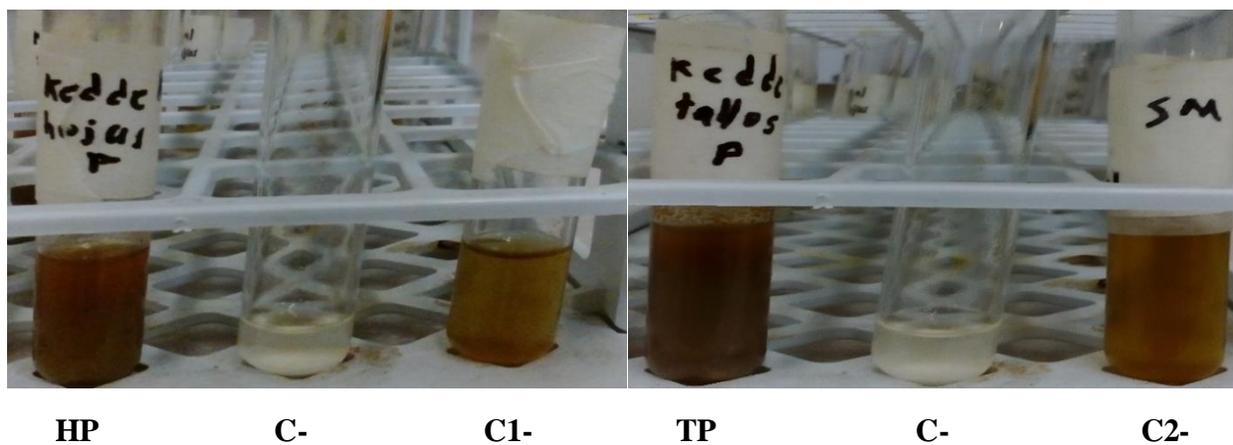


Figura 41. Prueba Kedde para lactonas para extractos polares de hojas y tallos

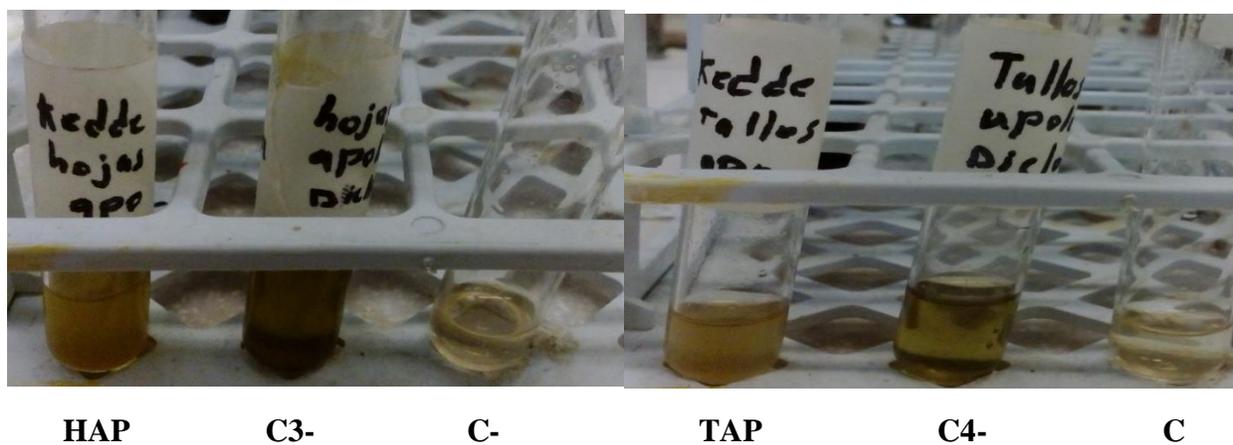


Figura 42. Prueba Kedde para lactonas para extractos apolares de hojas y tallos

## 8.1.9. Quinonas

La presencia de quinonas se evidenció en los extractos polares de tallos y hojas

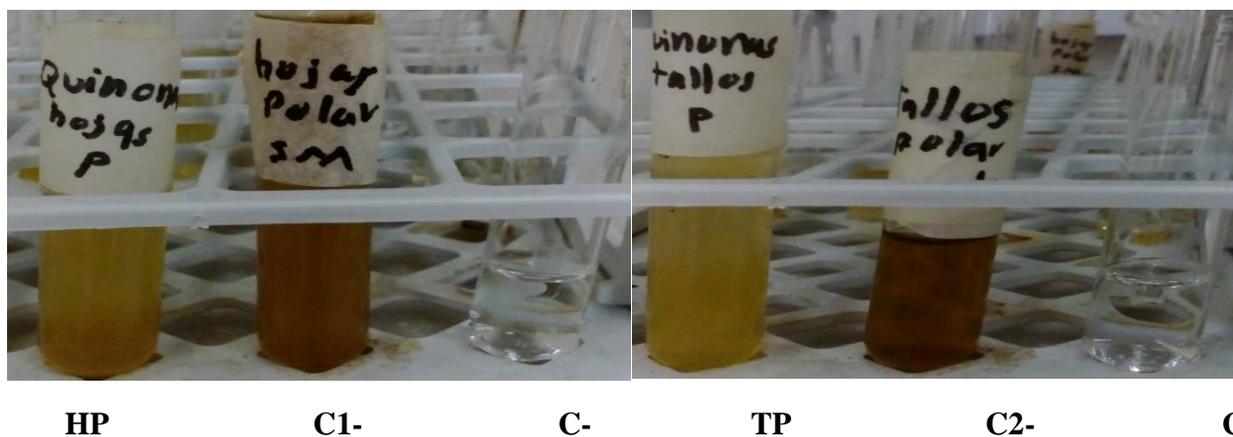
 $H_2SO_4$ 

Figura 43. Prueba ácido sulfúrico para quinonas para extractos polares de hojas y tallos



HAP

C3-

C-

TAP

C4-

C-

Figura 44. Prueba ácido sulfúrico para quinonas para extractos apolares de hojas y tallos

KOH



HP

C1-

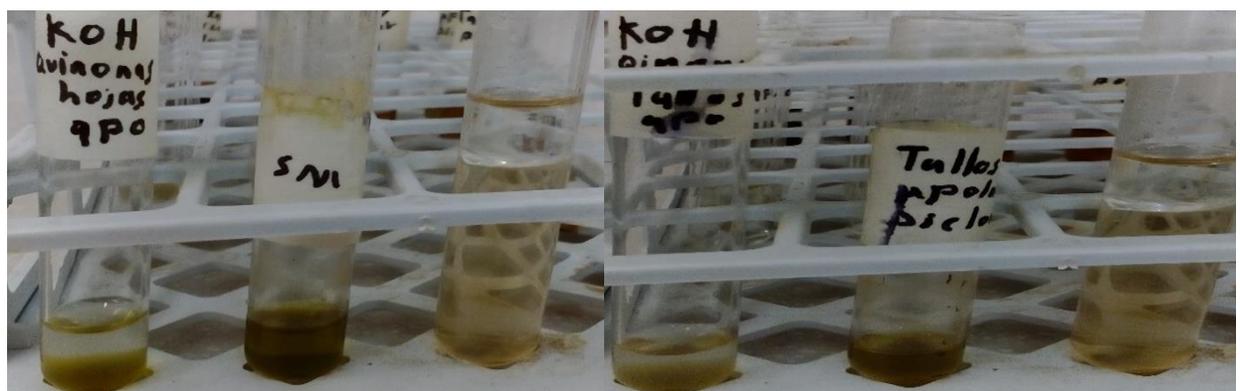
C-

TP

C2-

C-

Figura 45. Prueba hidróxido de potasio (Borntrager-Krauss) para quinonas para extractos polares de hojas y tallos



HAP

C3-

C-

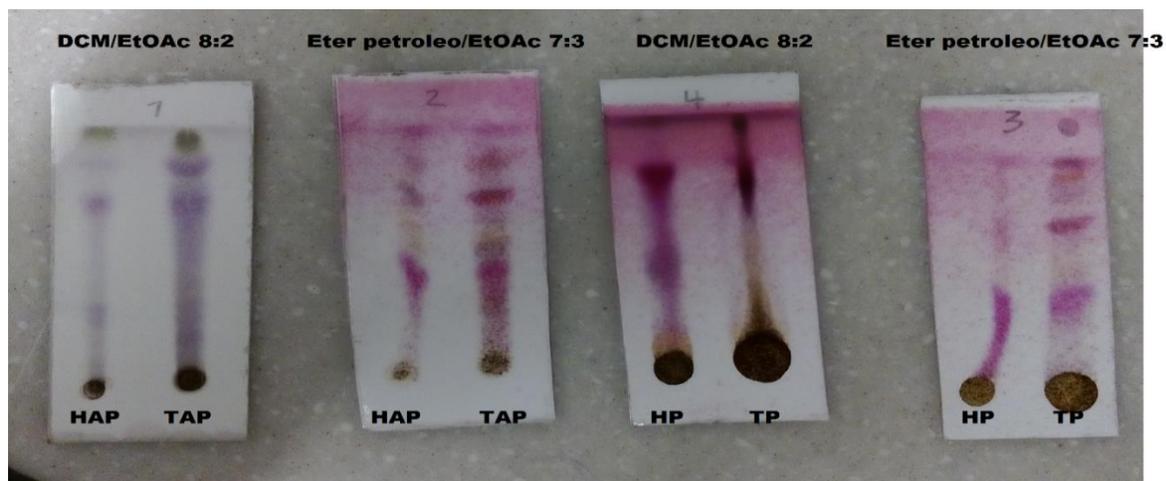
TAP

C4-

C-

Figura 46. Prueba hidróxido de potasio (Borntrager-Krauss) para quinonas para extractos apolares de hojas y tallos

## 8.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

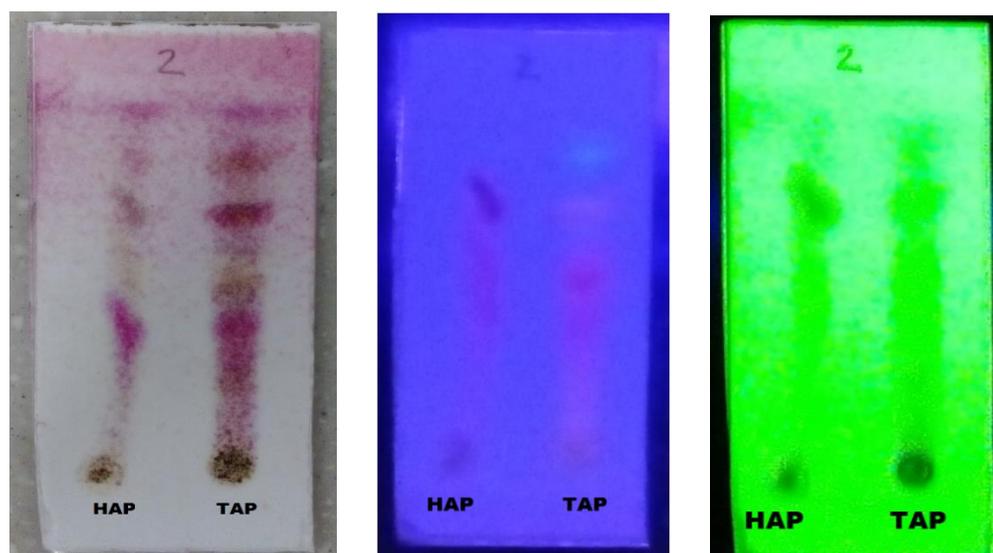


**Figura 47.** Cromatografías reveladas con Vainillina para extractos polares y apolares de hojas y tallos

Fase estacionaria: silica gel

Fase móvil: **éter de petróleo / acetato de etilo 7:3**

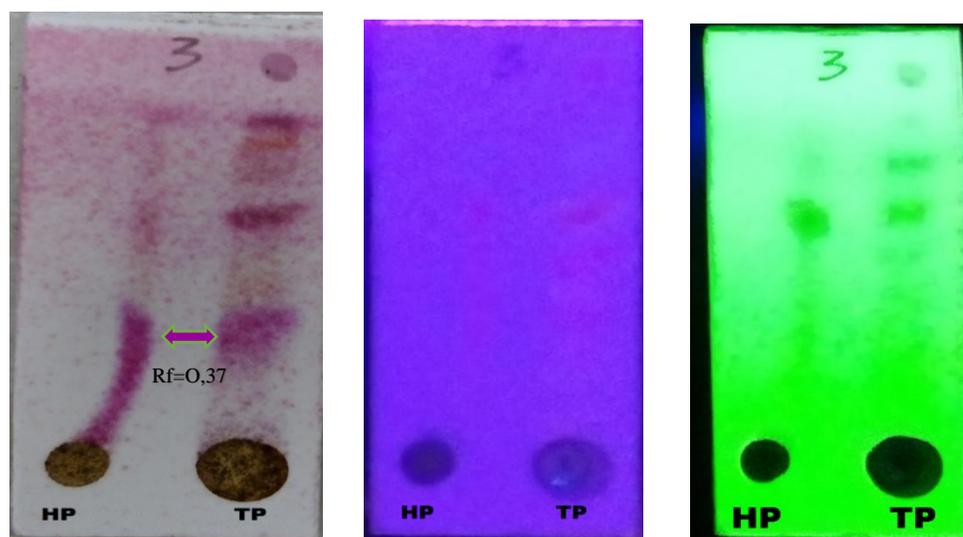
Placa 2 hojas y tallos fracción apolar



**Revelador:** Vainillina 1%+T (temperatura) luz UV onda larga luz UV onda corta

**Figura 48.** Cromatografía de la fracción apolar de hojas y tallos. Éter de petróleo / acetato de etilo 7:3

Placa 3 hojas y tallos fracción polar



Revelador: Vainillina 1% + T

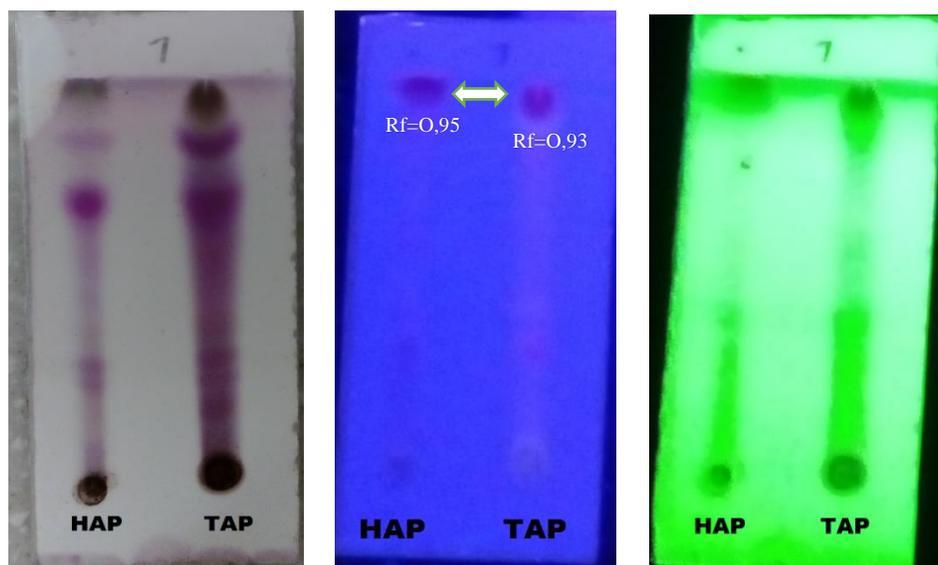
luz UV onda larga

luz UV onda corta

**Figura 49.** Cromatografía de la fracción polar de hojas y tallos. Éter de petróleo / acetato de etilo 7:3

Fase móvil: **Diclorometano / acetato de etilo 8:2**

Placa 1 hojas y tallos fracción apolar



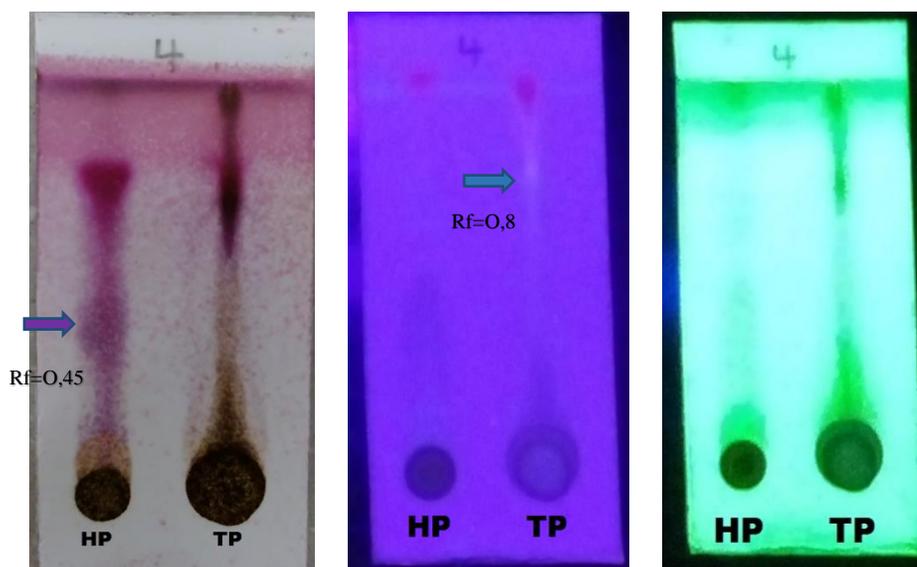
Revelador: Vainillina 1% + T

luz UV onda larga

luz UV onda corta

**Figura 50.** Cromatografía de la fracción apolar de hojas y tallos. Diclorometano / acetato de etilo 8:2

## Placa 4 hojas y tallos fracción polar

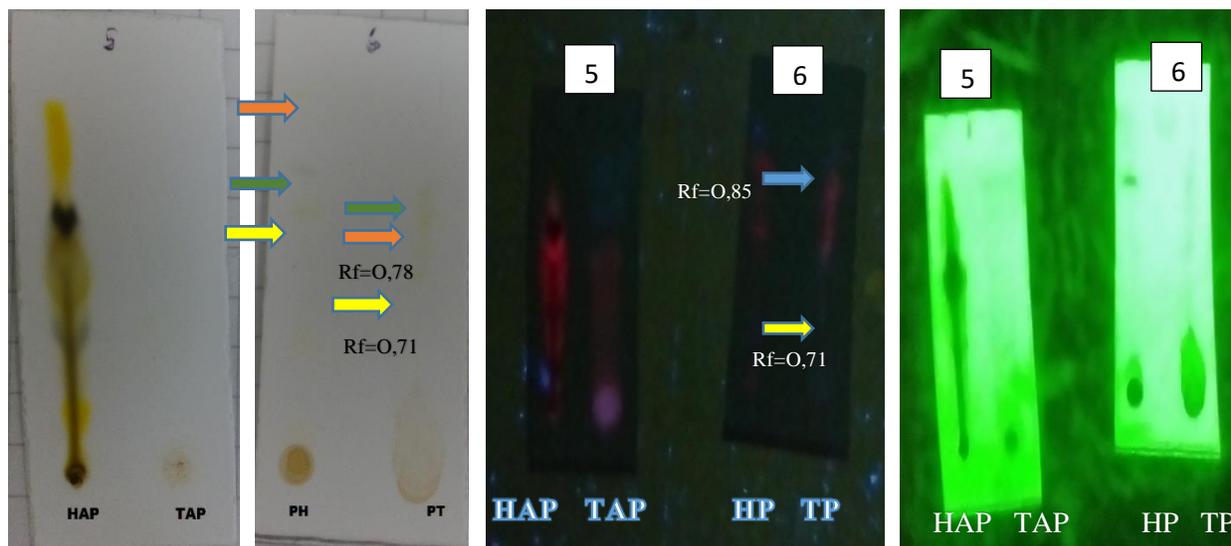


Revelador: Vainillina 1% + T      luz UV onda larga      luz UV onda corta

**Figura 51.** Cromatografía de la fracción polar de hojas y tallos. Diclorometano / acetato de etilo 8:2

Fase móvil: éter de petróleo / acetato de etilo 7:3

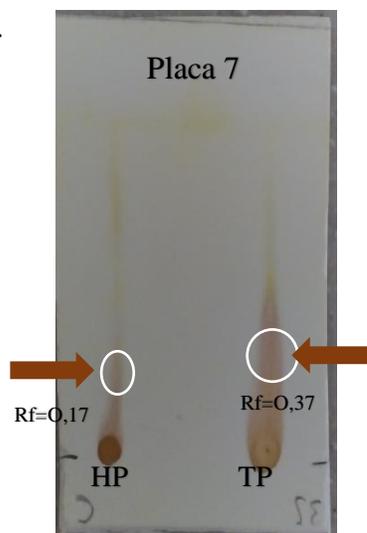
Placa 5 y 6 hojas y tallos fracciones polar (5) y apolar (6)



Revelador: Amoniaco      luz UV onda larga      luz UV onda corta

**Figura 52.** Cromatografía de la fracción polar y apolar de hojas y tallos. Éter de petróleo / acetato de etilo 7:3

Placa 7 hojas y tallos fracción polar



Revelador: Reactivo de Wagner

**Figura 53.** Cromatografía de la fracción polar de hojas y tallos. Éter de petróleo / acetato de etilo 7:3

## 9. DISCUSIÓN

Las pruebas cualitativas para flavonoides permitieron evidenciar la presencia de flavonoides en los extractos polares de hojas y tallos de *C. fimbriata*. Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y son muy comunes en el orden de los Ericales (do Nascimento *et al.*, 2015). Su presencia en las hojas se debe a que son pigmentos y copigmentos vegetales que además de dar coloración protegen la planta de la oxidación ultravioleta ubicándose en la cutícula foliar. (Claus 1968). Algunos flavonoides se ubican en el tallo y los tejidos leñosos. La presencia de flavonoides en los extractos polares (Fig 13 y 15) de hojas y tallos se puede deber a que estos son muy solubles en solventes polares (flavonas, flavonoles y antocianinas), aunque los flavonoides presentan solubilidad en un gran rango de disolventes polares y apolares. Los flavonoides estuvieron ausentes en los extractos apolares (Fig 14 y 16). La coloración roja del extracto polar de hojas y la coloración naranja del extracto polar de tallos generadas rápidamente al reaccionar con HCl y Mg (prueba Shinoda) se debe a la presencia de flavonas, flavononas o flavonoles (Fig. 13). La coloración roja oscura (Fig. 15) es característica de la leucoantocianidinas (flavandiol-3,4) al agregar HCl 2N y calentar (prueba leucoantocianidinas). En el caso de la prueba Shinoda al agregar HCl en presencia de Mg el H<sup>+</sup> del ácido reduce un oxígeno de la benzopirona (para

flavonoides con anillo  $\gamma$  benzopirona), y en el caso de la prueba de leucoantocianidinas al agregar HCl concentrado se genera una oxidación, probablemente produciéndose una antocianidina responsable de la coloración roja (**Bilbao 1997; Mercano 2002; Sanabria et al., 1997; Domínguez 1985**).

La presencia de flavonoides se confirmó mediante el análisis cromatográfico en capa delgada. Generalmente para este análisis se usa una fase móvil de acetato de etilo y agua sobre sílica gel. El cromatofolio con las muestras de extractos polares de hojas y tallos revelado con amoníaco evidenció manchas débilmente coloreadas de color amarillo y naranja ( $R_f = 0,71$  y  $R_f = 0,78$  respectivamente, placa 6, Fig 52) diferentes a las xantofilas y las clorofilas, ya que a diferencia de estas los flavonoides antes de ser revelados con amoníaco son casi incoloros y se encuentran en menor cantidad como se puede observar en las placas cromatográficas 5 y 6 (**Fig. 52**). Al ser reveladas con luz UV (onda larga 365nm) se observan manchas fluorescentes azul claro ( $R_f = 0,85$  placa 6) propias de la catequinas, pertenecientes a los flavonoles. También se observa una fluorescencia débil de color amarillo ( $R_f = 0,71$  placa 6) característica de las flavonas y los glucósidos flavonólicos; (**Domínguez 1985**) placa cromatográfica 6 (**Fig. 52**). Hay que anotar que los colores amarillos y verdes que se muestran en la placa 5 de la figura 52 corresponden a otros pigmentos.

Para determinar la presencia de alcaloides se acidularon los extractos con HCl 5%, eliminando previamente el solvente ya que solventes como el etanol disuelven los precipitados. Las pruebas para alcaloides fueron positivas para los extractos polares de hojas y tallos (**Fig 17 y 19**). Esta determinación se basa en la capacidad que tienen los alcaloides de precipitarse al combinarse con metales y metaloides, en reactivos como; tetrayodomercuriato potásico o reactivo de Mayer y el yoduro de bismuto y potasio reactivo Dragendorff el cual genera una precipitación color naranja o marrón (**Fig. 17**) (**Domínguez 1985; Calderón 1963; Bruneton 2001**). En presencia de estos reactivos los alcaloides forman sales dobles insolubles que por diferencia de densidad se precipitan (sales dobles con el bismuto en el caso de la prueba de Dragendorff). El yoduro potásico reacciona con el cloruro mercuríco generando un precipitado rojo, que en presencia de iones yoduro forma anión incoloro que reacciona con los alcaloides produciendo un precipitado de color pardo para el caso del reactivo de Mayer (**Fig. 19**). No obstante, hay que anotar que algunas proteínas pueden precipitarse con estos reactivos (**Bilbao 1997**). Aunque los alcaloides se encuentran comúnmente

en el orden de los Ericales no se han encontrado alcaloides en las demás especies estudiadas de este género (**Llorent et al., 2015**).

En el estudio cromatográfico al revelar con luz ultravioleta longitud de onda larga se obtuvo una fluorescencia color turquesa ( $R_f = 0,8$  placa 4) o azul muy claro (**Fig. 51**) característica de un grupo de alcaloides denominados alcaloides oxindólicos (**Mora 2008**). Al revelar con el reactivo de Wagner (**Fig. 53**) se generaron manchas marrones ( $R_f = 0,17$  y  $R_f = 0,37$ . Placa 7) que probablemente corresponden a los alcaloides (**Domínguez 1985**).

No se estableció la presencia de cumarinas en ninguno de los extractos. Este tipo de metabolitos al poseer una estructura  $\gamma$ -lactona generan coloración amarilla al reaccionar disolviéndose en una solución alcalina de NaOH. En la figura 21 se observa que hay un cambio de coloración en los extractos polares de tallos y hojas al igual que en los extractos apolares (**Fig. 22**) pero no coincide con los resultados reportados como positivos en la literatura. La prueba de hidroxamato férrico también fue negativa para cumarinas, esta prueba es positiva si se genera fluorescencia anaranjada (**Carvajal et al., 2009**), la cual no se evidenció en ninguno de los extractos (**Fig. 23**). Probablemente este tipo de metabolitos secundarios no son frecuentes en el género *Clethra* ya que tampoco se han reportado cumarinas en las especies estudiadas de este género (**Llorent et al., 2015**).

En el análisis cualitativo de saponinas solo fue positivo el extracto polar de hojas con la prueba de la espuma, pero no fue positivo con la prueba de Rosenthaler para el mismo extracto. Los demás extractos; tallos polar, hojas y tallos apolar no presentaron saponinas. Las saponinas al igual que los cardiotónicos disminuyen la tensión superficial del agua produciendo espuma estable que permanece por más de 15 minutos (**Fig. 24**). La presencia de saponinas únicamente en hojas de la fracción polar se debe a que estas dada su alta polaridad se extraen principalmente con solventes polares como el etanol, probablemente se encuentran únicamente en hojas (en esta especie) debido a su función antimicrobiana y antifúngica como sistema de defensa vegetal de las hojas (**Bilbao 1997; Bruneton 2001**).

La presencia de saponinas en el extracto polar de hojas se corrobora con el análisis cromatográfico de las placas con muestras polares de hojas y tallos (**Fig 49 y 51**). Los colores azul y azul-violeta ( $R_f = 0,45$  placa 4) y amarillo afirman la presencia de saponinas en hojas de la fracción polar al revelar con vainillina 1% y posteriormente calentar (**Wagner & Bladt 1996**).

La prueba gelatina-sal para taninos y fenoles permitió evidenciar la presencia de taninos en el extracto polar de hojas y tallos (**Fig. 27**). La prueba de tubo es positiva ya que muestra una precipitación de taninos. Los taninos al ser polifenoles poseen grupos hidroxilos (hidroxilos fenólicos) que forman enlaces cruzados con proteínas (también tienen afinidad con alcaloides) y otros biopolímeros como la gelatina la cual es un polímero de péptidos, de esta forma al unirse estas dos macromoléculas (taninos-gelatina) por diferencia de densidad se precipitan. Los resultados obtenidos son soportados por la prueba de cloruro férrico que también fue positiva para los extractos polares de hojas y tallos (**Fig. 29**). La coloración obtenida; azul oscuro, afirma la presencia de taninos y fenoles que reaccionan con la solución acuosa de  $\text{FeCl}_3$  al 1%, y su coloración indica la presencia de taninos derivados del ácido gálico. Las pruebas de taninos y fenoles fueron negativas para los extractos apolares de hojas y tallos, debido al carácter hidrosoluble (polar) de los taninos. Los extractos apolares de hojas y tallos muestran dos fases producto de la poca solubilización que tiene el reactivo gelatina-sal con los extractos diluidos con diclorometano (solvente) no se debe confundir con una reacción positiva de precipitación (**Fig 28 y 30**). Se han considerado los taninos como sustancias de excreción y mecanismo de defensa, por lo tanto su presencia es común en órganos expuestos como las hojas y las ramas, en donde se localizan debajo de la corteza (**Bilbao 1997; Bruneton 2001**). Al revelar con vainillina 1% y temperatura en el análisis cromatográfico, los taninos generan colores cereza o rosado intenso (**Martínez 2007**), estos colores no se observan claramente en las placas 3 y 4 (**Fig 49 y 51**) pero posiblemente están entre la mancha (analito) fucsia ( $R_f=0,75$  placa 4) y el violeta  $R_f=0,45$  el cual probablemente corresponde a saponinas, como ya se mencionó.

Las pruebas para esteroides y triterpenos fueron positivas tanto para los extractos polares como los apolares. Con el reactivo de Salkowski se observó una coloración roja muy oscura, casi negra en todos los extracto, afirmando la presencia de esteroides y triterpenos. Los extractos apolares de tallos al cabo de 30 minutos cambiaron su coloración a verde claro y los extractos apolares de hojas cambiaron a un amarillo claro (**Fig 31 y 32**), estos cambios de coloración indican la presencia de esteroides. De igual forma la prueba de Liebermann-Bachard fue positiva para todos los extractos. Los extractos polares de hojas y tallos con este reactivo generaron una coloración naranja confirmando la presencia de esteroides y triterpenos. Los extractos apolares de hojas con la prueba Liebermann-Buchard reaccionaron produciendo una coloración verde-azulosa que se intensificó luego de 10 minutos debido a la presencia de esteroides (probablemente colesterol) (**Fig. 33**). Los

extractos apolares de tallos presentaron una coloración verde más opaca (**Fig. 34**). Sustancias como los carotenos y las xantofilas también pueden dar positivas para estas pruebas, pero estos generan coloraciones inmediatas. Los esteroides y triterpenos son principalmente apolares, su presencia en los extractos polares puede deberse a esteroides saponificados. Los mecanismos y los requerimientos estructurales para que la prueba sea positiva aún no se conocen (**Calderón 1963; Domínguez 1985; Bilbao 1997**). Los triterpenos y esteroides son comunes en todas las familias botánicas y se localizan generalmente en todos los órganos debido a que son precursores de otras moléculas.

Las placas cromatográficas reveladas con luz UV onda larga muestran colores azules oscuros propios de los triterpenos ( $R_f=0,95$  y  $R_f=0,93$  Placa 1) (**Fig. 50**) (**Wagner & Bladt 1996**). Además se encuentran al final de la placa debido a que son apolares y se arrastran más fácilmente con el eluyente.

En cuanto al análisis cualitativo de heterósidos cardiotónicos se tomaron como negativas las pruebas realizadas (Keller-Killiani y Raymond). Los extractos apolares de hojas y tallos para el reactivo de Keller-Killiani presentaron los resultados reportados como positivos en la literatura, solo estos extractos presentaron la coloración característica; azul-verdoso, sin embargo esta prueba es específica para desoxiazúcares, por lo tanto no es suficiente para confirmar la presencia de heterósidos cardiotónicos (**Fig. 36**). La prueba Keller-killiani para extractos polares de hojas y tallos (**Fig. 35**) generó una coloración roja diferente a la coloración reportada como positiva (azul-verdoso) para estos compuestos, esta coloración se desarrolla cuando un ácido en presencia de hierro interactúa con un azúcar (**Bilbao 1997; Bruneton 2001**). La prueba de Raymond la cual según la literatura debe exhibir una coloración azul o rojo-violeta para heterósidos cardiotónicos, fue negativa para hojas y tallos del extracto polar donde se generó un marrón oscuro estable (**Fig. 37**) también fue negativa para los extractos apolares de hojas y tallos generándose un color verde claro (o amarillo verdoso) producto de la disolución del extracto con el reactivo (**Fig. 38**).

Los heterósidos cardiotónicos generan fluorescencia muy débil o no la generan. Al revelar con vainillina en ácido sulfúrico y calentar la placa por lo general se producen colores marrones. (**Wagner & Bladt 1996**). Con base en las pruebas Keller-Killiani y Raymond, no se estableció la presencia de heterósidos cardiotónicos en hojas y tallos de los extractos polar y apolar. (Al ser una

especie no estudiada es difícil establecer una referencia precisa de presencia/ausencia de compuestos)

En el análisis de lactonas mediante las pruebas Legal y Kedde no se determinó su presencia en ningún extracto. Lo cual coincide con los resultados obtenidos para *Clethra arbórea* (Llorent *et al.*, 2015) y de los Ericales en general (do Nascimento *et al.*, 2015). La presencia de las lactonas en las plantas es poco frecuente, estas se encuentran solo en algunas familias botánicas de las angiospermas principalmente las asteráceas y también se encuentran en algunas briofitas (Bruneton 2001). Comúnmente se localizan en pubescencias a nivel de las hojas. Al revelar con vainillina 1% se generan manchas rojas (No observadas). El resultado negativo de la prueba de Kedde específico para el anillo lactónico que hace parte de la estructura de los heterósidos cardiotónicos confirma la ausencia de este grupo de metabolitos (Amaringo *et al.*, 2011).

Se determinó la presencia de quinonas en los extractos polares de hojas y tallos mediante las pruebas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Borntrager-Krauss. Las quinonas en presencia de ácidos y álcalis concentrados dan colores rojos y amarillos. El ácido sulfúrico diluido más calentamiento hidroliza los glucósidos cambiando el pH. El color amarillo de la fracción polar de hojas y tallos (Fig. 43) confirma la presencia de quinonas; las antroquinonas dan esta coloración. La coloración roja resultante al aplicar el reactivo Borntrager-Krauss a los extractos polares de hojas y tallos confirma la presencia de quinonas. Al agregar KOH a la muestra y posteriormente extraer con benceno se forman dos fases una alcalina de color amarillo y una bencénica, al separarlas y agregar KOH a la fase alcalina que lleva las quinonas se genera una coloración roja propia de las 1,4-naftoquinonas. Varios grupos OH y dobles enlaces conjugados tienen un efecto batocrómico en el que cambia la longitud de onda de absorción de las quinonas cambiando de color según la acidez o en este caso la basicidad. Las quinonas muestran coloración violeta (Rf=0,37 placa 3) al ser reveladas con luz UV (Fig 49 y 51) (Sanabria *et al.*, 1997; Domínguez 1985; Bilbao 1997). En los estudios realizados para *Clethra arborea* no se habían encontrado quinonas, aunque son comunes en angiospermas.

Los Rf se midieron con el fin de referenciar las manchas (analitos) en las placas cromatográficas ya que no se pueden utilizar para la identificación de sustancias en este caso, esto debido que los Rf cobran importancia solo en procedimientos reproducibles de precisión con placas cromatográficas y proporciones de solventes específicas.

Los agentes cromogénicos empleados fueron: amoniaco, vainillina 1% en ácido sulfúrico con calentamiento, reactivo de Wagner y luz UV. Teniendo como principal referencia la vainillina 1% debido a su capacidad de revelador universal.

Además hay que anotar que los procedimientos en los que se basó este estudio, a las fracciones apolares solo les realizaron pruebas de triterpenos y esteroides, debido al carácter polar (en su mayoría) de los demás grupos de metabolitos secundarios. En este estudio se realizaron las mismas pruebas para todos los grupos de metabolitos acá contemplados tanto para la fracción apolar como la polar. Todas las pruebas de; flavonoides, alcaloides, quinonas, taninos, etc., que se le realizaron a las fracciones apolares de tallos y hojas se hicieron con el fin de ratificar y demostrar un buen procedimiento de extracción y fraccionamiento.

## 10. CONCLUSIONES

Se determinó mediante pruebas cualitativas de tubo la presencia de alcaloides, flavonoides, quinonas, taninos y fenoles en los extractos polares de hojas y tallos. Se establecieron como ausentes los heterósidos cardiotónicos en los extractos polar y apolar de hojas y tallos. Siendo junto a las lactonas los únicos grupos de metabolitos secundarios que no se encuentran reportados en los Ericales

Se estableció como positiva la presencia de saponinas las cuales se identificaron únicamente en el extracto polar de hojas con la prueba de la espuma, aunque respaldando este resultado con el análisis cromatográfico en el cual los colores azul y azul-violeta ( $R_f=0,45$  placa 4) confirman la presencia de saponinas. Se determinó la presencia de esteroles y triterpenos en los extractos apolares y polares de hojas y tallos, siendo el único grupo de metabolitos secundarios en estar presentes en los dos órganos y en las dos fracciones (polar y apolar).

Las pruebas para lactonas y cumarinas fueron negativas para todos los extractos. Su ausencia coincide con los resultados obtenidos en los estudios fitoquímicos realizados en *Clethra arbórea* y los Ericales. Salvo las cumarinas las cuales si se han reportado en el orden de los Ericales

## 11. RECOMENDACIONES

Debido al objetivo del estudio de establecer una base teórica y científica se recomienda y se espera continuar con los estudios químicos de esta especie y este género.

Realizar estudios fitoquímicos cuantitativos y biológicos con el fin de determinar el compuesto o los compuestos bioactivos con propiedad de febrífugo.

Realizar pruebas fitoquímicas diferentes a la prueba de Raymond para heterósidos cardiotónicos y pruebas fitoquímicas diferentes para saponinas, para corroborar los resultados obtenidos en este estudio.

Seguir los estudios fitoquímicos de la flora de alta montaña, especialmente bosque alto andino, páramo y subpáramo donde el acceso es restringido.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Amaringo, F., Hormaza, A., Arias, M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en *thevetia peruviana*. *Scientia et Technica* 49. Pp 298-303

Amin, E. (2011). *Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de Piper cf. cumanense kunth*. Tesis Magistral. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Bernal, H. Y. García, H., & Quevedo, G. (2011). *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. Estrategia Nacional para la conservación de plantas*. Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial–Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 232pp.

Bilbao, M. (1997). Análisis fitoquímico preliminar. *Química de productos naturales*. Universidad del Quindío. Armenia, Colombia.

Bruneton, J., Villar, A., Carreto, E & Rebuella, M. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica plantas medicinales*. 2ª Ed. Acribia.S.A. Zaragoza, España.

Calderón, E. (1963). Guía para análisis de plantas y notas practicas sobre fitoquímica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá

- Calixto, B. J. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 33. Pp 179-189
- Camargo, L. (1979). Catalogo ilustrado de plantas de Cundinamarca. Instituto de ciencias naturales – museo de historia natural. Universidad Nacional de Colombia. 2. Pp 1-15.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., & Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia Forestal*, 12(1). Pp 161-170.
- Claus, E & Varro, E. (1968). *Farmacognosia*. 5<sup>a</sup> Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
- do Nascimento Rocha, M. E., Figueiredo, M. R., Kaplan, M. A. C., Durst, T., & Arnason, J. T. (2015). Chemotaxonomy of the Ericales. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61. Pp 441-449.
- Domínguez, X. (1985). *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa S. A. México D. F. México.
- Flores, G., Nuñez, O., Nuñez, M., Ramírez, L., Ramírez, M., & Zusunaga, J. (2010). *100 Plantas útiles del páramo Rabanal: Guía para comunidades rurales*. Instituto Alexander von Humboldt-CAR-Corpoboyacá-Corpochivor. Bogotá, Colombia.
- García, N., Vargas, A., Figueroa, Y. (2006). *Los cerros orientales y su flora. Acueducto de Bogotá, sus reservas y su gestión ambiental*. Cooperativa editorial magisterio. Bogotá. Colombia.
- Llorent, E. J., Gouveia, S., & Castilho, P. C. (2015). Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisilva forest species. *Industrial Crops and Products*, 64. Pp 135-151.
- Lock, O. (2010). Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. *Manual de Fitoterapia*, Perú: Pontificia Universidad Católica de Perú. Pp 41-64.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. 2ed. Torino, Caracas, Venezuela
- Martinez, J. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*. Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Mora, C., Osorio, E., Galeano, E. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia. Universidad de Antioquia. Facultad de Farmacognosia. Medellín, Colombia
- Mora, C., Sorza, M., Valencia, A. (2009). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia. Universidad de Antioquia. Facultad de Farmacognosia. Medellín, Colombia
- Plazas González, E. A. (2012). Análisis fitoquímicos preliminares y de actividad biológica de cuatro especies nativas de las áreas rurales del distrito capital. Jardín botánico José Celestino Mutis. Contrato 234

- Rangel, J. (2001). La región paramuna y franja aledaña en Colombia. Colombia Diversidad Biótica III. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co>. Consultado en agosto 15 del 2015.
- Rivera, D., & Córdoba, C. (1998). Guía ecológica parque natural Chicaque. Jardín botánico José Celestino Mutis.
- Sanabria-Galindo, A., López, S. I., & Gualdrón, R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev Col Cienc Quím Farm*, 26. Pp 15-9.
- Sarker, S., Latif, Z., & Gray, A. (2006). *Natural products isolation*. 2nd ed. Humana Press Inc. New Jersey. U.S.A. Pp. 18-20
- Sharapin, N. 2002. Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia*. 1 (3). Pp 23-28.
- Sukumaran, P., Nair, G., Chinmayee, M., Mini, I., & Sukumaran, T. (2012). Phytochemical Investigation of *Bidens biternata*(Lour.) Merr. and Sheriff.—A Nutrient-Rich Leafy Vegetable from Western Ghats of India. *Biochem Biotechnol*. 167. Pp 1795–1801
- Toscano Gonzalez, J. (2006). Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda San Isidro, municipio de San José de Pare-Boyacá: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Acta biol. Colombia*, 11(2). Pp 137-1146.
- Vargas, W. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montañas el Quindío y los Andes centrales*. Universidad de Caldas. Manizales. Colombia. Pp 226-229
- Wagner, H & S, Bladt. (1996). *A thin layer chromatography atlas*. 2ed. Springer. Munchen, Germany.

### 13. ANEXOS

#### Anexo 1

Metabolitos reportados en *Clethra arbórea* y en los Ericales en general

#### *Clethra arbórea*

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Hojas</b>
Flavonoides	+
Fenoles	+
Saponinas	+
Triterpenos	+

#### Ericales

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Presencia/Ausencia</b>
Flavonoides	+
Fenoles	+
Saponinas	+
Triterpenos	+
Quinonas	+
Lignanós	+
Alcaloides	+
Cumarinas	+
Taninos	+