



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 15 de Mayo del 2019

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad Neiva, Huila.

El (Los) suscrito(s):

____ Karollan Osorio Quintero _____, con C.C. No.1083892607

____ Rubén Darío Giraldo Manchola _____, con C.C. No. 1075304379,

_____, con C.C. No. _____,

_____, con C.C. No. _____,

autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o _____

titulado ___ Estudio Fitoquímico preliminar de la Especie *Begonia erythrophylla* _____

presentado y aprobado en el año ___2019___ como requisito para optar al título de

____ Licenciado(a) en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología _____;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

Vigilada Mineducación



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores" , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Karollan F. Quintero

Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

[Signature]

Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: _____



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Estudio Fitoquímico preliminar de la Especie *Begonia erytrophylla*.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Osorio Quintero	Karollan
Giraldo Manchola	Rúben Darío

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castañeda Gomez	Jhon Fredy

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciado(a) en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.

FACULTAD: Educación.

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura en ciencias Naturales y Educación Ambiental.

CIUDAD: Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2019 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 57

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías_x__ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general_x__ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___
Tablas o Cuadros_x_

Vigilada mieducación



SOFTWARE Word y PDF

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN Meritoria

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Begonia erythrophylla	Begonia erythrophylla	6. _____	_____
2. Tamizaje fitoquímico	Phytochemical screening	7. _____	_____
3. Metabolitos secundarios	Secondary metabolites	8. _____	_____
4. Purificación	Purification	9. _____	_____
5. Espectroscopía	Spectroscopy _____	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

La familia Begoniaceae, comprende aproximadamente 2000 especies vegetales pertenecientes en su mayoría al género *Begonia*. Dentro de la medicina tradicional se han reportado plantas de esta familia con propiedades curativas, entre ellas, se encuentra su uso para la regulación de niveles de glucosa en sangre de pacientes diabéticos, previniendo posibles daños, los cuales a largo plazo pueden generar una nefropatía diabética. La especie *Begonia erythrophylla* es usada tradicionalmente para tratar problemas renales, no obstante, la falta de suficiente información científica sobre las sustancias químicas producidas por esta planta no ha permitido establecer cuáles son aquellas que participan en el tratamiento de enfermedades nefro-diabéticas. Este trabajo de investigación describe el tamizaje fitoquímico preliminar de la especie vegetal *Begonia erythrophylla*, con el objetivo de identificar los metabolitos secundarios presentes en esta planta. Inicialmente se realizó la colecta de las partes aéreas (hojas y tallos), el secado y el pulverizado del material vegetal, subsecuentemente, a partir de tres disolventes de diferente polaridad se prepararon los extractos vegetales, los cuales fueron sometidos a diferentes pruebas fitoquímicas y por cromatografía en capa fina para identificar los metabolitos secundarios presentes; de este proceso se logró determinar la presencia de flavonoides, terpenos, esteroides y sesquiterpenlactonas. Al término de los ensayos, se purificaron algunos compuestos a través de la técnica de cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina preparativa. Un compuesto, fue identificado mediante las



técnicas de espectroscopía Uv y IR, punto de fusión y factor de retención (Rf) como un flavonoide del tipo isoflavona.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The family Begoniaceae, includes approximately 2000 vegetable species belonging mostly to the genus *Begonia*. Within the traditional medicine plants of this family have been reported with healing properties, among them, its use is found for the regulation of blood glucose levels of patients diabetics patients. The species *Begonia erythrophylla* is traditionally used to treat kidney problems, however, the lack of sufficient scientific information on the chemical substances produced by this plant has not allowed to establish which are those that participate in the treatment of nephrodiabetic diseases. This research paper describes the preliminary phytochemical screening of the plant species *Begonia erythrophylla*, with the aim of identifying the secondary metabolites present in this plant. Initially, the collection of the aerial parts (leaves and stems), the drying and pulverization of the vegetal material was carried out, subsequently, from three solvents of different polarity, the vegetal extracts were prepared, which were subjected to different phytochemical tests and by thin layer chromatography to identify the secondary metabolites present; From this process, the presence of flavonoids, terpenes, sterols and sesquiterpenectones was determined. At the end of the tests, the purification of some compounds was carried out through the technique of column chromatography and preparative thin layer chromatography. One compound was identified by Uv and IR spectroscopy techniques, melting point and retention factor (Rf) as a possible flavonoid, like an isoflavone.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado:

Firma:

Nombre Jurado: Alcides Polanía Patiño

Firma:

Nombre Jurado: Luis Javier Narváez Zamora

Firma:



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS**



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	4 de 4
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



Facultad de Educación

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Semillero de investigación en Química de la Universidad

Surcolombiana (SIQUS)

“Estudio Fitoquímico Preliminar de la Especie *Begonia erythrophylla*”

Presentado por:

Rubén Darío Giraldo Manchola 20141126269

Karollan Osorio Quintero 20112106749

Neiva-Huila, Colombia

09 de Mayo de 2019



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

Facultad de Educación

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Semillero de investigación en Química de la Universidad

Surcolombiana (SIQUS)

“Estudio Fitoquímico Preliminar de la Especie *Begonia erythrophylla*”

Trabajo de Grado para optar al título de

Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.

Presentado por:

Rubén Darío Giraldo Manchola 20141126269

Karollan Osorio Quintero 20112106749

Jhon Fredy Castañeda Gomez

Director de tesis

Neiva-Huila, Colombia

09 de Mayo de 2019

Nota de Aceptación

Firma presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Asesor

Neiva, 2019

Dedicatoria

Dedicado a Dios, por guiar mi camino durante todo este proceso y a mi bella abuela Alicia, quien desde el cielo ha sido testigo de cada uno de mis sacrificios y esfuerzos.

A mis padres, Yubelí Quintero Imbachí y Faiver Armando Osorio, por brindarme su amor y apoyo incondicional, permitiéndome culminar esta importante etapa de mi vida.

A mi hermosa hija Mariana, por ser mi motivación e inspiración cada día.

A mi director de tesis, Jhon Fredy Castañeda Gomez y a mi compañero, Rubén Darío Giraldo Manchola, por la paciencia, dedicación y compromiso entregado al proyecto.

Karollan Osorio Quintero

Dedicado a Dios, por guiar mi camino durante todo este proceso.

A mis padres, Rubén Darío Giraldo y Dora Constanza Manchola quienes depositaron en mí todas sus virtudes, amor y apoyo incondicional, permitiéndome culminar esta etapa de mi vida.

A mi director de tesis, Jhon Fredy Castañeda Gomez y a mi compañera, Karollan Osorio Quintero, por las cualidades que compartieron conmigo para de esa forma lograr culminar exitosamente nuestro proyecto.

Rubén Darío Giraldo Manchola

Agradecimientos

De manera especial, agradecemos a nuestro asesor de tesis Jhon Freddy Castañeda Gomez, por poner a nuestra disposición sus conocimientos, por su dedicación, paciencia y apoyo para la efectuación y culminación del presente trabajo.

A la coordinadora de los laboratorios de Química de la Universidad Surcolombiana, Yeimis Johana Montealegre Figueroa, por su colaboración y disponibilidad ofrecida de los equipos, materiales y reactivos utilizados.

Al coordinador de los laboratorios de Biología de la Universidad Surcolombiana, Wilson Rodrigo Cruz, por habernos permitido utilizar algunos instrumentos fundamentales para el desarrollo del presente trabajo.

A los profesores: Luis Javier Narváez Zamora de la Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental y Alcides Polanía Patiño, por su dedicación, sugerencias y contribución para lograr del presente proyecto un trabajo de calidad.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	3
2. Objetivos.....	5
2.1. General	5
2.2. Específicos	5
3. Planteamiento del Problema	6
4. Justificación	7
5. Marco Teórico	10
5.1 La familia Begoniaceae.....	10
5.2 El género Begonia	11
5.3 La especie <i>Begonia erythrophylla</i>	12
5.4 Metabolitos secundarios identificados en el género <i>Begonia</i>	14
5.4.1 Los terpenos y esteroides.....	14
5.4.2 Las saponinas.....	16
5.4.3 Los flavonoides.....	17
5.5 Espectroscopia infrarroja	18
5.6 Espectroscopía ultravioleta visible.....	19
6. Antecedentes.....	20
7. Metodología.....	22
7.1 Fase de campo	22
7.2 Fase de laboratorio	23
7.3 Tamizaje fitoquímico preliminar para la identificación de metabolitos secundarios 25	
7.3.1 Pruebas para cumarinas.....	25
7.3.2 Pruebas para flavonoides.....	25
7.3.3 Pruebas para compuestos esteroidales.....	25
7.3.4 Prueba para terpenoides.....	26
7.4 Fraccionamiento primario de los extractos por cromatografía de columna.....	26

7.5	Identificación de los metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina	27
7.6	Identificación de algunas fracciones por la técnica de Espectrometría Ultra violeta-Visible (UV/VIS)	28
7.7	Espectroscopia infrarroja	30
7.7.1	<i>Medida del Background.</i>	30
7.7.2	<i>Ajuste de la muestra.</i>	31
7.7.3	<i>Manipulación del espectro.</i>	31
8.	Resultados y Análisis	34
8.1	Tamizaje preliminar para la identificación de metabolitos secundarios	34
8.2	Fraccionamiento primario del extracto hexánico empleando cromatografía de columna	42
8.3	Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto hexánico	44
8.5	Análisis del compuesto de interés por espectroscopia Uv-vis e IR	48
9.	Conclusiones.....	55
10.	Bibliografía.....	56

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies de Begonias que habitan en rangos altitudinales iguales o menores a 420 m.s.n.m.....	7
Tabla 2 Estado actual del conocimiento fitoterapéutico del Genero Begonia.	20
Tabla 3. Resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de Begonia erythrophylla.....	42
Tabla 4. Fracciones obtenidas en la cromatografía de columna realizada al extracto hexánico.	43
Tabla 5. Fracciones obtenidas a partir de la unión de las fracciones con Rf similares... 46	
Tabla 6. Fracciones obtenidas en la cromatografía de columna realizada a la fracción V.	47
Tabla 7. Algunas constantes de fuerza de enlace (Gordon M, 2006, pág. 107).	51

Índice de figuras

Figura 1. Algunos ejemplares de la familia Begoniaceae: a) <i>Begonia cucullata</i> , b) <i>Begonia nelumbiifolia</i> , c) <i>Begonia rex</i> Putz. (Neotropical Flora).....	10
Figura 2. Especie vegetal <i>Begonia erythrophylla</i>	13
Figura 3. Flor de la especie vegetal <i>Begonia erythrophylla</i>	13
Figura 4. Biosíntesis del pirofosfato de isopentilo (Domínguez, 1973, pág. 52).	15
Figura 5. Base estructural del ergosterol (Domínguez, 1973, pág. 140)	16
Figura 6. Base estructural del eudesmanólido (Domínguez, 1973, pág. 93).	16
Figura 7. Estructura de la saponina (Domínguez, 1973, pág. 150).....	17
Figura 8. Estructura química de los flavonoides (Domínguez, 1973, pág. 83).	18
Figura 9. Secado de manera natural del material vegetal.	23
Figura 10. Proceso de secado artificial del material vegetal.....	23
Figura 11. Proceso de pulverización de la muestra seca de <i>Begonia erythrophylla</i>	24
Figura 12. Preparación de los extractos vegetales: a) Masa del material vegetal pulverizado, b) Proceso de filtración de los extractos, c) Proceso de rota-evaporación de los extractos vegetales.	24
Figura 13. Equipo UV/VIS, serie 502508121003, modelo Perkin Elmer Lambda 35 del laboratorio de Química de la Universidad Surcolombiana.....	29
Figura 14. Celdas de cuarzo para espectroscopia UV/VIS.	29
Figura 15. Equipo de IR Shimadzu, modelo Affinity IR, serie A2137600394 del laboratorio de química de la Universidad Surcolombiana.....	31
Figura 16. Atenuador de Reflectancia.	32
Figura 17. Abrazadera de presión.	32
Figura 18. Análisis del compuesto puro por IR.	33
Figura 19. Prueba de Ehrlich: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.....	34
Figura 20. Reacción de la prueba de Ehrlich	35

Figura 21. Prueba de NaOH: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.....	35
Figura 22. Reacción de la prueba de NaOH	35
Figura 23. Prueba de Shinoda: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.....	36
Figura 24. Reacción de la prueba de Shinoda (Daniela, 2014, pág. 18).....	37
Figura 25. Prueba de Salkowski: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.....	37
Figura 26. Reacción de la prueba de Salkowski para esteroides (Daniela, 2014, pág. 19).	38
Figura 27. Prueba de Liebermann-Burchard: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.....	39
Figura 28. Reacción de la prueba de Lieberman-Burchard para esteroides y terpenoides (Daniela, 2014, pág. 19).....	40
Figura 29. Prueba de Legal: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.....	40
Figura 30. Reacción de la prueba de Legal.....	35
Figura 31. Cromatografía de columna del extracto hexánico: a) fase móvil: hexano, b) fase móvil: hexano-cloroformo 2:8, c) fase móvil: hexano-cloroformo 1:1.....	43
Figura 32. Rota-evaporación de las fracciones obtenidas en la cromatografía de columna del extracto hexánico.	44
Figura 33. Cromatoplaqueta de las fracciones de la 4 a 8 revelada con vainillina-H ₂ SO ₄ . fase móvil hexano cloroformo (9:1).....	45
Figura 34. Cromatoplaqueta de las fracciones 10 y 11 revelada con: a) Lámpara Uv a 365 nm., b) vainillina-H ₂ SO ₄ . Fase móvil hexano-cloroformo (1:1).....	45
Figura 35. Cromatoplaqueta de las fracciones de la 12 a 15 revelada con: a) Lámpara Uv a 365 nm., b) vainillina-H ₂ SO ₄ . Fase móvil cloroformo.	46
Figura 36. Cromatoplaqueta de las fracciones de la V-1 a V-6 revelada con Lámpara Uv a 302 nm. Fase móvil hexano-cloroformo (1:1).....	47

Figura 37. Cromatografía de capa fina preparativa del producto obtenido.	48
Figura 38. Espectro Uv-Vis de la franja azul purificada por Cromatografía en capa fina preparativa.	49
Figura 39. Espectro Uv-Vis de la 7-hidroxi isoflavona (Mabry, Markham, & M, 2012, págs. 169-173).	50
Figura 40. Espectro IR de la muestra purificada.	53
Figura 41. Estructura química de la 7- hidroxi isoflavona (Mabry, Markham, & M, 2012, págs. 169-173).	53
Figura 42. Perfil espectroscópico de la 7- hidroxi isoflavona (Mabry, Markham, & M, 2012, págs. 169-173).	54

Resumen

La familia Begoniaceae, es una rama taxonómica que comprende aproximadamente 2000 especies vegetales pertenecientes en su mayoría al género *Begonia*. Dentro de la medicina tradicional se han reportado plantas de esta familia con propiedades curativas, entre ellas, se encuentra su uso para la regulación de los niveles de glucosa en sangre de pacientes que padecen tanto hipo como hiperglucemia, previniendo posibles daños, los cuales a largo plazo pueden generar una nefropatía diabética. La especie *Begonia erythrophylla* es usada tradicionalmente para tratar problemas de deficiencia renal, no obstante, la falta de suficiente información científica sobre las sustancias químicas producidas por esta planta no ha permitido establecer cuáles son aquellas que participan en el tratamiento de enfermedades nefro-diabéticas. Este trabajo de investigación describe el tamizaje fitoquímico preliminar de la especie vegetal *Begonia erythrophylla*, con el objetivo de identificar los metabolitos secundarios presentes en esta planta. Inicialmente se realizó la colecta de las partes aéreas (hojas y tallos), el secado y el pulverizado del material vegetal, subsecuentemente, a partir de tres disolventes de diferente polaridad se prepararon los extractos vegetales, los cuales fueron sometidos a diferentes pruebas fitoquímicas y por cromatografía en capa fina para identificar los metabolitos secundarios presentes; de este proceso se logró determinar la presencia de flavonoides, terpenos, esteroides y sesquiterpenlactonas. Al término de los ensayos, se realizó la purificación de algunos compuestos a través de la técnica de cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina preparativa. Un compuesto, fue identificado mediante las técnicas de espectroscopía UV y IR, punto de fusión y factor de retención (Rf) como un flavonoide del tipo isoflavona.

Palabras Clave

Begonia erythrophylla, Tamizaje fitoquímico, Metabolitos secundarios.

Abstract

The family Begoniaceae, is a taxonomic branch that includes approximately 2000 vegetable species belonging mostly to the genus *Begonia*. Within the traditional medicine plants of this family have been reported with healing properties, among them, its use is found for the regulation of blood glucose levels of patients suffering from both hypo and hyperglycemia, preventing possible damage, which in the long term can generate a diabetic nephropathy. The species *Begonia erythrophylla* is traditionally used to treat kidney problems, however, the lack of sufficient scientific information on the chemical substances produced by this plant has not allowed to establish which are those that participate in the treatment of nephrodiabetic diseases. This research paper describes the preliminary phytochemical screening of the plant species *Begonia erythrophylla*, with the aim of identifying the secondary metabolites present in this plant. Initially, the collection of the aerial parts (leaves and stems), the drying and pulverization of the vegetal material was carried out, subsequently, from three solvents of different polarity, the vegetal extracts were prepared, which were subjected to different phytochemical tests and by thin layer chromatography to identify the secondary metabolites present; From this process, the presence of flavonoids, terpenes, sterols and sesquiterpenectones was determined. At the end of the tests, the purification of some compounds was carried out through the technique of column chromatography and preparative thin layer chromatography. One compound was identified by Uv and IR spectroscopy techniques, melting point and retention factor (Rf) as a possible flavonoid, like an isoflavone.

Key words

Begonia erythrophylla, Phytochemical screening, Secondary metabolites.

1. Introducción

A medida de los años se han venido aislando e identificando una gran cantidad de compuestos químicos diversos en organismos vivos, tales como plantas, hongos, bacterias y animales, los cuales han sido los responsables de las propiedades terapéuticas de esas especies como medicinales. En virtud del avance que da la química médica, los recursos naturales se han convertido en una alternativa para tratar enfermedades por medio de la medicina tradicional. En la actualidad, pese al increíble desarrollo de la química farmacéutica, muchos fármacos derivados de plantas siguen teniendo una posición preponderante en la investigación, descubrimiento y desarrollo de medicamentos, Hostettmann y otros, citados por (Martinez Gonzalez, 2014, pág. 20.)

El conocimiento que se puede obtener de las especies medicinales para usos terapéuticos dentro de la sociedad está relacionado con aspectos culturales, motivo por el cual, las personas desconocen la acción de las sustancias químicas en el tratamiento y prevención de las enfermedades. Específicamente, los compuestos químicos que se obtienen de las plantas consisten en un depósito valioso de moléculas orgánicas, siendo la farmacognosia, fitoquímica y la fitoterapia, las disciplinas que se encargan de investigar la relación química entre esas moléculas con su mecanismo de acción.

Los problemas de salud relacionados a las deficiencias en los organismos vivos, ha llevado a la población a la búsqueda de medicamentos sintéticos, sin embargo, debido a los altos costos en el mercado, ha hecho que un gran porcentaje de individuos en la sociedad busquen como alternativa la medicina tradicional. Razón por la cual se hace necesario llevar a cabo estudios químicos y farmacológicos para el control de calidad de las especies empleadas.

La familia *Begoniaceae* compuesta en su mayoría por plantas del género *Begonia*, posee dentro de sus características quimiotaxonómicas principales la presencia de flavonoides, saponinas, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, entre otros (Pandikumar, Prakash Babu, & Ignacimuthu, 2009, pág. 3).

Se ha encontrado en este tipo de moléculas una ayuda para tratar los problemas de personas con dificultades de salud, dada la interacción favorable que desarrollan estos metabolitos secundarios directamente en aquellos procesos biológicos realizados por el organismo. En virtud de ello, especies vegetales del género *Begonia* han sido reportadas con suficiente información científica, como una solución a problemas de faringitis, fiebre, diarrea, paludismo e infecciones microbianas (Martinez Gonzalez, 2014).

Por otro lado, la planta *Begonia erythrophylla* es empleada tradicionalmente para tratar enfermedades de deficiencia renal, no obstante, esta planta no presenta suficiente información científica que corrobore su potencial medicinal, por tal razón, para adquirir nuevos conocimientos de esta especie, se llevó a cabo un análisis fitoquímico preliminar, con el cual se purificó e identificó la naturaleza química de un compuesto mayoritario, a partir de técnicas de cromatografía y espectroscopia de Uv e IR.

2. Objetivos

2.1. General

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal *Begonia erythrophylla* mediante el tamizaje fitoquímico preliminar y por la técnica de cromatografía en capa fina.

2.2. Específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas y tallos de la especie vegetal *Begonia erythrophylla* mediante pruebas cualitativas.
- Confirmar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos mediante la técnica de cromatografía en capa fina
- Purificar algunos compuestos mayoritarios de la especie vegetal *Begonia erythrophylla* mediante cromatografía de columna y cromatografía en capa fina preparativa.
- Establecer la identidad química de uno de los compuestos mayoritarios mediante técnicas espectroscópicas de ultravioleta-visible e infrarrojo.

3. Planteamiento del Problema

En la actualidad, el uso tradicional de diferentes especies vegetales para tratar una variedad de enfermedades ha ido en aumento de manera progresiva, generando así, una alternativa en lugar del uso de medicamentos sintéticos, los cuales a la larga generan efectos secundarios en el organismo. La investigación científica relacionada al descubrimiento de principios activos de fuentes naturales ha permitido el descubrimiento de medicamentos de origen natural. Las personas que hacen uso de la medicina tradicional, mantienen su costumbre de usar las plantas por los beneficios que han experimentado durante los procesos terapéuticos, sin embargo, son muchos los individuos que desconocen en la mayoría de los casos, tanto la forma en que se deben preparar y suministrar las drogas, las drogas crudas y los extractos como las dosis y los principios activos que intervienen a nivel molecular. La especie *Begonia erythrophylla* es usada en el departamento del Huila para regular los niveles de glucosa en la sangre, no obstante, es poco el conocimiento científico que tiene la población, en cuanto al uso de esta especie medicinal y sumado a los pocos los reportes científicos relacionados con la composición química de esta planta.

En este orden de ideas, se plantea la siguiente pregunta-problema:

¿Cuáles son los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos de las partes aéreas (hojas y tallos) de la especie vegetal *Begonia erythrophylla*?

4. Justificación

El Huila es un departamento con variedad de ecosistemas que se localizan entre otras en áreas protegidas, como parques naturales importantes para el sostenimiento de la vida ecológica. En virtud de ello, esta región presenta una gran diversidad de flora y fauna, cuya composición es desconocida por la población. Dentro de la vasta vegetación de este departamento se encuentra distribuida la familia Begoniaceae representada por plantas del género *Begonia*; aunque no se cuente con una sistematización documentada de las variedades de begonias que se encuentran en el departamento del Huila específicamente en el municipio de Neiva; es de esperar que en esta zona geográfica se distribuyan especies en un rango altitudinal no mayor a 422 m de altitud.

Del género begonia, 82 especies son reconocidas por el catálogo de plantas y líquenes de Colombia (Bernal, Gradstein, & Celis, 2015), de estas, 16 especies vegetales crecen a altitudes iguales o menores a 420 m de altitud, donde el territorio de Neiva se encuentra localizado (Véase Tabla 1).

Tabla 1. Especies de Begonias que habitan en rangos altitudinales iguales o menores a 420 m.s.n.m

Nombre de la especie	Rango Altitudinal (m.s.n.m)
<i>Begonia cardiocarpa</i>	130
<i>Begonia cuatrecasana</i>	250-2100
<i>Begonia fischeri</i>	30-2700
<i>Begonia glabra</i>	0-1930
<i>Begonia guadensis</i>	70-1820
<i>Begonia hirsuta</i>	0-250
<i>Begonia hirtella</i>	50-1280
<i>Begonia lindleyana</i>	50-1200
<i>Begonia lutea</i>	250-500
<i>Begonia meridensis</i>	300-1500

...Continuación de la Tabla 1.

Nombre de la especie	Rango Altitudinal (m.s.n.m)
Begonia minor	100-2000
Begonia nelumbiiifolia	100-400
Begonia oliveri	150-1800
Begonia rex putz	100-2000
Begonia rosmanniae	100-1200
Begonia semiovata	0-900
Begonia sericoneura	300-2100

En la actualidad, se ha descubierto que las Begoniaceas están siendo usadas por un sinnúmero de personas con fines medicinales. Sus propiedades medicinales se deben a la actividad de los flavonoides, taninos, saponinas, entre otros. Estos metabolitos secundarios pueden intervenir directamente en los procesos metabólicos, con el fin de atenuar deficiencias presentes en nuestro organismo a nivel celular. De este modo se estima que con el uso de las plantas medicinales es posible prevenir y evitar enfermedades derivadas de la diabetes, encontrando entre ellas la nefropatía diabética y la hipertensión arterial. El deficiente funcionamiento del páncreas deriva en una deficiencia hormonal principalmente del transportador de glucosa en la sangre, dando como resultado daños severos al organismo, esto en virtud de la formación de los productos finales de glicosilación avanzada (AGE). Este proceso no se da a expensas de catalizadores enzimáticos y los principales anfitriones son los grupos nucleofílicos de algunos carbohidratos, los cuales atacan sin lugar a duda los grupos aminados de las proteínas funcionales y estructurales del cuerpo humano, dando paso a productos glicosilados y así causando modificaciones que limitan la actividad proteica de estas (Méndez, 2003, pág. 4).

De acuerdo con ciertos conocimientos tradicionales de algunas personas del municipio de Neiva, la especie *Begonia erythrophylla* tiene funcionalidad como una planta medicinal capaz de mitigar padecimientos de ciertas enfermedades crónicas, en diferentes órganos vitales. No obstante, la poca información bibliográfica que se tiene

sobre la quimiotaxonomía de esta especie no permite dar una explicación clara de los compuestos responsables de esta actividad medicinal. Por tal razón, se plantea la siguiente propuesta de investigación, que consiste en la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal *Begonia erythrophylla* llamada comúnmente "Begonia riñón" mediante el tamizaje fitoquímico preliminar y la cromatografía en capa fina. El aislamiento de algunos compuestos mayoritarios por métodos cromatográficos convencionales, como la cromatografía de columna y de capa fina preparativa y la identificación de uno de los compuestos mayoritarios por espectroscopia de ultravioleta-visible e infrarroja ha permitido establecer uno de los tipos de moléculas que componen químicamente a la especie. De esta forma, este proyecto contribuye a nivel nacional y regional con conocimientos esenciales de la química de esta planta, con los cuales se pueda dar una idea clara del posible principio activo responsable del tratamiento contra la diabetes. Por otro lado, la información recolectada con este proyecto es de utilidad para la edificación de futuros proyectos en el grupo de investigación o para posibles estudios orientados a la actividad biológica de la *Begonia erythrophylla*.

5. Marco Teórico

5.1 La familia Begoniaceae

La familia *Begoniaceae* está constituida por plantas principalmente herbáceas, que se caracterizan por ser trepadoras, robustas y arbustivas. El género *Begonia* es el que posee el mayor número de especies de esta familia (Ver Figura 1.). Se estima un número de 400 especies en Colombia, de las cuales, 82 especies son reconocidas y descritas en el catálogo de plantas y líquenes de Colombia (Bernal, Gradstein, & Celis, 2015). Su hábitat se ubica principalmente en los trópicos y neotrópicos, con mayor presencia en la región norte de Sudamérica. Las plantas pertenecientes a la familia *Begoniaceae* carecen de nectarios, razón por la cual deben expresar una forma diferente de atraer los polinizadores, esta forma se da por medio de los colores llamativos de sus estigmas, son ellos los que hacen que se acerquen a ella llevando o depositando consigo los granos de polen que aseguran la perpetuación de la especie.

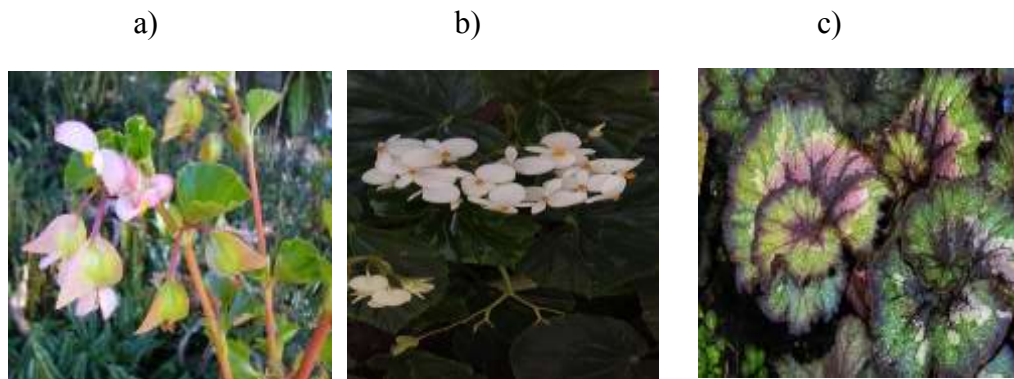


Figura 1. Algunos ejemplares de la familia Begoniaceae: a) *Begonia cucullata*, b) *Begonia nelumbiifolia*, c) *Begonia rex* Putz. (Neotropical Flora).

5.2 El género *Begonia*

El género *Begonia* es uno de los más grandes que existe dentro de las angiospermas, en virtud de las 600 especies que fueron descritas en regiones neotropicales que abarcan países como México y todos aquellos que se encuentran en la región sur de Sudamérica en los años 80 (E & Marin Ojeda, 2006, págs. 62-77). Las características morfológicas de este género son: hojas grandes enteras o lobadas, simétricas o, por lo general asimétricas, con venación palmeada o también de forma simpodial casi siempre con indumento tomentoso, colores morados para su envés y verde para su haz y con tallos herbáceos o rizomas (E & Marin Ojeda, 2006, págs. 62-77). Su parte reproductiva presenta un perianto con pétalos y sépalos indiferenciados y llamativos (Perez Abelaez, 1990, págs. 215-216). Su expresión sexual es de tipo monoica, es decir tienen flores de ambos sexos, pero por separado no en una misma flor. Sus flores femeninas están conformadas de 2 a 3 pares de envolturas florales que conforma su cáliz y corola, estigmas de colores llamativos; con un ovario alado formado de 3-6 carpelos fusionados (sincárpico) de placentación axilar, con una posición ínfera raramente semiínfera y en su parte interior exhibe entre 3 y 6 lóculos con abundantes óvulos. Por otro lado, sus flores masculinas presentan 4 o más estambres libres, soldados al receptáculo; adicionalmente expresa dos envolturas florales externas que usa como cáliz y dos más en su parte interna como corola, estas envolturas comúnmente son de colores muy llamativos. En el momento que se da la fecundación, la flor da paso a la formación de una capsula (fruto) trivalda, la cual en su interior guarda cantidades incontables de diminutas semillas (Freire Fierro, 2004).

Según (Perez Abelaez, 1990, págs. 215-216) en Colombia existen 6 especies importantes del género *Begonia* entre las cuales tenemos: *Begonia bolivenxis*, *Begonia Rex Putsey*, *Begonia heracleifolia*, *Begonia incana* Lind, *Begonia cucullata* Willd y *Begoniella Whitei* Oliver. El uso predilecto que se le ha otorgado a estas plantas es ornamental dado las magníficas formas que adquieren sus inflorescencias en forma de panícula, tirso entre otros, no obstante, con el pasar de los años se ha infundido el uso etnomedicinal del género *Begonia*, lo que ha dado una solución alternativa a algunos

problemas de salud que tienen aquellas personas que la consumen de diferentes modos y totalmente artesanales, estableciendo así a el género *Begonia* como plantas medicinales; Toda la información de plantas medicinales dentro de la población comúnmente está relacionada con conocimientos culturales, razón por la cual, el conocimiento científico (fitoterapéutico) de muchas plantas medicinales es deficiente.

La información fitoterapéutica que se tiene de todas las especies de *Begonia* en Colombia es escasa, sin embargo, en otros países donde se tiene presencia de plantas pertenecientes a este género, se han reportado usos medicinales con un soporte fitoterapéutico. Tal es el caso, de las especies relacionadas a continuación: *Begonia alnifolia*, *Begonia cucullata*, *Begonia guaduensis*, *Begonia multinerva*, *Begonia semiovat*, *Begonia strigillosa*, *Begonia glabra*, las cuales son usadas por su poder para tratar problemas como faringitis, fiebre, diarrea, paludismo, infecciones, antimicrobianas, entre otros. La mayoría de estas especies no presentan demasiadas evidencias documentadas a nivel tecnológico, científico y etnobotánico, a excepción, de la especie *Begonia cucullata*, la cual si ostenta suficientes conocimientos de esta índole para certificar sus efectos favorables en enfermedades respiratorias; tal como lo plantea Martinez Gonzalez, 2014 en su tesis “usos más prominentes de las plantas medicinales de Panamá”. Otros reportes a nivel científico revelan que, la *Begonia Malabárica* ha demostrado tener un efecto anti-hiperglucemiante y anti-hipoglucemiante, dada su capacidad para controlar los niveles de glucosa en plasma de organismos vivos sin problemas de diabetes y en otros con diabetes inducida por estreptozotocina (principio activo que actúa directamente sobre las células beta que se encuentran en los islotes del páncreas) (Pandikumar, Prakash Babu, & Ignacimuthu, 2009, pág. 5).

5.3 La especie *Begonia erythrophylla*

Dentro de todas las especies del género *Begonia* se encuentra la planta *Begonia erythrophylla*, una planta herbácea nativa de humedales tropicales del sudeste asiático, sudamérica y partes de la india (Ver Figuras 2 y 3). Dentro de sus características

taxonómicas se destacan sus tallos carnosos, hojas acorazonadas con indumento tomentoso y colores verdes en su haz y granate en su envés, rizomas con numerosos brotes de futuros tallos. La especie *Begonia erythrophylla* posee el poder de multiplicarse naturalmente por semillas o producción de nuevos rizomas o tubérculos (Burrit & Leung, 1996, págs. 557-567).



Figura 2. Especie vegetal *Begonia erythrophylla*.



Figura 3. Flor de la especie vegetal *Begonia erythrophylla*.

5.4 Metabolitos secundarios identificados en el género *Begonia*

Los metabolitos secundarios que se han identificado en especies del género *Begonia* y los cuales son los responsables de las actividades terapéuticas son: terpenos, esteroides, carbohidratos, taninos, ácidos carboxílicos, saponinas, alcaloides, compuestos fenólicos, y flavonoides (Pandikumar, Prakash Babu, & Ignacimuthu, 2009, pág. 3). Todas estas moléculas orgánicas se sintetizan a expensas de un elemento principal como el carbono, motivo por el cual las plantas destinan una gran cantidad de este elemento y energía a la síntesis de estas moléculas orgánicas o metabolitos secundarios, cuya función en las plantas, no está bien definida, ya que no poseen una representación directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, transporte, asimilación de nutrientes; (estos poseen diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8.000 compuestos distintos).

Los metabolitos secundarios además presentan una distribución restringida en el reino vegetal, animal, y fungí, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de organismos vivos. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a una determinada familia, género o incluso a algunas especies de organismos (Ávalos García & Pérez Urria, 2009).

5.4.1 *Los terpenos y esteroides.*

En la biosíntesis de metabolitos secundarios, se encuentran los terpenoides, como moléculas derivadas de la ruta del ácido mevalónico, conformados por unidades de isopreno, los cuales por unión cabeza-cola dan paso a otras representaciones de terpenoides como: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}) y triterpenos (C_{30}). La ruta para la formación de estas moléculas se da a partir de la transformación del ácido mevalónico en pirofosfato de isopentilo, a su vez la unión de un isopentilo con otro idéntico da paso a la formación de un compuesto de 10 carbonos (monoterpeno) (Ver Figura 4.). Si en el proceso continua la ciclación con

unidades de isopentilos evocara en la formación de los diversos compuestos policíclicos puntualizados, anteriormente. Por otro lado, si aquellos compuestos policíclicos experimentan eliminación de grupos metilos originaran compuestos de naturaleza esteroidal (Domínguez, 1973, pág. 53).

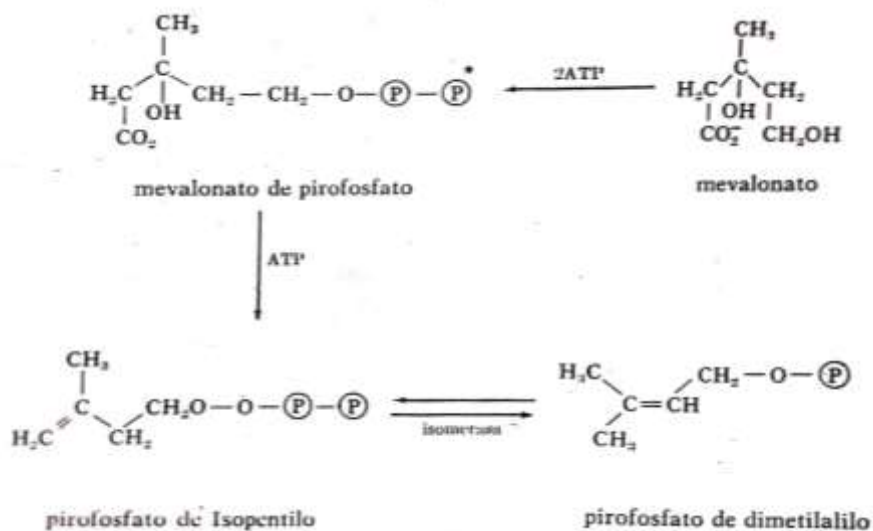


Figura 4. Biosíntesis del pirofosfato de isopentilo (Domínguez, 1973, pág. 52).

Dentro de los compuestos esteroidales se destacan los cardiotónicos, triterpenos, saponinas y esteroides. Estos compuestos, se caracterizan principalmente por ser hidrocarburos policíclicos que tiene como base estructural al ciclopanoperhidrofenantreno. Las destacadas diferencias que existen entre uno y otros es la cantidad de átomos de carbonos que los conforman y algunos grupos funcionales que se encuentran como sustituyentes. En el caso de los esteroides, se distinguen por la unión de 27 a 29 átomos de carbonos y un grupo hidroxilo adyacente al C₃, tal como sucede con el ergosterol (Ver Figura 5.). Es importante resaltar que existen diferentes tipos de esteroides de acuerdo con la inserción de los sustituyentes en sus anillos (Domínguez, 1973, pág. 139).

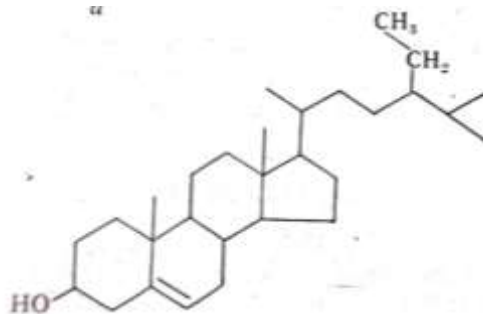


Figura 5. Base estructural del ergosterol (Domínguez, 1973, pág. 140) .

Existe un grupo de compuestos conocidos como sesquiterpenlactonas, que poseen una similitud estructural con los terpenos, siendo su única diferencia la aparición de un anillo de metilbutenólido en una parte de su esqueleto; la otra parte de su estructura química está conformada por dos anillos C_6 y C_4 y, por lo general tres grupos CH_3 como sustituyentes. 15 átomos de carbono constituyen las estructuras de las lactonas sesquiterpénicas, tal como se muestra en la Figura 6, para la molécula del eudesmanólido.

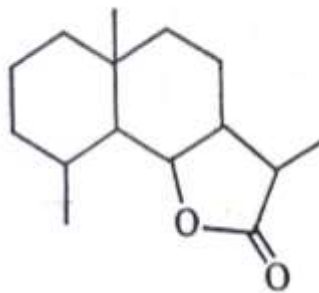


Figura 6. Base estructural del eudesmanólido (Domínguez, 1973, pág. 93).

5.4.2 Las saponinas.

Las saponinas son especies químicas que suelen encontrarse en plantas monocotiledóneas (Ver Figura 7.). Este tipo de metabolitos presentan una gran variedad en cuanto a actividades biológicas, ya que, los esteroides sintéticos son creados a partir

de las saponinas. De acuerdo a (Domínguez, 1973, págs. 150-152), la actividad biológica observada en las saponinas depende de la distribución de los grupos funcionales alrededor del anillo esteroidal y de su estereoquímica. Por tal razón es la materia prima esteroidal más utilizada en la producción de hormonas sintéticas. Además de progesterona, también se puede extraer otras hormonas como testosterona o corticoides.

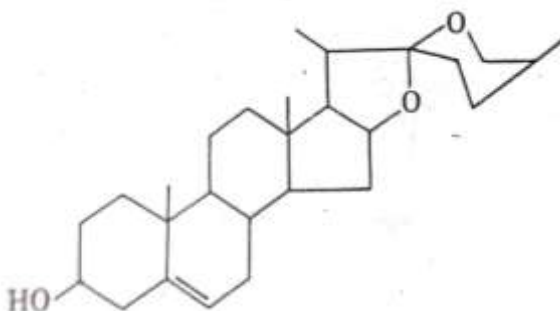


Figura 7. Estructura de la saponina (Domínguez, 1973, pág. 150).

5.4.3 Los flavonoides.

Los flavonoides generalmente presentan un azúcar unido por medio de un enlace glucosídico a la genina o aglicona. Estas geninas, le otorgan un centro activo a los flavonoides las cuales presentan grupos OH o CH₃O sustituyendo sus carbonos 3, 7, 5,4, etc. (Ver Figura 8.). El enlace entre el azúcar y la aglicona se puede hidrolizar con facilidad en presencia de ácidos fuertes generando los respectivos azúcares y las geninas, como: hesperetina, apigenina, etc. La conjugación de los dobles enlaces en la porción aromática de los flavonoides permite la tautomería formándose los flavonoles y flavonas de color amarillo, las hidroflavonas incoloras que no absorben la luz con la misma longitud de onda a las anteriores.

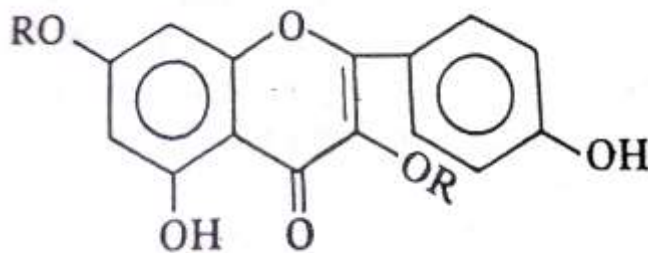


Figura8. Estructura química de los flavonoides (Domínguez, 1973, pág. 83).

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en las extremidades de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Ellos son compuestos con una actividad farmacológica amplia, donde se ha demostrado que gracias a la presencia de la conjugación de sus dobles enlaces y su diversidad estructural ayudan como antioxidantes en procesos biológicos, además de poder anclarse a enzimas y causar la inhibición de su actividad, entre estas tenemos xantina oxidasa, glucosa-6-fosfatasa, hexoquinasa, fosfolipasa, 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa etc. Razón por la cual, son eficaces como hipoglucemiante y antihipertensiva. Otras actividades están relacionadas, por la capacidad para formar quelatos con iones metálicos transitorios tales Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} .

Los flavonoides también participan en el transporte de hormonas donde logran anclarse a estos haciendo que no haya problemas en su desplazamiento sin pérdida del nivel hormonal y así estableciendo una reserva de hormonas en la sangre. (Gonzalez Sánchez, Cabañas Wuan, Arana Argáez, Hernandez Nuñez, & Ortiz Andrade, 2011).

5.5 Espectroscopia infrarroja

La radiación infrarroja incidente sobre una muestra puede causar modificaciones en los estados vibracionales en las moléculas que la conforman. La capacidad de absorción de radiación de una muestra indica el tipo de grupos funcionales y enlaces

presentes. Desde la perspectiva instrumental y sus aplicaciones, es adecuado seccionar la región infrarroja en tres regiones, tales como: El infrarrojo cercano (NIR), Infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR).

Una gran mayoría de aplicaciones analíticas clásicas pertenecientes a este tipo de espectroscopia, se encuentran basadas en el uso de los infrarrojos cercano y medio ($4000-600\text{ cm}^{-1}$), debido a que brinda la posibilidad de transformar esta técnica a una técnica cuantitativa.

Por medio de la técnica de transformada de Fourier, es posible, mediante una operación matemática, cambiar un espectro en dominio de tiempo a otro en dominio de frecuencia, gracias a ello se puede adquirir espectros de manera precisa, eficiente y con las relaciones Señal/Ruido (S/N). Los espectros IR se pueden obtener empleando técnicas de medida como: Transmisión, Reflexión y modo ATR (Universidad de Alicante, 2017).

5.6 Espectroscopía ultravioleta visible

El principio de este tipo de espectroscopía se encuentra basado en el proceso de absorción de radiación UV/VIS (radiación con longitud de onda entre 160 y 780 nm) que presenta una molécula. Esta absorción de radiación provoca la excitación de un electrón. Los electrones excitados por la absorción de radiación de esta frecuencia corresponden a los electrones de enlace presentes en las moléculas y a partir de esto es posible asociar los picos de absorción con los diferentes tipos de enlace que presenta el compuesto. Gracias a la espectroscopía UV/VIS se pueden identificar los grupos funcionales contenidos en una molécula. Las bandas que se aprecian en un espectro UV/VIS son anchas a causa de la superposición de transiciones electrónicas y vibracionales (Universidad de Alicante, 2017).

6. Antecedentes

Tabla 2. Estado actual del conocimiento fitoterapéutico del Genero Begonia.

Titulo	Autores y año	Objetivos	Principales resultados	Aportes del trabajo a anteproyecto
Efecto hipoglucémico y antihiper-glucémico de <i>Begonia malabarica</i> Lam	(Pandikumar, Prakash Babu, & Ignacimuthu, 2009)	Determinar el efecto anti-hiperglucemiante y anti-hipoglucemiante que expresan los extractos con hexano, metanol y etilacetato en ratas normales y diabéticas inducidas	Los extractos estudiados dieron positivo para presencia de terpenoides, esteroides y carbohidratos, continuamente se realizaron pruebas para la identificación de antocianinas con ácido clorhídrico. Al cabo de llevar las aplicaciones de los extractos en ratas normales se observó que a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg la reducción de glucosa en el plasma era buena, pero la mayor eficiencia se dio a 200 mg/kg para ratas normales. Los niveles de insulina y glucógeno hepático aumentaron significativamente; razón por la cual el estudio sugiere que la reducción de los niveles de glucosa se debe a la estimulación en la producción de insulina que tiene lugar en las células Beta del páncreas; por otro lado, la reabsorción de glucosa en el túbulo contorneado proximal, es un incremento adicional de glucosa al cuerpo lo que causa un aumento en el almacenamiento de glucógeno intra renal generando la glicosilación de la membrana basal del riñón, afectando el colágeno de estos.	La actividad biológica de la especie vegetal <i>Begonia malabarica</i> para regular los niveles de glucosa en plasma, aporta conocimientos importantes para reconocer la actividad metabólica en la que intervienen sus metabolitos para prevenir daños a las proteínas estructurales de los tejidos, disminuyendo así la glicosilación que se da a expensas de los altos niveles de azúcar en la sangre y, evitando la generación de enfermedades crónicas como la nefropatía diabética.

... Continuación de la tabla 2.

Titulo	Autores y año	Objetivos	Principales resultados	Aportes al Anteproyecto
Plantas medicinales nativas de Panamá y su potencial para el tratamiento de las patologías de mayor impacto	(Martinez Gonzalez, 2014)	Evaluar el estado actual del conocimiento de las plantas medicinales nativas de la República de Panamá y su posible contribución para la atención de las patologías prevalentes en el país.	Dentro del amplio espectro de familias vegetales de panamá que se evaluaron, se encontraron 7 especies de <i>Begonia</i> , en las cuales se encontró una documentación acerca de su eficiencia para tratar problemas como faringitis, fiebre, diarrea, paludismo, infecciones antimicrobianas entre otros, pero, dada la suficiencia de conocimientos tradicionales, científicos y tecnológicos documentados de estas especies vegetales solo se logró demostrar que la <i>Begonia cucullata</i> presenta actividad beneficiosa para tratar enfermedades respiratorias.	Los principales usos medicinales que se le han otorgado a algunas especies de <i>Begonia</i> , sirven de información vital dado que me permite conocer cuán grande es el espectro farmacológico que ostenta el género <i>Begonia</i> , fundamentado en la suficiencia de conocimientos científicos, etnobotánicos y culturales.
Determinación de la concentración letal media en <i>artemia salina</i> de diez extractos hidroetanolicos de especies de plantas de Zamora Chinchipe	(Cruz Erazo & Morocho Yaguana, 2013)	Investigar la composición fitoquímica y toxicidad de las plantas de uso medicinal en la Región Sur del Ecuador, las cuales son usadas frecuentemente por sanadores de las etnias Shuar y Saraguro para tratar infecciones	Dentro los 10 extractos vegetales a los cuales se les realizo la prueba de <i>Artemia salina</i> se encontro1 extracto de <i>Begonia fischeri Schrank</i> . De ella se tomaron sus flores y hojas para preparar el extracto, el cual fue moderadamente toxico para el camarón de salmuera; dentro el tamizaje fitoquímico realizado por el método de Schabra, se encontró que los metabolitos secundarios presentes eran triterpenos, esteroides, flavonoides, lactonas, cumarinas, saponinas, fenoles, azucars reductores, aminos y aminoácidos	La amplia presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, triterpenos, saponinas entre otros; los cuales pueden repercutir de forma favorable en actividades metabólicas que aporta una idea fundamental acerca de los principales metabolitos presentes en el género <i>Begonia</i>

7. Metodología

El siguiente proyecto de investigación, pertenece a la línea de investigación de Saberes Disciplinarios aprobada por la Facultad de Educación de la Universidad Surcolombiana, se basa en el enfoque mixto de la investigación científica, es decir, además del enfoque cualitativo, a través del cual busca aislar e identificar los metabolitos secundarios de la especie vegetal objeto de estudio, requiere el apoyo del enfoque cuantitativo. Esta doble perspectiva metodológica se deriva de un lado, de la postura de (Giroux & Tremblay, 2004, pág. 39), al enunciar que “el enfoque cualitativo aborda el estudio de los fenómenos de la realidad, haciendo hincapié en la comprensión”, es decir en la composición de metabolitos secundarios. Por igual “se recolectan datos sin medición numérica para tratar de responder una pregunta de investigación” (Hernández, Fernández, & Baptista, 2006, págs. 7,8)

También posee una perspectiva cuantitativa, en tanto que requiere un diseño experimental para manipular el objeto de estudio y de esa manera obtener la composición química buscada, en consonancia con (Hernández, Fernández, & Baptista, 2006, pág. 159), cuando plantean que el diseño experimental es “un plan o estrategia para obtener la información deseada, requiriéndola manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados”.

7.1 Fase de campo

Inicialmente, la muestra de la especie vegetal *Begonia erythrophylla* fue recolectada en las instalaciones del vivero "Palmas y Palmas" ubicado a las afueras de la ciudad de Neiva, en el kilómetro 2, vía hacia el corregimiento del Caguán.

7.2 Fase de laboratorio

En el laboratorio las muestras vegetales fueron organizadas sobre papel periódico con el fin de iniciar el proceso de secado, el cual se realizó en dos secciones. La primera sección, se realizó por secado natural y a la sombra, durante 3 días. La segunda sección, se realizó por secado artificial, empleándose un horno a 40°C, durante 4 días (Ver Figuras 9 y 10).



Figura 9. Secado de manera natural del material vegetal.



Figura 10. Proceso de secado artificial del material vegetal.

Posteriormente, el material vegetal seco se cortó de manera manual y luego se pulverizó por medio de una trituradora de cuchilla doble. El material vegetal de mayor contextura se procesó por un mayor tiempo (Ver Figura 11.).



Figura 11. Proceso de pulverización de la muestra seca de *Begonia erythrophylla*.

El material vegetal pulverizado (57.88 g) fue disuelto en hexano, y macerado durante 5 días, luego, la muestra se filtró y el disolvente se eliminó mediante rotaevaporación. Este procedimiento se repitió con cloroformo y metanol a partir del material vegetal inicial (Ver Figura 12.).

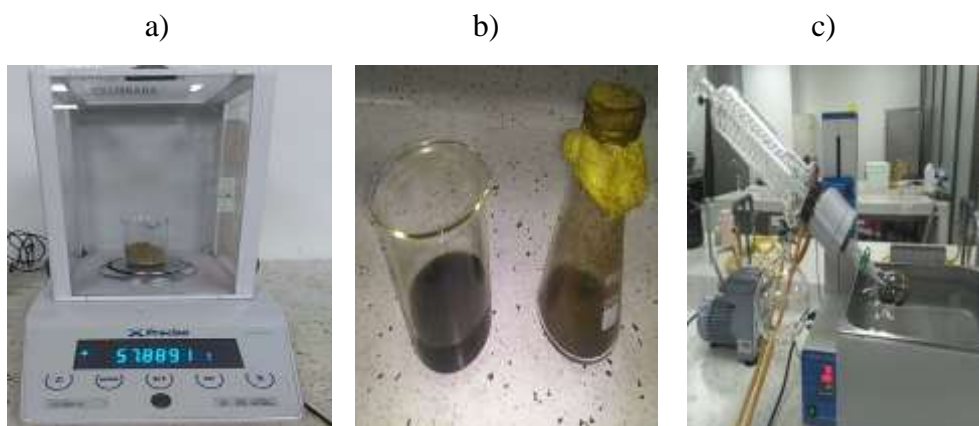


Figura 12. Preparación de los extractos vegetales: a) Masa del material vegetal pulverizado, b) Proceso de filtración de los extractos, c) Proceso de rota-evaporación de los extractos vegetales.

Los tres extractos, clorofórmico, hexánico y metanólico, se almacenaron en pequeños recipientes de vidrio rotulados. Los extractos se dejaron reposar durante una semana para que los solventes se terminaran de evaporar, al final se obtuvo una pasta

densa de cada uno de ellos, a excepción del extracto metanólico que permaneció en estado líquido.

7.3 Tamizaje fitoquímico preliminar para la identificación de metabolitos secundarios

7.3.1 Pruebas para cumarinas.

Prueba de Ehrlich. El reactivo se preparó disolviendo una solución de p-dimetil-amino-benzaldehído al 5% en etanol con HCl. La prueba es positiva si al adicionar el reactivo en el extracto se presenta una coloración naranja (Domínguez, 1973, pág. 113).

Prueba de Hidróxido de Sodio. Para esta prueba, se adicionó una solución de NaOH al 10 % a una alícuota del extracto vegetal; la prueba es positiva si aparece una coloración amarilla, que al acidular la solución desaparece (Domínguez, 1973, pág. 113).

7.3.2 Pruebas para flavonoides.

Prueba de Shinoda. Para su respectiva identificación, se extrajo una cantidad del extracto total, posteriormente se agregaron 0.5 g de magnesio y se añadieron HCl gota a gota, hasta la aparición de una coloración rojiza, la cual indicaba prueba positiva para este tipo de metabolitos (Domínguez, 1973, pág. 84).

7.3.3 Pruebas para compuestos esteroidales.

Prueba de Salkowski. Se tomó una pequeña cantidad del extracto vegetal y se le adicionó una pequeña cantidad de cloroformo, subsecuentemente se aciduló con H₂SO₄;

la prueba se considera positiva si se presenta coloraciones amarillas o rojas (Domínguez, 1973, pág. 84).

Prueba de Liebermann-Burchard. Se tomó una pequeña cantidad del extracto vegetal y se le adicionó una pequeña cantidad de anhídrido acético y cloroformo, subsecuentemente se aciduló con H_2SO_4 ; la prueba se considera positiva si se presentan coloraciones verdes, azules, violetas (Domínguez, 1973, pág. 141).

7.3.4 Prueba para terpenoides.

Prueba de Legal. A una porción del extracto vegetal se le adiciono, dos o tres gotas de piridina, luego se añadió una gota de una solución reciente de nitroprusiato al 5% y 3 gotas de NaOH 2 N, se considera positiva si aparece un color rojo intenso (Domínguez, 1973, pág. 199).

7.4 Fraccionamiento primario de los extractos por cromatografía de columna

Inicialmente se masearon 20 g de silica gel, para la preparación de la columna cromatográfica. 1 g del extracto hexánico de *Begonia erythrophylla* disuelto en hexano se agregó a la fase estacionaria. Inmediatamente después que el extracto penetró en la capa de silica gel, se procedió a realizar el fraccionamiento, agregando disolventes de diferente polaridad los cuales funcionaron como fase móvil. Con el fin de garantizar el fraccionamiento total de los compuestos presentes en los extractos (hexánico y metanólico), se fue aumentando la polaridad de la fase móvil a medida que disminuía el arrastre de la muestra a través de la fase estacionaria; para esto, se utilizaron disolventes como hexano, mezcla de hexano: cloroformo (8:2), mezcla de hexano- cloroformo (1:1), cloroformo y metanol, entre otros.

Una vez recolectadas las fracciones, estas fueron enumeradas y rotuladas, luego se concentraron mediante rotaevaporación, para ser analizadas por Cromatografía en capa fina.

7.5 Identificación de los metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina

A cada una de las placas cromatográficas, se les trazó una línea en la parte inferior y superior dejando 5 mm desde los bordes. En la línea inferior, se anotaron las numeraciones correspondientes a las fracciones que fueron aplicadas allí y, la línea superior se utilizó para indicar la altura máxima que recorrería la fase móvil. La fase móvil fue asignada teniendo en cuenta los disolventes utilizados en la cromatografía de columna.

Ejemplo: si las fracciones se obtuvieron en el momento en que la fase móvil fue el hexano, entonces el eluyente que se utiliza en la CCF es un disolvente de igual o de un poco menor polaridad que este, para así, lograr que los compuestos contenidos en la fracción se arrastren a una altura media en la placa y se puedan visualizar de una mejor forma. Cada muestra impregnada en la placa se enumeró de acuerdo con el número que llevaba el recipiente de vidrio en el que reposaba la fracción.

Las placas impregnadas, se ubicaron dentro de un becker que contenía la fase móvil. Una vez la placa se introdujo en el recipiente, se dio un tiempo para que, por capilaridad, el disolvente ascendiera hasta el frente de la cromatoplaca, arrastrando y separando los componentes presentes en cada una de las fracciones. Al término del ascenso de la fase móvil, se procedió a revelar las placas con vainillina- H_2SO_4 (revelador genérico para compuestos como terpenos, saponinas, flavonoides).

El procedimiento descrito anteriormente fue realizado de la misma forma a cada una de las fracciones resultantes de la cromatografía de columna, modificando los disolventes de la fase móvil, dado la diferencia en la polaridad de los solventes con que se fraccionó el extracto.

Después de revelar las placas con vainillina-H₂SO₄, se calcularon los R_f de las manchas que se visualizaron, utilizando la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

Las fracciones que mostraron manchas con un R_f similar se unieron en pequeños recipientes de vidrio previamente rotulados con números romanos, para diferenciarlos de los recipientes iniciales. Después de unir las fracciones, se realizaron sucesivas cromatografías de columna y capa fina a las fracciones resultantes, de la misma forma como se hizo con las primeras fracciones, esto con el fin, de unir los compuestos de igual R_f y con ello lograr aislar todas las moléculas presentes en las fracciones.

7.6 Identificación de algunas fracciones por la técnica de Espectroscopia Ultra violeta-Visible (UV/VIS)

Los espectros ultravioletas de las fracciones purificadas mediante cromatografía en placa preparativa se tomaron en el equipo de UV/VIS modelo Perkin Elmer Lambda 35, serie 502508121003 (Ver imagen 13), ubicado en el laboratorio de química de la Universidad Surcolombiana. Con el fin de efectuar el análisis, se siguieron los pasos descritos a continuación:

- a. Para comenzar, cada compuesto aislado durante la cromatografía en capa fina se diluyó en cloroformo.
- b. Se encendió el equipo UV/VIS y luego el computador portátil donde se encuentra instalado el software.
- c. Se dio inicio al software del equipo Perkin Elmer Lambda 35.
- d. Se seleccionó la opción “Scan” para encontrar la longitud de onda donde ocurre la máxima absorbancia y, se acoplaron las longitudes de onda entre 190 nm y 1000 nm.
- e. Las lámparas UV/VIS se encendieron al elegir la opción “instrument”.

- f. En una celda de cuarzo (Imagen 14), se adicionó una muestra de cloroformo que se utilizó como “blanco”, este se insertó en el equipo y se eligió la opción Autozero; continuamente, se dio “OK” en el aviso de insertar blanco. Para ello se utilizó una alícuota de cloroformo.
- g. Se dio clic en la opción “Start” y se cambió el blanco por la celda que contenía la muestra diluida en cloroformo.



Figura 13. Equipo UV/VIS, serie 502508121003, modelo Perkin Elmer Lambda 35 del laboratorio de Química de la Universidad Surcolombiana.



Figura 14. Celdas de cuarzo para espectroscopia UV/VIS.

7.7 Espectroscopia infrarroja

El análisis por espectroscopia IR de los compuestos purificados, se realizó utilizando el equipo de marca Shimadzu, modelo Affinity IR, serie A2137600394 (Ver Figura 15.), ubicado en el laboratorio de Química de la Universidad Surcolombiana. Desarrollando el siguiente procedimiento:

- a. Se encendió el espectrofotómetro y se verificó que las lámparas estuvieran prendidas.
- b. Se inició el software IR solution.
- c. Una vez listo el sistema (Humedad, lámpara y láser), el estado en la ventana derecha mostró un color verde autorizando la continuación del procedimiento.
- d. La adquisición y procesamiento de los datos se ajustaron.
- e. En la ventana inferior derecha se ajustó el modo de medida en % de transmitancia.
- f. Para una medida normal del equipo, el ajuste de apodización por defecto se mantuvo en “Happ-Genzel”.
- g. El número de ciclos se ajustó a un total de 45.
- h. Se seleccionó la resolución de 4.0 y el rango del número de onda se ajustó entre 600 y 4000 cm^{-1} .
- i. El IR se ensambló con el ATR (Atenuador de reflectancia) (Ver Figura 16.).
- j. Al ATR se le ajustó la abrazadera de presión (Ver Figura 17).

7.7.1 Medida del Background.

- a. En el software se dio clic sobre la opción BKG para el inicio del background.
- b. Una vez terminado el BKG, se verificó que el sistema estuviera limpio de muestras. Los parámetros del background se mantuvieron para la respectiva medida de las muestras.

7.7.2 Ajuste de la muestra.

- a. Se tomó una pequeña cantidad del compuesto puro diluido en cloroformo (entre 5 y 10 μL) y con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocó sobre el área de muestreo (Ver Figura 18).
- b. La muestra se cubrió con el módulo de presión, subsecuentemente, se dio clic en la opción “sample” que se muestra en la parte superior del software IR solution, para la realización del espectro.

7.7.3 Manipulación del espectro.

Una vez obtenido el espectro, se seleccionó una porción efectiva del mismo y se ajustó el ruido molecular incrementando el número de puntos en la opción Smoothing, que ofrece la sección Manipulation 1 del software IR solution.



Figura 15. Equipo de IR Shimadzu, modelo Affinity IR, serie A2137600394 del laboratorio de química de la Universidad Surcolombiana.



Figura 16. Atenuador de Reflectancia.



Figura 17. Abrazadera de presión.



Figura 18. Análisis del compuesto puro por IR.

8. Resultados y Análisis

8.1 Tamizaje preliminar para la identificación de metabolitos secundarios

8.1.1 Prueba para cumarinas.

Prueba de Ehrlich. En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de Ehrlich.

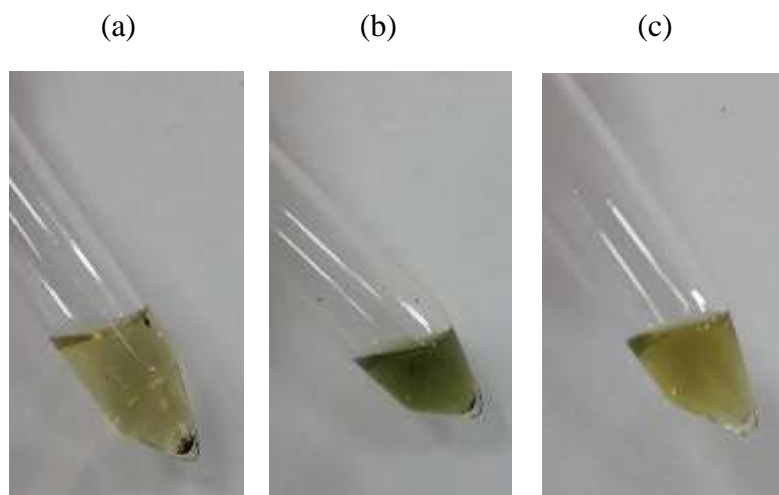


Figura 19. Prueba de Ehrlich: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.

Las cumarinas son compuestos los cuales contienen en su estructura química lactonas y furanos, gracias a la presencia de los grupos furanos, se puede predecir la presencia de este tipo de metabolitos con la prueba de Ehrlich (solución al 5% de p-dimetilaminobenzaldehído en etanol), dado que ellos en presencia de HCl reaccionan formando un complejo que expone una coloración naranja. En la evaluación con el reactivo de Ehrlich de los extractos clorofórmico, hexánico y metanólico de la especie *Begonia erythrophylla*, las coloraciones obtenidas fueron amarilla, verde oscuro y

amarilla respectivamente, por lo cual, se plantea que para los tres extractos la prueba dio negativa, puesto que no se evidenció coloración naranja (Domínguez, 1973, pág. 113).

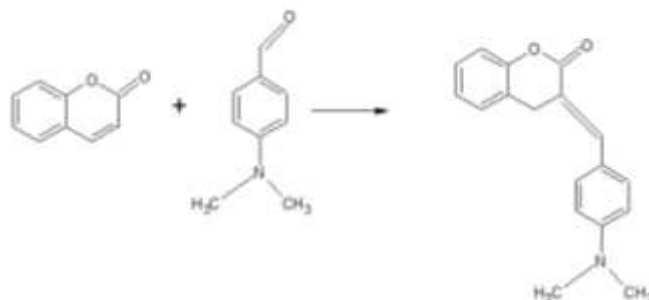


Figura 20. Reacción de la prueba de Ehrlich (Mesa Herrera, Carmona Carmona, & Burgos Herrera, 2014, pág. 8).

Prueba de Hidróxido de Sodio. En la figura 20 se aprecian los resultados obtenidos para la prueba de hidróxido de sodio.

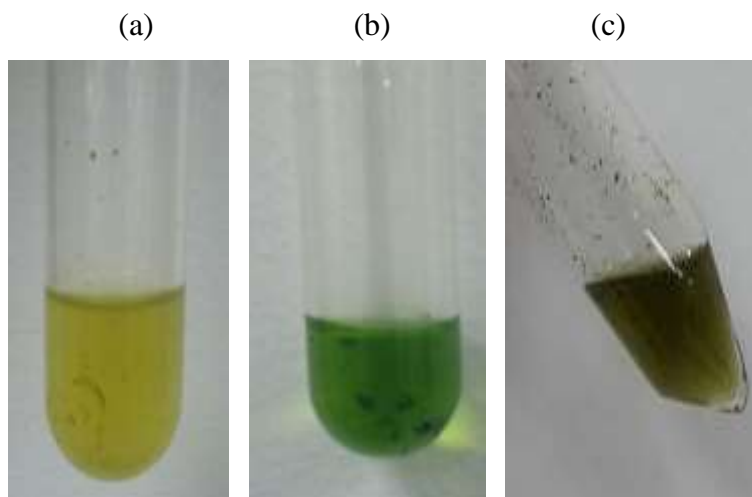


Figura 21. Prueba de NaOH: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.

La prueba de NaOH para detectar la presencia de cumarinas resulta efectiva, dado que, las lactonas que componen este tipo de metabolitos, se pueden disolver en medios

alcalinos, formando coloraciones amarillas, que terminan desapareciendo cuando la solución se acidula (Domínguez, 1973, pág. 113).

De acuerdo con los resultados obtenidos durante los ensayos con los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico, se observaron coloraciones amarillas y verdes respectivamente, que persistieron aun después de acidular las soluciones, por lo cual se ha determinado que la prueba para los tres extractos fue negativa.

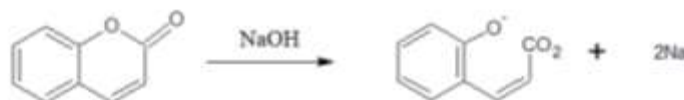


Figura 22. Reacción de la prueba de NaOH (Baca Ibañez , Lujan Soto, & Meraz Rodriguez, 2015, pág. 1).

8.1.2 Prueba para flavonoides.

Prueba de Shinoda. En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de Shinoda.

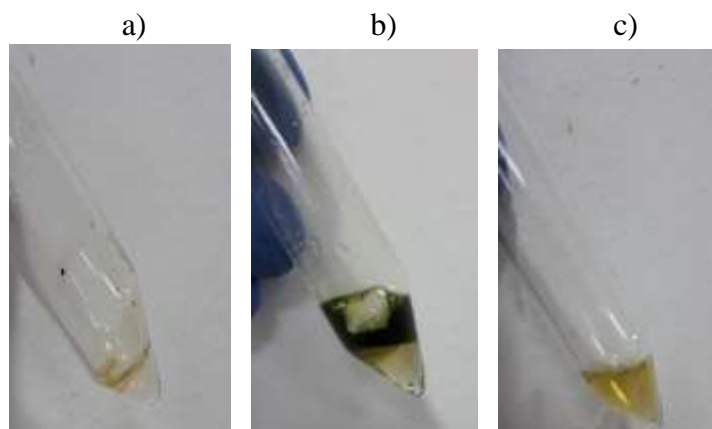


Figura 23. Prueba de Shinoda: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.

Realizado el ensayo se encontró que la reacción entre el extracto vegetal, el HCl y el Mg dio como resultado el desprendimiento de burbujas y la temperatura del tubo de

ensayo se elevó. Por otro lado, la prueba dio positiva para el extracto hexánico y clorofórmico dado que se formó un ligero color rojizo en la parte inferior del tubo de ensayo, en contraste con el extracto metanólico que dio negativa para la prueba dado que no presentó ningún cambio de coloración, (Ver Figura 21).

La prueba de Shinoda es una prueba específica para los flavonoides, dado que este tipo de compuestos reaccionan en presencia de HCl. Por tal razón, el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la benzopirona reacciona con el Mg^{+2} induciendo la formación de dienos, los cuales determinan la creación del ion flavilio (molécula que expresa el color rojizo característico de la reacción de Shinoda (Montealegre Pinzón, 2011, pág. 30) (Ver Figura 22.).

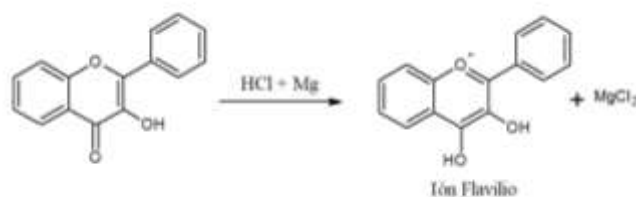


Figura 24. Reacción de la prueba de Shinoda (Daniela, 2014, pág. 18).

8.1.3 Prueba para Terpenoides y esteroides.

Prueba de Salkowski. En la figura 23 se exponen los resultados obtenidos para la prueba de Salkowski.

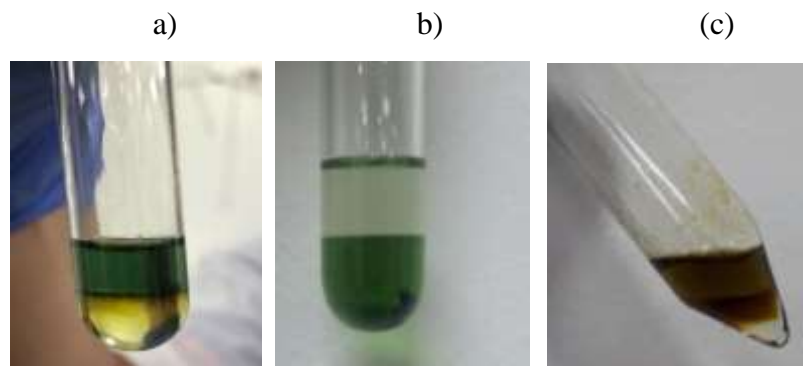


Figura 25. Prueba de Salkowski: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.

Al realizar la prueba, en el extracto clorofórmico se observaron coloraciones verdes, lo que indica resultados negativos para esteroides y/o terpenos. Por otra parte, al realizar la prueba con el extracto hexánico y metanólico respectivamente fue posible evidenciar una coloración amarilla y rojiza en la parte inferior del tubo de ensayo, indicando así que la prueba es positiva para esteroides y/o terpenos.

La reacción de Salkowski es una prueba general para identificar esteroides, terpenoides y compuestos con estructuras similares. La reacción consiste en la pérdida del grupo OH que se encuentra sustituyendo el C₃ del anillo adyacente. La pérdida del hidroxilo da paso a la formación de dienos causando un cambio de coloración amarilla o roja. Por otro lado, las moléculas que en su estructura química tienen un hidroxilo como sustituyente en el C₃ también pueden ser identificadas por este método, dado que el color característico es debido a la formación de dienos que se da al perder el grupo OH. Si el compuesto es una molécula cíclica con bastantes insaturaciones el color de la reacción podría virar a rojo (Montealegre Pinzón, 2011, pág. 28) (Ver Figura 24).

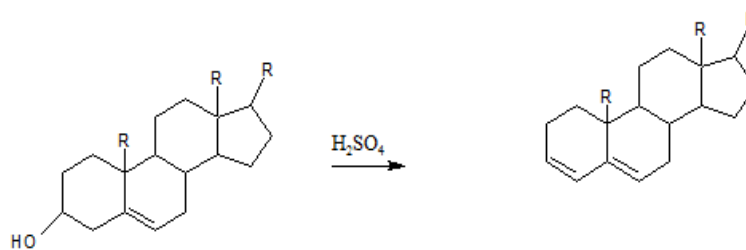


Figura 26. Reacción de la prueba de Salkowski para esteroides (Daniela, 2014, pág. 19).

Prueba de Liebermann-Burchard. En la figura 25 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de Liebermann-Burchard.

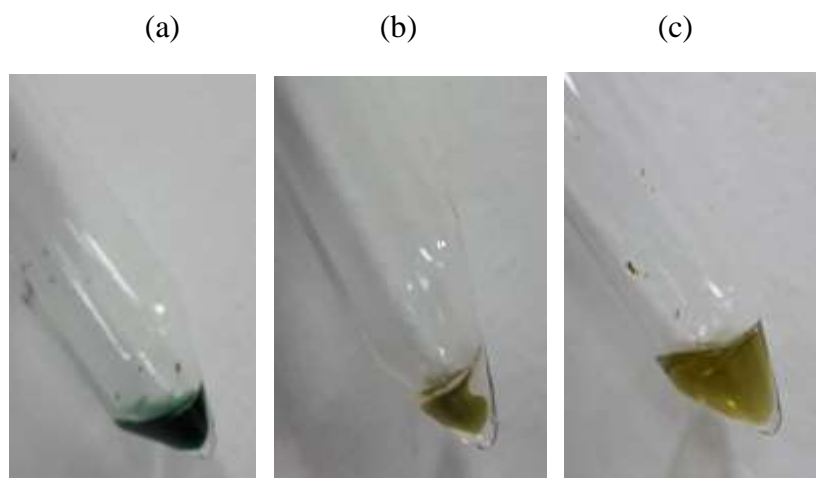


Figura 27. Prueba de Liebermann-Burchard: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.

Realizada a prueba en los tres extractos se encontró que el extracto hexánico se tornó de una coloración azul-verdosa, por lo cual se resalta positiva en este caso, ver figura 25. Por otro lado, los extractos metanólico y clorofórmico no mostraron ningún cambio de coloración que certifique la positividad de la prueba, indicando así que en estos dos últimos no hay presencia de compuestos esteroidales y/o triterpenos.

La prueba de Lieberman-Burchard es una prueba cualitativa que permite identificar compuestos esteroidales, triterpenoides y compuestos con estructuras químicas similares. Aunque su reacción es similar a la del ensayo de Salkowski, esta prueba es mucho más específica dado que en la reacción de Lieberman-Burchard (Anhídrido acético + H_2SO_4) el anhídrido acético crea un complejo con el grupo OH^- del C_3 aumentando la instauración del anillo adyacente al hidroxilo. La coloración que expresa el complejo es azul- verdosa, pero, en presencia de moléculas más instauradas, la prueba desarrolla una coloración roja, tal como sucede con el ergosterol (Véjar Rivera , 2005, págs. 158-159) (Ver Figura 26.).

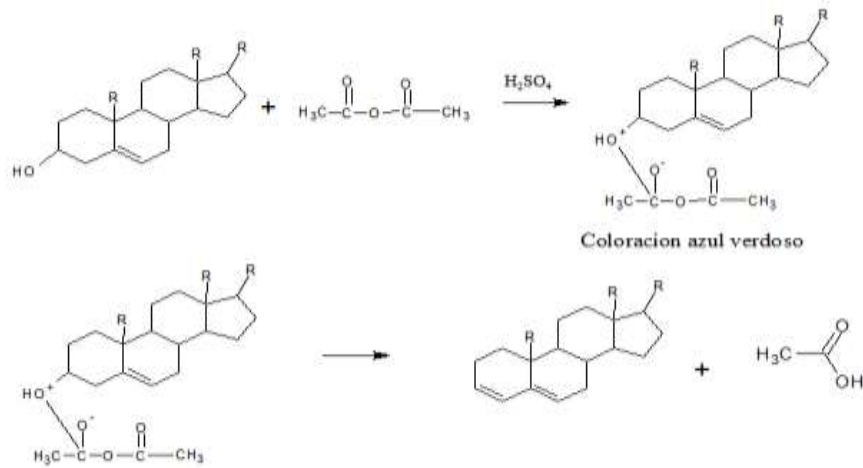


Figura 28. Reacción de la prueba de Liebermann-Burchard para esteroides y terpenoides (Daniela, 2014, pág. 19).

Prueba de Legal (sesquiterpenlactonas). En la figura 27 se revelan los resultados obtenidos para la prueba de Legal.

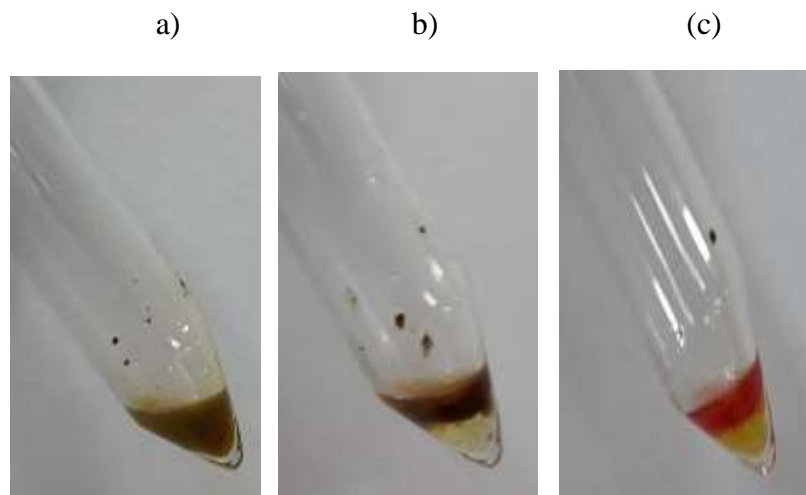


Figura 29. Prueba de Legal: a) extracto hexánico, b) extracto clorofórmico y c) extracto metanólico.

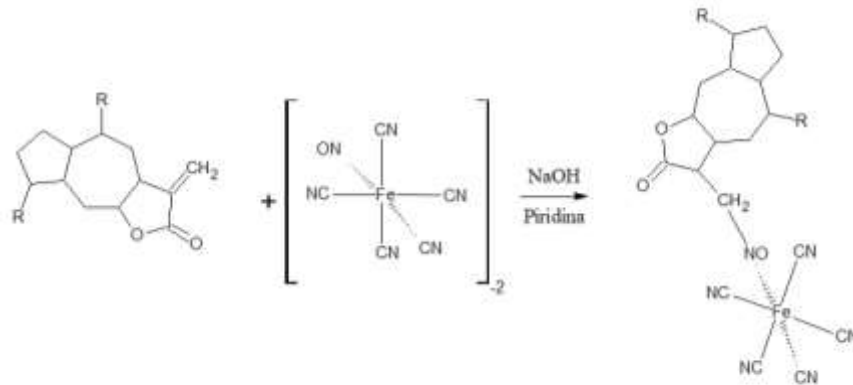


Figura 30. Reacción de la prueba de Legal (Marcano & Hasegawa, 2002, pág. 283)

Las sesquiterpenlactonas en su estructura poseen lactonas α , β -insaturadas, identificables con la prueba de legal, el reactivo que se usa es el nitroprusiato de sodio en medio básico ya que las lactonas α , β -insaturadas sobresalen por ser reductores fuertes capaces de oxidarse al reducir el reactivo, generando de esta manera cambios de coloración durante la reacción (Morales, 2008).

Durante los ensayos se encontró que la prueba fue positiva para los extractos metanólico y clorofórmico ya que se evidencio la aparición de una coloración rojiza en la parte superior del tubo de ensayo, tal como se ilustra en la figura 27, por otro lado, el extracto hexánico no mostro algún cambio de coloración, por lo que, se consideró negativo para sesquiterpenlactonas.

Al término de las pruebas cualitativas para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los tres extractos, los ensayos indicaron ser positivas para compuestos esteroidales, flavonoides y terpenos en donde además se visualizó que en los diferentes extractos la presencia de metabolitos variaba de acuerdo a su abundancia y escasez, estos criterios se pudieron determinar gracias a la intensidad con la que se expresaba la coloración que determina la positividad de la prueba (Ver Tabla 3.).

Tabla 3. Resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de *Begonia erythrophylla*.

Tipo de metabolito	Prueba	Extracto	Resultado
Cumarinas	Erlich	Metanólico	-
		Clorofórmico	-
		Hexánico	-
	NaOH	Metanólico	-
		Clorofórmico	-
		Hexánico	-
Flavonoides	Shinoda	Metanólico	-
		Clorofórmico	++
		Hexánico	++
Esteroles/Triterpenos	Salkowski	Metanólico	-
		Clorofórmico	-
		Hexánico	+++
	Liebermann-Burchard	Metanólico	-
		Clorofórmico	-
		Hexánico	+++
Terpenoides	Legal	Metanólico	+++
		Clorofórmico	-
		Hexánico	-

++ presencia moderada, +++ presencia abundante, - no presente

8.2 Fraccionamiento primario del extracto hexánico empleando cromatografía de columna

La presencia de compuestos químicos de naturaleza esteroideal y terpenoides es relevante e importante para la investigación, ya que han demostrado tener efectos positivos para tratar enfermedades crónicas, razón por la cual, los extractos con mayor presencia de estos metabolitos secundarios fueron fraccionados e identificados por medio de cromatografía de columna y placa fina; tipos de cromatografía que representa un excelente método para separar compuestos químicos presentes en una mezcla de sustancias y con ello purificarlos lo mejor posible (Inmaculada Angurell, s.f).

En este orden de ideas, se optó por fraccionar el extracto hexánico de la especie vegetal *Begonia erythrophylla*, ya que, en él se encontraron la mayoría de los metabolitos secundarios. Al terminar el fraccionamiento del extracto hexánico por medio de cromatografía de columna, se obtuvieron 18 fracciones con diferentes disolventes

como: hexano, mezcla de hexano: cloroformo (8:2), mezcla de hexano- cloroformo (1:1), cloroformo y metanol. (Ver Tabla 2).

La fase móvil que se utilizó en el proceso de cromatografía de columna fue modificada con el fin de aumentar la polaridad y así lograr la separación y, arrastre total de los compuestos presentes en el extracto hexánico. Algunas de las fracciones presentaron coloraciones más intensas que otras, lo cual indica que contenían una mayor concentración de compuestos.

Tabla 4. Fracciones obtenidas en la cromatografía de columna realizada al extracto hexánico.

Fracción	Disolvente utilizado
1- 3	Hexano
4- 6	Hexano-cloroformo 8:2
7- 9	Hexano-cloroformo 1:1
10-12	Cloroformo
13-14	Cloroformo-Metanol (8:2)
15-16	Cloroformo-Metanol (1:1)
17-18	Metanol

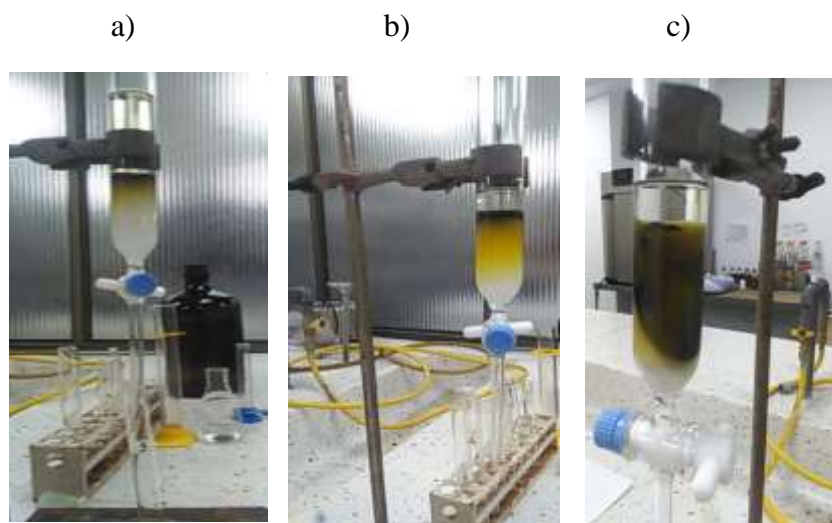


Figura 31. Cromatografía de columna del extracto hexánico: a) fase móvil: hexano, b) fase móvil: hexano-cloroformo 2:8, c) fase móvil: hexano-cloroformo 1:1.

Una vez colectadas las fracciones se rota-evaporaron, obteniendo así mayor concentración de los compuestos en cada una de ellas. Cada una de las fracciones se colectó en recipientes de vidrio rotulados.



Figura 32. Rota-evaporación de las fracciones obtenidas en la cromatografía de columna del extracto hexánico.

8.3 Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de las fracciones del extracto hexánico

Al término del fraccionamiento de los extractos por cromatografía de columna, se hizo uso de la cromatografía en capa fina, una técnica muy utilizada para identificar cualitativamente compuestos químicos; con esta técnica además se puede encontrar compuestos químicos de igual polaridad de acuerdo con el coeficiente de retención (R_f). Durante este proceso se obtuvieron resultados positivos, en cuanto a la presencia de compuestos esteroidales.

Luego de revelar las cromatoplasmas con vainillina- H_2SO_4 , se evidenciaron factores de retención y aspectos muy parecidos entre algunas de las marcas que aparecieron al instante de revelar. Por lo anterior fue posible deducir que aquellas fracciones, que durante el proceso de cromatografía en capa fina mostraron similitudes en sus R_f y color, posiblemente contenían los mismos compuestos, tal como se muestra en la figura 30.

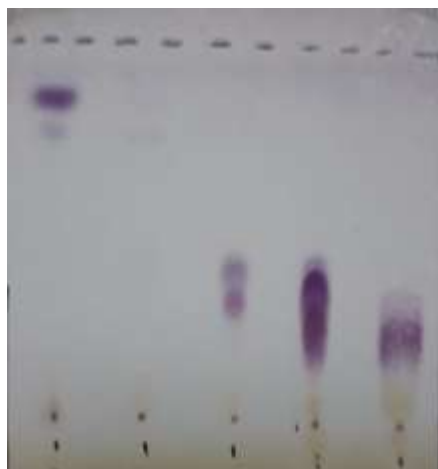


Figura 33. Cromatoplaqueta de las fracciones de la 4 a 8 revelada con vainillina- H_2SO_4 , fase móvil hexano cloroformo (9:1).

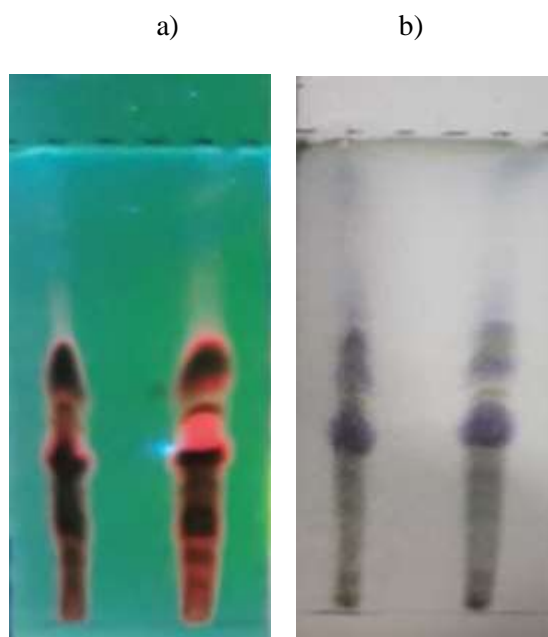


Figura 34. Cromatoplaqueta de las fracciones 10 y 11 revelada con: a) Lámpara Uv a 365 nm., b) vainillina- H_2SO_4 . Fase móvil hexano-cloroformo (1:1).

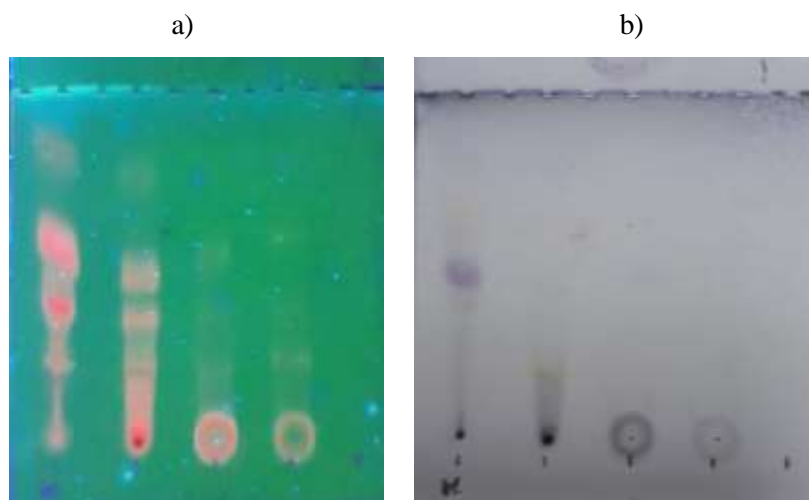


Figura 35. Cromatopla de las fracciones de la 12 a 15 revelada con: a) Lampara Uv a 365 nm., b) vainillina-H₂SO₄. Fase móvil cloroformo.

La presencia de una sola mancha en la placa indica la existencia de un solo compuesto en las fracciones evaluadas, por tal razón, todas las fracciones que exhibieron manchas con el mismo Rf en su respectiva cromatopla se unieron y almacenaron, dado que allí, se tienen compuestos similares. Al unir las fracciones se obtuvieron 8 fracciones combinadas (Ver Tabla 5.). Las cuales se dejaron reposar a temperatura ambiente en un lugar fresco hasta que se evaporara el disolvente que aún quedaba como sobre nadante.

Tabla 5. Fracciones obtenidas a partir de la unión de las fracciones con Rf similares.

Fracción	Fracciones combinadas
I	4, 5
II	6, 7
III	8
IV	9
V	10,11
VI	12
VII	13
VIII	14,15

Una vez a las 8 fracciones combinadas se les evaporo el disolvente, a cada una se le calculó la cantidad de producto obtenido. La fracción V, presentó mayor cantidad de producto (70 mg). Con el fin de cumplir el objetivo principal de la investigación, se le

realizo un nuevo fraccionamiento a la fracción V por cromatografía de columna dado que, era esta la fracción mayoritaria. De este proceso se obtuvieron 6 fracciones nuevas (Ver Tabla 6), las cuales se analizaron por CCF para observar que compuestos quedaron en cada una de ellas.

Tabla 6. Fracciones obtenidas en la cromatografía de columna realizada a la fracción V.

Fracción	Disolvente utilizado
V-1	Hexano
V-2	Hexano-cloroformo 8:2
V-3	Hexano-cloroformo 1:1
V-4	Cloroformo
V-5	Cloroformo-Metanol (8:2)
V-6	Cloroformo-Metanol (1:1)

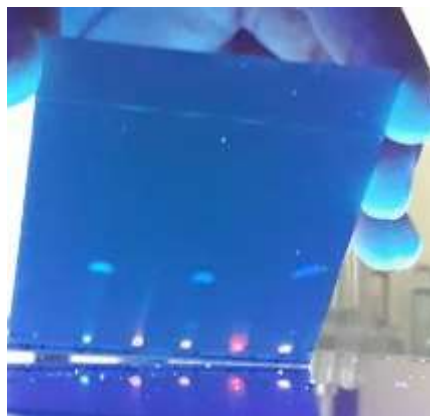


Figura 36. Cromatoplaqueta de las fracciones de la V-1 a V-6 revelada con Lámpara Uv a 365 nm. Fase móvil hexano-cloroformo (1:1).

El resultado de la Cromatografía en capa fina, determinó la presencia de una franja azul en las fracciones V-2, V-4 y V-6, la cual recorrió una distancia de 2,28 cm en la placa. Teniendo en cuenta que la distancia recorrida por el disolvente fue de 6 cm, se calculó el factor de retención para este compuesto, de donde se obtuvo un resultado de 0,38. Por tal razón, estas fracciones fueron unidas para concentrar la cantidad del

compuesto responsable de aquella fluorescencia azul, ya que, este es el compuesto predominante de la fracción mayoritaria. Finalmente, de este proceso se obtuvo una cantidad de producto de 2,3 mg.

El producto de las subfracciones V-2, V-4 y V-6 fue purificado por la técnica de cromatografía de capa fina preparativa. Este tipo de cromatografía se realizó con el fin de poder aislar el compuesto de interés de forma fácil, dado que este procedimiento da la posibilidad de segregar de la placa, la fracción de sílice en donde este contenido el compuesto.

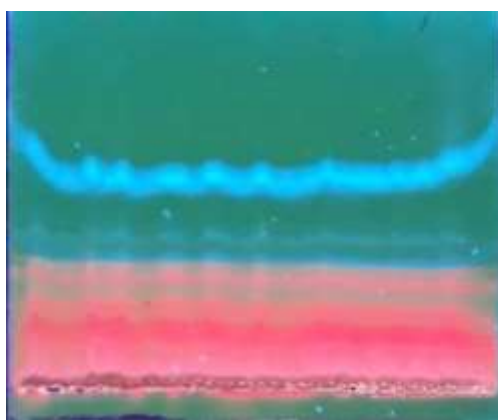


Figura 37. Cromatografía de capa fina preparativa del producto obtenido.

La cromatografía de capa fina preparativa mostró que la fracción V, presentaba una franja azul y varias franjas de color rojo intenso. De esta forma, se procedió a retirar de la placa la fracción de sílice en donde se reflejaba la fluorescencia azul que causa el compuesto de interés. Una vez extraída la sílice de la placa, se adicionó CHCl_3 para solubilizar la muestra y separarla de esta. Es importante resaltar que, se utilizó un disolvente como el cloroformo debido a que la sílice es insoluble en este.

8.5 Análisis del compuesto de interés por espectroscopia Uv-vis e IR

Al término de la purificación del compuesto de interés por medio de técnicas convencionales de cromatografía de columna y capa fina preparativa, se emplearon

métodos de espectroscopia Uv-vis e IR, para identificar la naturaleza química del compuesto.

Mediante la técnica de espectroscopía UV-vis se observaron dos bandas de absorción en el espectro, una banda a λ_{max} 240 nm y otra banda menos intensa a $\lambda = 283$ nm. Al contrastar el espectro experimental con el teórico, se encontró mucha similitud con las bandas de absorción características de los flavonoides. Por ejemplo, según Mabry, Markham, & M, 2012, la 7-hidroxiisoflavona exhibe dos bandas de absorción características a 242 y 299 nm.

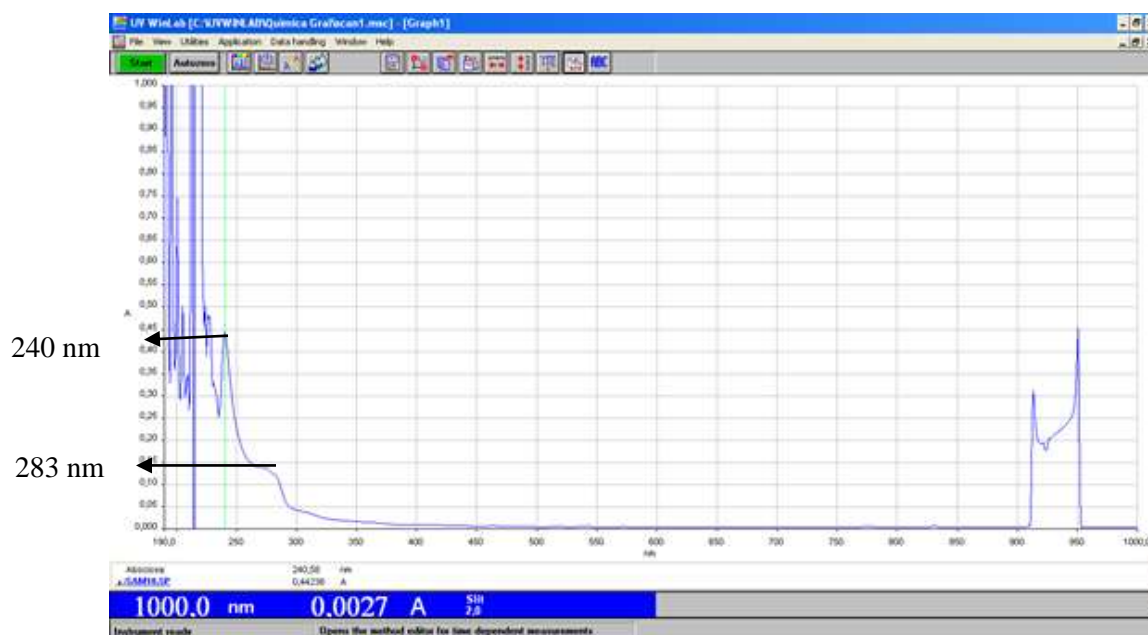


Figura 38. Espectro Uv-Vis de la franja azul purificada por Cromatografía en capa fina preparativa.

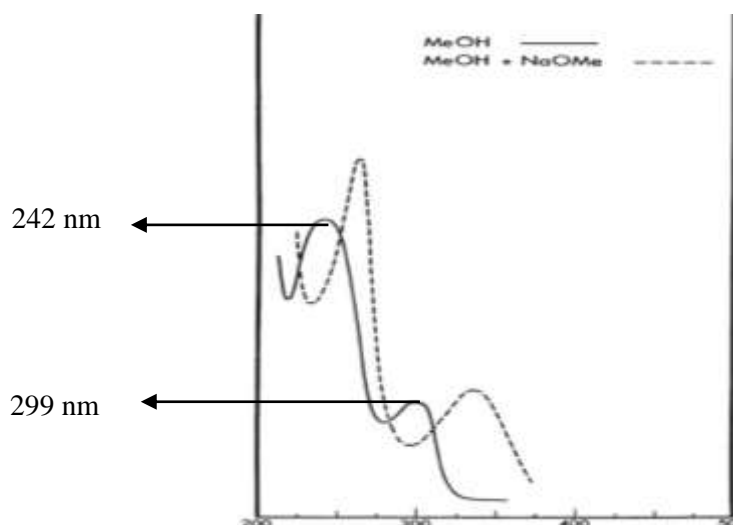


Figura 39. Espectro Uv-Vis de la 7-hidroxi isoflavona (Mabry, Markham, & M, 2012, págs. 169-173).

Las pequeñas diferencias que se observan en cuanto a las longitudes de onda a las que se producen las bandas de absorción tanto en el espectro experimental como en el teórico, son debidas al uso de diferentes disolventes que se emplearon para el registro de los espectros. Por ejemplo, si se compara el espectro UV-vis experimental con el reportado para la 7-hidroxiisoflavona, se observa que las bandas de absorción que aparecen en el espectro para la isoflavona se registran a 242nm y 299 nm cuando se empleó metanol como disolvente, en contraste con la muestra correspondiente a la franja azul, cuyas bandas de absorción aparecieron a 240nm y 283 nm, empleándose cloroformo como disolvente. Por lo tanto, el disolvente hace variar la longitud de onda a la que se producen las señales de la muestra, ya que, están dependen bastante del ambiente químico en el que este inmerso el compuesto (Harborne, Mabry, & Mabry, 2013, págs. 50-61).

Los espectros IR no son muy específicos a la hora de determinar la estructura química de un compuesto, sin embargo, la técnica IR otorga información importante en cuanto a los grupos funcionales que posee una molécula (Harborne, Mabry, & Mabry,

2013). Así, al analizar el espectro IR de la muestra se encontraron bandas desde 500 cm^{-1} hasta 750 cm^{-1} , zona reconocida como la huella dactilar del compuesto (Primo Yúfera, 2007, pág. 807). A 1250 cm^{-1} se encontró una señal que corresponde a la vibración del enlace C-O-C, característicos de compuestos aromáticos. Además de estas dos señales, también se encontraron bandas a 1600 cm^{-1} y 3750 cm^{-1} que corresponden a los enlaces C=O y O-H. Al comparar esta información con espectros teóricos de flavonoides se observa gran similitud entre los resultados (Ver Figura 37). La frecuencia de vibración molecular de los enlaces anteriormente expuestos, se pueden determinar por medio de la siguiente ecuación (Gordon M, 2006, pág. 106).

$$\text{Frecuencia de vibración molecular} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Todas las vibraciones que experimentan a nivel molecular los respectivos enlaces, se asimilan a oscilaciones armónicas, razón por la cual, las variables que intervienen en la ecuación son: la constante de fuerza de los enlaces (k) la cual a su vez depende de la naturaleza del enlace (Ver Tabla 7.) y, la masa de los cuerpos participantes dividida por el número de Avogadro. De esta forma, efectuando los cálculos correspondientes obtenemos las siguientes frecuencias de vibración molecular para los respectivos enlaces.

Tabla 7. Algunas constantes de fuerza de enlace (Gordon M, 2006, pág. 107).

Enlace	Constante de fuerza (din/cm X 10^5)
C-O	5.6
O-H	7.8
C=O	12.9

Para el enlace C-O-C

$$v = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{5,6 \times 10^5 \frac{\text{dina}}{\text{cm}}}{\frac{6,85 \text{ g}}{6 \times 10^{23}}}} = 3.52 \times 10^{13} \text{ Hz}$$

Para expresar la frecuencia de vibración en cm^{-1} se debe dividir los Hz en la velocidad de la luz ($c = 3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$).

$$\nu = \frac{3.52 \times 10^{13} \text{ Hz}}{3 \times 10^{10} \frac{\text{cm}}{\text{s}}} = 1173 \text{ cm}^{-1}$$

Para el enlace C=O

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{5 \times 10^5 \frac{\text{dina}}{\text{cm}}}{\frac{6,85 \text{ g}}{6 \times 10^{23}}}} = 5.35 \times 10^{13} \text{ Hz}$$

$$\nu = \frac{5.35 \times 10^{13} \text{ Hz}}{3 \times 10^{10} \frac{\text{cm}}{\text{s}}} = 1783 \text{ cm}^{-1}$$

Para el enlace O-H

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{5 \times 10^5 \frac{\text{dina}}{\text{cm}}}{\frac{6,85 \text{ g}}{6 \times 10^{23}}}} = 1.12 \times 10^{14} \text{ Hz}$$

$$\nu = \frac{1.12 \times 10^{14} \text{ Hz}}{3 \times 10^{10} \frac{\text{cm}}{\text{s}}} = 3743 \text{ cm}^{-1}$$

Todas las frecuencias de vibración molecular determinadas de forma teórica mediante a la ecuación de Stokes arrojaron valores cercanos a los determinados mediante el espectro de IR. Por otro lado, tanto los valores teóricos como los valores prácticos de las frecuencias vibracionales de los enlaces, están dentro de los intervalos expuestos por Gordon M, 2006, en la página 95.

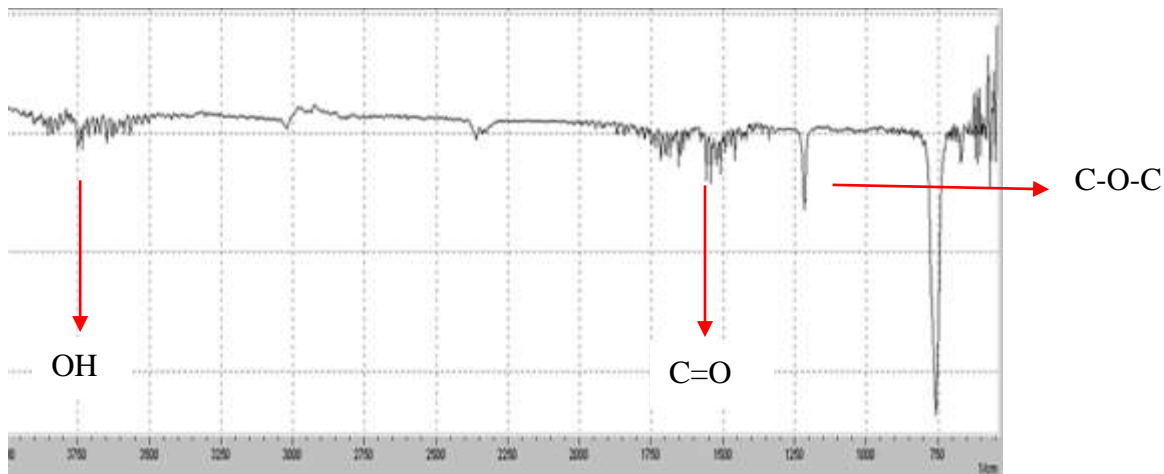


Figura 40. Espectro IR de la muestra purificada.

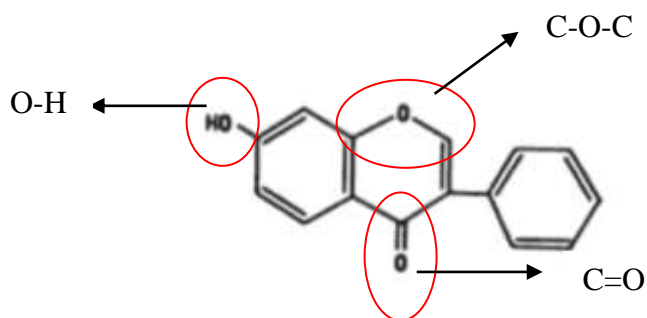


Figura 41. Estructura química de la 7- hidroxí isoflavona (Mabry, Markham, & M, 2012, págs. 169-173).

Hasta el momento, los resultados de los espectros UV-vis e IR, permitieron predecir que la identidad química de la fracción mayoritaria del extracto hexánico corresponde a un posible flavonoide. Otros parámetros como el color de la fluorescencia y el valor del coeficiente de retención permiten elucidar el tipo de flavonoide presente. De acuerdo con Mabry, Markham, & M, 2012, las isoflavonas con carencia de un grupo OH en el C₅ expelen fluorescencia azul celeste cuando son expuestas a luz UV, por otro lado, en el perfil cromatográfico de la 7- hidroxí isoflavona, expuesto por estos mismos

autores, se describe un valor de R_f de 0,38 para este compuesto, valor idéntico al obtenido del compuesto analizado por CCF. Adicionalmente, el punto de fusión de la muestra fue de 238-242 °, similar a los rangos de punto de fusión reportados para flavonas. Por lo tanto, es posible que la fracción mayoritaria del extracto hexánico corresponde a un posible flavonoide del tipo flavona, que es correspondiente con las pruebas fitoquímicas preliminares que se llevaron a cabo para la identificación de los metabolitos secundarios de la especie *Begonia erythrophylla*.

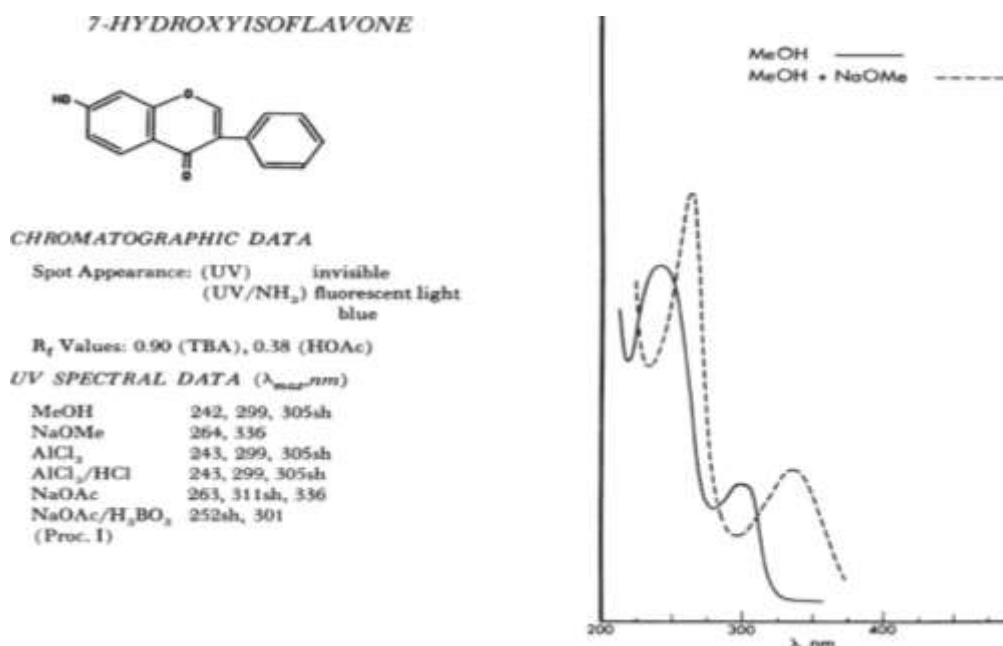


Figura 42. Perfil espectroscópico de la 7- hidroxí isoflavona (Mabry, Markham, & M, 2012, págs. 169-173).

9. Conclusiones

Las pruebas cualitativas realizadas a los tres extractos de la especie vegetal *Begonia erythrophylla*, demostraron la presencia de metabolitos secundarios tales como: flavonoides, terpenos, y compuestos esteroidales. La aparición de estos compuestos químicos, es relevante, dada la relación que mantienen con ciertas enzimas relacionadas a actividades biológicas, así como también, las similitudes estructurales que aguardan con estas. De esta forma, las propiedades medicinales que se le atribuyen tradicionalmente a esta especie, pueden ser debidas a estos metabolitos secundarios, los cuales han dado grandes resultados para tratar y prevenir problemas de diabetes hasta hipertensión.

Con el desarrollo de técnicas de cromatografía de columna y capa fina, se logró purificar el compuesto de mayor representación del extracto hexánico. El análisis del compuesto purificado por medio de espectroscopia Uv e IR, permitió definir que la naturaleza de este compuesto correspondía a la de un flavonoide, el cual comparte el mismo factor de retención, punto de fusión y apariencia al UV reportados en el perfil cromatográfico de la 7- hidroxí isoflavona.

Este proyecto permitió establecer las condiciones en el laboratorio de Química de la Universidad Surcolombiana para el aislamiento y la identificación de flavonoides de fuentes naturales, como una nueva línea en el grupo de investigación QIDEA, enmarcada en los “saberes disciplinares”

10. Bibliografía

- Ávalos García, A., & Pérez Urria, E. (05 de Julio de 2009). *Metabolismo Secundario de Plantas*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2018, de https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
- Baca Ibañez, A., Lujan Soto, E., & Meraz Rodriguez, M. (10 de Junio de 2015). *Academia.edu*. Obtenido de Academia.edu: https://www.academia.edu/9104401/FORMACI%C3%93N_DE_CUMARINAS_OBTENCI%C3%93N_DE_7-HIDROXI-4-METILCUMARINA
- Bernal, R., Gradstein, R., & Celis, M. (2015). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de <http://www.catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultadps/genero/begonia/>
- Burrit, D., & Leung, W. (1996). Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia x erythrophylla* the timing and specificity of the inductive stimuli. *Journal of Experimental Botany*, 557-567.
- Cruz Erazo, C. T., & Morocho Yaguana, L. A. (31 de Septiembre de 2013). *determinación de la concentración letal media en artemia salina de*. Recuperado el 12 de Febrero de 2018, de Centro de Biotecnología: <http://revistas.unl.edu.ec/index.php/biotecnologia/article/view/85/83>
- Daniela, A. (Junio de 2014). *Universidad Javeriana*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2018, de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16178/ArdilaDurangoDaniela2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México, D.F: Limusa.
- E, G., & Marin Ojeda, C. (2006). Estudio Citológico de Especies del Genero *Begonia* de la colección de *Begonias* neotropicales del jardín botánico de Berlín. Numero Cromosomicos. *Rojasiana*, 7, 62-77.

- Freire Fierro, A. (2004). Botánica Sistemática Ecuatoriana. En A. Freire Fierro, *Botánica Sistemática Ecuatoriana* (pág. 209). Quito: Missouri Botanical Garden.
- Giroux, S., & Tremblay, G. (2004). *Metodología de las Ciencias Humanas. La Investigación en Acción* (Tercera ed.). México: Fondo de Cultura Económica.
- Gonzalez Sánchez, A., Cabañas Wuan, Á., Arana Argáez, V., Hernandez Nuñez, E., & Ortiz Andrade, R. (22 de Junio de 2011). *Citroflavonoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y su complicaciones*. Recuperado el 16 de Octubre de 2018, de Scielo:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000300003
- Gordon M, B. (2006). *Química Física para las ciencias de la vida*. Barcelona: Reverté S.A.
- Harborne, J. B., Mabry, J. B., & Mabry, H. (2013). *The Flavonoids*. New York: Springer.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2006). *Metodología de la Investigación* (Cuarta ed.). México: Mc Graw Hill.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., & M, T. (2012). *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer Science & Business Media.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Organica*. Caracas: Torino.
- Martinez Gonzalez, L. (24 de Enero de 2014). Plantas medicinales nativas de Panamá y su potencial para el tratamiento de las patologías de mayor impacto en el país. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana-Departamento de Biología.
- Méndez, J. (2003). Productos finales de la glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gaceta Medica de Mexico*, 8.
- Mesa Herrera, N., Carmona Carmona, C., & Burgos Herrera, L. (20 de Febrero de 2014). *IATREIA*. Obtenido de IATREIA:
<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/17598/17395>
- Montealegre Pinzón, C. (2011). Recuperado el 12 de Noviembre de 2018, de
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8875/tesis813.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Morales, E. O. (Agosto de 2008). *usac tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala*. Recuperado el 08 de Abril de 2019, de “Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca *Quararibea yunckery* Standley Subs. *izabalensis* W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae): http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2698.pdf

Neotropical Flora. (s.f.). *Neotropical Plant Home*. Recuperado el 08 de Abril de 2019, de <http://hasbrouck.asu.edu/neotrop/plantae/index.php>

Pandikumar, P., Prakash Babu, N., & Ignacimuthu, S. (2009). Efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico de *Begonia malabarica* Lam. *Journal of Ethnopharmacology*, 5.

Perez Arbelaez, E. (1990). *Plantas Útiles de Colombia*. Medellín: Victor Hugo.

Primo Yúfera, E. (2007). *Química Orgánica Básica y Aplicada*. Barcelona: Reverté S.A.

Universidad de Alicante. (2017). *Universidad de Alicante*. Recuperado el 10 de Febrero de 2019, de Servicios Técnicos de Investigación: <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x-de-monocristal-y-espectroscopias-vibracional-y-optica/espectroscopia-infrarroja.html>

Universidad de Alicante. (2017). *Universidad de Alicante*. Recuperado el 17 de Febrero de 2019, de Servicios Técnicos de Investigación: <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x-de-monocristal-y-espectroscopias-vibracional-y-optica/espectroscopia-ultravioleta-visible.html>

Véjar Rivera, E. (2005). *Prácticas de Bioquímica descriptiva* (Vol. I). Hermosillo, Sonora: UniSon.