

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Disterigma alaternoides***

CARLOS RENÉ BERNAL BERNAL

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
BOGOTÁ D.C., 2015**

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Disterigma alaternoides***

CARLOS RENÉ BERNAL BERNAL

**Trabajo de grado como requisito para optar al título de Licenciatura en Química, en
la opción de intercambio con la Pontificia Universidad Javeriana.**

**Álvaro Granados Guzmán
M.Sc**

**Universidad Distrital Francisco José de Caldas
Facultad Ingeniería**

Director

**Jorge Robles Camargo
PhD**

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias**

Director

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
BOGOTÁ D.C., 2015**

Nota de Aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Dedico este trabajo a las personas más importantes en mi vida:

**mis padres Esperanza Bernal y Carlos Armando Bernal,
a mi hermano Esteban Camilo Bernal,
a mi Novia Gina Paola Bautista,
y a mis Abuelos, tíos, tías y primos
gracias a todos y cada uno de ustedes por sus enseñanzas,
por su apoyo incondicional y por motivarme a ser cada día mejor.**

En memoria de “Ata” y “Bernis”, porque sus enseñanzas forjaron el ser que soy y aunque ya no estén físicamente conmigo, siempre su legado vivirá en mi mente y mi corazón, gracias por continuar cuidándome desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Dios, por la bendición de contar con una hermosa familia y una excelente novia, por brindarme la fuerza, el amor y las condiciones para llevar a cabo este logro que no es solo mío sino de cada uno de ellos.

A la Pontificia Universidad Javeriana por la oportunidad de desarrollar este intercambio académico y poder llevar a cabo este trabajo en el Grupo de Investigación en Fitoquímica (GIFUJ).

El Profesor Álvaro Granados Guzmán, por enseñarme y ayudarme a desarrollar mis habilidades y conocimientos en la Fitoquímica y contribuir en este trabajo al compartirme su experiencia y conocimiento, sumado a su constante apoyo y dedicación.

Los Doctores, Jorge Robles y Fredy Gamboa por sus aportes en la parte experimental y por brindarme sus conocimientos, toda su colaboración y experiencia.

El Profesor Milton Hernández, por su colaboración en la parte experimental, sus contribuciones y consejos siempre en los momentos más oportunos.

A los señores Jorge (el pibe) y Jaime, por su colaboración.

A los estudiantes del laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Javeriana por su constante colaboración, apoyo y motivación.

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y conclusiones anotadas son responsabilidad sólo del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación
Agosto de 1989

CONTENIDO

	pág
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES	3
2. OBJETIVOS	7
2.1. GENERAL	7
2.2. ESPECÍFICOS	7
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1. FAMILIA ERICÁCEA	8
3.1.1. Descripción	8
3.1.2. Clasificación taxonómica	8
3.1.3. Distribución y hábitat	8
3.1.4. Usos etnobotánicos	9
3.1.5. Estudios químicos	10
3.2. GÉNERO <i>DISTERIGMA</i>	11
3.2.1. Distribución	12
3.2.2. Clasificación taxonómica	12
3.2.3. Características morfológicas	12
3.3. ESPECIE <i>Disterigma alaternoides</i> (Kunth)	13
3.3.1. Descripción	13
3.3.2. Clasificación taxonómica	13
3.3.3. Distribución	14
3.3.4. Estudios químicos	14
4. METODOLOGÍA	17
4.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	17
4.2. EXTRACCIÓN	17
4.3. PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES	17
4.4. CROMATOGRAFÍA	17
4.4.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	17
4.4.2. Cromatografía en Columna (CC)	17
4.4.3. Cromatografía en Capa Delgada Preparativa (CCDP)	18
4.4.4. Agentes de Detección y Visualización de compuestos	18
4.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	18
4.5.1. Actividad antibacteriana	18
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	20
5.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	20
5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	20
5.2.1. Extracto Etéreo	20
5.2.2. Extracto Etanólico	22
5.3. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES	22
5.4. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDAS	23
5.5. PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES	24
5.6. ELUCIDACIÓN DE COMPUESTOS	25
5.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	28
5.7.1. Actividad Antibacteriana	28

6. CONCLUSIONES	38
7. RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>Disterigma alaternoides</i> .	23
Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de las Fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>Disterigma alaternoides</i> .	24
Tabla 3. Pruebas químicas preliminares de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i> .	24
Tabla 4. Numeración de las soluciones para agregar en los pozos de las cajas de Petri	31
Tabla 5. Porcentaje de inhibición en <i>S. aureus</i> respecto al control positivo Vancomicina de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>	36
Tabla 6. Porcentaje de inhibición en <i>S. aureus</i> respecto al control positivo Ampicilina de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>	36
Tabla 7. Porcentaje de inhibición en <i>S. aureus</i> respecto al control positivo Sulfamethoxazole de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>	36
Tabla 8. Porcentaje de inhibición en <i>S. epidermidis</i> respecto al control positivo Vancomicina de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>	37
Tabla 9. Porcentaje de inhibición en <i>S. epidermidis</i> respecto al control positivo Ampicilina de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>	37
Tabla 10. Porcentaje de inhibición en <i>S. epidermidis</i> respecto al control positivo Sulfamethoxazole de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>	37

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Mapa Distribución de la Familia Ericácea a nivel mundial. Global Biodiversity Information Facility GBIF	9
Figura 2. Estructuras químicas de Catequina, Quercetina y Miricetina	10
Figura 3. Flavonoides glicosidados aislados de <i>E. verticilata</i>	11
Figura 4. Derivados del ácido cinámico	11
Figura 5. Mapa Distribución del genero Disterigma a nivel mundial. Global Biodiversity Information Facility GBIF	12
Figura 6. Distribución de la especie <i>D. alaternoides</i> . Global Biodiversity Information Facility GBIF	14
Figura 7. Estructura química de Friedooleanan 3-ona (Friedelina)	15
Figura 8. Estructura química de Friedooleanan 3-ol (Friedelinol)	15
Figura 9. Estructura química de Glutinol	15
Figura 10. Estructura química de Urs-12-ene-3 β -ol (α Amirina)	15
Figura 11. Estructura química de Urs-12-ene-3,28diol (Uvaol)	15
Figura 12. Estructura química de β Sistosterol	15
Figura 13. Estructura química de α Caroteno	15
Figura 14. Diagrama general de trabajo en <i>Disterigma alaternoides</i>	19
Figura 15. Extracción Soxhlet	21
Figura 16. Extractos concentrados en rotavaporador	22
Figura 17. Montaje fraccionamiento Liquido- Liquido	23
Figura 18. Cromatografía Fracc. Etérea, Extracto Etéreo y Floculo	25
Figura 19. Cromatografía Extracto Etanólico	25
Figura 20. Cromatografías Fracción Diclorometano	26
Figura 21. Cromatografías Fracción Acetato de Etilo	27
Figura 22. Resiembra de las cepas de bacterias en agar sangre	28
Figura 23. Soluciones de los extractos y fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>	28
Figura 24. Tubos con agar Muller Hinton esteriles para inocular las cepas de bacterias	29
Figura 25. Antibióticos usados como controles positivos	29
Figura 26. Incubadora Jouan Laboratorio microbiología CIO	30
Figura 27. Primeros halos de inhibición y determinación de la concentración mínima inhibitoria	30
Figura 28: Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de <i>D. alaternoides</i> frente a <i>S. aureus</i> .	32
Figura 29. Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de <i>D. alaternoides</i> frente a <i>S. epidermidis</i> .	33
Figura 30. Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de <i>D. alaternoides</i> frente a <i>E. coli</i> .	34
Figura 31. Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de <i>D. alaternoides</i> frente a <i>K. pneumoniae</i> .	35

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio fitoquímico preliminar de la especie colombiana *Disterigma alaternoides* (Kunth) Nied. para identificar los metabolitos secundarios presentes, también se evaluó su actividad biológica, a la que se le pudo comprobar acción antibacteriana frente a dos cepas de bacterias Gram positiva *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

El material vegetal fue recolectado en el páramo de Guasca situado al nordeste de la ciudad de Bogotá (Colombia), en la cordillera oriental de los Andes y se identificó en el Herbario Nacional de Colombia bajo el proyecto “estudio Fitoquímico de la familia Ericaceae” con número 04.

Se tomaron 540 g del material vegetal seco (partes aéreas) que fueron extraídos mediante sistema continuo tipo soxhlet con éter de petróleo y etanol. El extracto Etanólico se fraccionó por separado, por el método de separación líquido-líquido continuo con Diclorometano y Acetato de Etilo; las fracciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada, la Fracción Diclorometano se subfraccionó mediante cromatografía preparativa y la Fracción Acetato de etilo a su vez mediante cromatografía en columna con éter de petróleo, cloroformo y metanol puros y en mezclas de polaridad creciente; las subfracciones se monitorearon mediante cromatografía en capa delgada.

De los extractos y fracciones se realizaron pruebas preliminares de identificación de metabolitos secundarios, encontrando resultados positivos para la presencia de flavonoides, taninos, saponinas, fenoles y esteroides o triterpenos, Los metabolitos más abundantes en la fracción Diclorometano resultaron ser los fenoles y en la fracción de Acetato de etilo fueron los flavonoides.

Al evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones no se observó ninguna actividad frente a las 2 cepas de bacterias Gram negativas, (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) en contraste con los halos de inhibición presentados en las bacterias Gram positiva (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) principalmente el extracto Etanólico y la fracción de Acetato de etilo.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con un alto nivel de recursos naturales, la biodiversidad en flora y fauna es una de las más apetecidas a nivel mundial y los distintos climas y la variedad de especies nativas han servido como base del desarrollo económico y cultural del país desde tiempos precolombinos. Es por ello que con los recientes avances científicos han centrado su atención en la investigación de los Productos Naturales.

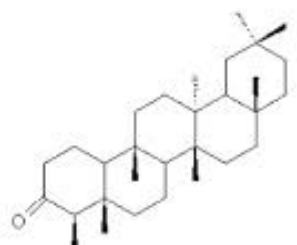
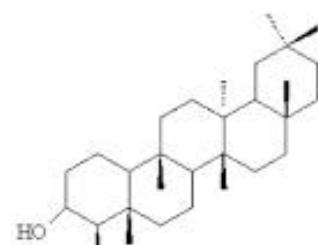
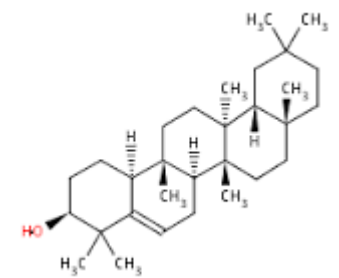
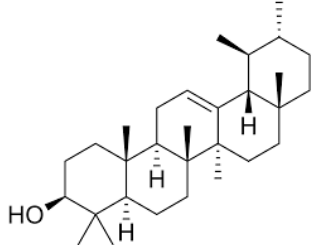
Los Ingredientes Naturales son sustancias orgánicas resultantes de los ciclos no vitales de las plantas, por lo que son conocidos como metabolitos secundarios, es decir que la planta no los necesita para poder existir, que de acuerdo a su utilidad pueden ser extraídos de diferentes plantas o animales; las extracciones pueden realizarse desde la simple maceración y extracción de jugos, hasta extracciones Etanólicas, Etéreas o en Aceites vegetales. (*Grupo consultor Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2009*).

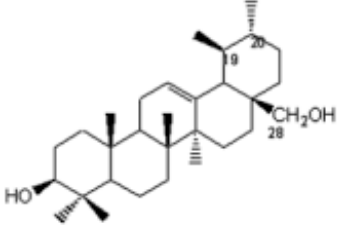
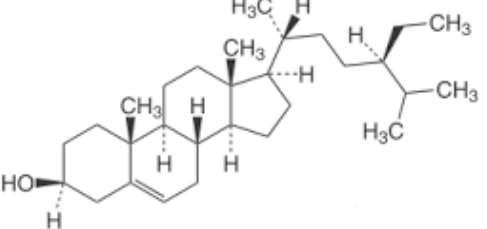
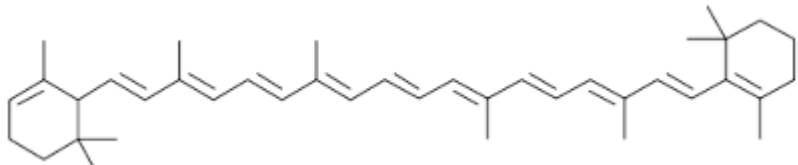
La investigación en productos naturales en sus diferentes aspectos es una ciencia antigua en donde la preparación de medicinas, venenos, estimulantes, colorantes, entre otros; ya aparecía registrada en las primeras fuentes escritas de varias culturas. A lo largo de la historia de la humanidad, el hombre ha utilizado las plantas de manera empírica como defensa frente a diversas enfermedades y hoy en día muchos de los medicamentos utilizados se derivan directa o indirectamente de estas prácticas antiguas. Por lo tanto, la investigación en productos naturales se ve fomentada y mantenida en constante actualidad por el hecho de que muchos productos sintetizados por microorganismos, vegetales e insectos son compuestos que presentan interesantes propiedades farmacológicas, de control del medio ecológico y una fuente renovable de materias primas de indudable interés. (*Santana, 2010*)

El grupo de investigación en Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ) ha venido desarrollando investigaciones en el estudio de diversas plantas promisorias de Colombia. Es así que en el estudio de especies del género *Pentacalia* y *Ericacea* ha podido aislar y caracterizar una amplia variedad de metabolitos secundarios con una importante actividad biológica tales como flavonoides, compuestos del tipo terpeno, esteroides, ácidos grasos cíclicos, prostaglandinas, germacránolidos y glicósidos entre otros; en los cuales se encontraron actividades plaguicidas, repelentes, antifúngicas, antiprotzoarias, insecticidas, antibacteriales, citotóxicas, antioxidantes, entre otras. (*Pedrozo, J. 2001*)

Dentro de los objetivos de este trabajo se encontraba realizar un estudio fitoquímico preliminar de los extractos de las partes aéreas de la especie *Disterigma alaternoides* para determinar la presencia de metabolitos secundarios en cada extracto y fracción, otro de los objetivos consistía en realizar un estudio de la actividad antibacteriana de dichos extractos.

1. ANTECEDENTES

PUBLICACIÓN	AUTOR / FECHA	ANTECEDENTES QUÍMICOS Y/O ANTECEDENTES ACTIVIDAD
<p>Estudio Químicos de los componentes lipófilicos mayoritarios de hojas y frutos de <i>Disterigma alaternoides</i> (HEK) ericaceae vacciniaceae</p>	<p><i>Pino Benitez, Nayibe</i> 1993</p>	<p>Las muestras se tomaron las zonas del Páramo de Guasca.</p> <p>Se aislaron y purificaron 7 compuestos del tipo terpenoide de los Extractos y Fracciones de <i>Disterigma alaternoides</i>, dichos compuestos se les hallo su respectivo punto de fusión y se les realizo la respectiva espectroscopia para determinar sus estructuras.</p> <p>Los compuestos aislados fueron:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Friedooleanan 3-ona (Friedelina) • Friedooleanan 3-ol (Friedelinol) • Glutinol • Urs-12-ene-3β-ol (α-Amirina) <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>

		<ul style="list-style-type: none"> • Urs-12-ene-3,28diol (Uvaol)  • βSistosterol  • α Caroteno  <p>Adicional en la Fracción de Diclorometano se encontró un sólido granular blanco cuyo punto de fusión está entre los 176-178°C y se determino que es una mezcla de terpenos no identificados con esqueletos de Urseno y Oleano.</p> <p>Se recomienda realizar estudios con los componentes de mayor polaridad de la especie.</p>
<p>Estudio fitoquímico y de actividad biológica de dos especies altoandinas priorizadas dentro del proyecto 318</p>	<p><i>Plazas Gonzales, Erika Andrea (2011)</i></p> <p><i>Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis</i></p>	<p>Para este trabajo las muestras se tomaron en las zonas cercanas del Páramo de Cruz verde.</p> <p>En este estudio se decide trabajar con las especies <i>Disterigma alaternoides</i>, <i>Hedyosmum parvifolium</i>, <i>Cestrum buxifolium</i>, <i>Citarexilum sulcatum</i>, <i>Ortrosantus chimborasensi</i> y <i>Pilea sp.</i> Se realizo una extracción en frio con Etanol al 96% de las hojas, tallos y frutos de <i>Disterigma alaternoides</i> para poder realizar la cuantificación de Fenoles, extracción de aceites esenciales y caracterización de aceites esenciales.</p> <p>Se encontró que en los extractos de las Flores se encuentra la mayor cantidad de</p>

		<p>Fenoles comparada con los otros órganos de la planta, para <i>Disterigma alaternoides</i> se encontró que el extracto de flores posee una cantidad de 482mg/g el más bajo comparado con las demás especies estudiadas en este trabajo.</p> <p>Se realizo marcha fitoquímica para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de los tallos, hojas, flores y frutos de <i>Disterigma alaternoides</i>, los resultados de las pruebas químicas mostraron la presencia de flavonoides, fenoles y esteroides o triterpenos en todos los extractos; quinonas y saponinas en los extractos de hojas y tallos y taninos en el extracto de los tallos.</p> <p>El ensayo de actividad antifúngica se realizo por el método de bio-autografía en cromatografía en capa delgada, se pesaron 10 mg de cada extracto en un ependorff y se disolvieron con 1 mL de metanol. Se tomaron 10 µL de las muestras fueron aplicadas sobre cromatoplasmas de silica gel, se corrieron y revelaron a Luz Ultravioleta y posteriormente fueron asperjadas con la suspensión de esporas de <i>Botrytis cinérea</i>, se pusieron las cromatoplasmas en la incubadora durante tres días. Y se observo el crecimiento del hongo, en ninguna de las especies estudiadas se observaron zonas de inhibición, lo que indico que no hay presencia de compuestos activos en los extractos evaluados.</p> <p>Debido a la alta concentración de fenoles que se se han asociado con una buena actividad antioxidante y quimioprotectora se recomienda cuantificar los flavonoides por el método de Liu y evaluar la actividad antioxidante y citotóxica, entre otras.</p>
<p>Análisis Fitoquímicos y de Actividad Biológica de seis especies de la familia Ericácea nativas de las áreas rurales del distrito capital</p>	<p><i>Plazas Gonzales, Erika Andrea (2013)</i></p> <p><i>Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis</i></p>	<p><i>En este estudio se trabajaron con seis especies de ericácea, Cavendishia bracteata, Macleania rupestris, Gaultheria erecta, Bejaria resinosa, Thibaudia floribunda y Disterigma alaternoides, las muestras se tomaron en las zonas rurales del Distrito Capital en las zonas del Páramo de Cruz verde y veredas los verjones.</i></p> <p>El material molido y seco se extrajo por maceración con etanol industrial Por medio del análisis cualitativo se determinó la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios en los extractos de hojas, encontrando pruebas positivas para fenoles, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, terpenos, esteroides y quinonas.</p>

		<p>En los ensayos de cuantificación de fenoles por el método de espectrofotometría se encontró que el extracto etanólico de las hojas de <i>Disterigma alaternoides</i> posee un contenido de compuestos fenólicos de 125.6mg/g de extracto el más bajo comparado con las otras especies estudiadas, pero se encuentra en la categoría alta de mas de 40mg/d según Stanojevic <i>et al.</i>, 2009.</p> <p>Para la cuantificación de Flavonoides se utilizo el método de Liu, obteniendo un contenido de flavonoides de 89,7mg/g extracto, que han sido muy relacionados con la actividad antioxidante de las plantas, al comparar los contenidos de Fenoles con los de Flavonoides se encontró que cerca del 71.4% de dichos Fenoles son Flavonoides.</p> <p>Para los ensayos de toxicidad frente a artemia salina se encontró que tiene una toxicidad media ya que registro una concentración de 196µg/mL.</p> <p>Para los ensayos de Actividad Antibacteriana se tomaron 30mg del extracto y se diluyó en 1mL de DMSO, usando sensidiscos se colocaron los extractos frente a <i>S. aureus</i> se encontró que la actividad es de baja a nula y frente a <i>E. coli</i> no se presentó inhibición.</p> <p>Para la actividad antioxidante se uso el método de autobiografía en CCD usando como reveladores el β caroteno y DPPH que luego se exponen a Ultravioleta y luz Visible respectivamente, se encontró que en las fases móviles de compuestos de baja polaridad no se encuentra actividad antioxidante, mientras que las fases de compuestos de mediana alta polaridad se encuentran compuestos que poseen actividad protectora del antioxidante natural β-caroteno ya que permanecieron naranjas luego de la exposición a la luz UV y compuestos que poseen actividad antioxidante por captación de radicales libres DPPH ya que al ser revelado se observaron coloraciones amarillas en el fondo violeta del radical.</p>
--	--	--

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

Realizar el estudio fitoquímico preliminar y la evaluación de la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Disterigma alaternoides*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener extractos y fracciones de las partes aéreas de *Disterigma alaternoides*.

Realizar las pruebas químicas preliminares para identificación de metabolitos secundarios.

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones obtenidas.

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos y fracciones obtenidas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. FAMILIA ERICÁCEA

3.1.1. Descripción

Arbustos, pequeños árboles o lianas, hojas alternas, opuestas o verticiladas, simples, persistentes o caducas, sin estípulas, simples en racimos o solitarias, axilares o terminales, perfectas, generalmente actinomorfas; solitarias o agrupadas, cáliz, (3) (5) (7) sépalos persistentes unidos en la base; corola, 3-7 pétalos soldados, estambres, en número doble al de pétalos, generalmente bicíclicos filamentos libres o monadelfos, anteras bitecas, ovario súpero o ínfero, carpelos, (2) (5) (10) soldados; plurilocular, axial, 2-5 locular, plurióvulados, estilo simple, estigma capitado, peltado o ciatiforme, frutos drupa, baya o cápsula con semillas pequeñas, endosperma carnoso, embrión recto (Maecha, 1997).

La familia está constituida por 103 géneros y alrededor de 4500 especies, los géneros más representativos de la familia son *Rhododendron* (con más de 1.000 especies), *Erica* (con cerca de 860 especies), *Vaccinium* (con cerca de 450 especies), *Cavendishia* (con cerca de 130 especies) y *Gaultheria* (con cerca de 115 especies) según lo indica Salinas y Betancur (2005).

3.1.2. Clasificación taxonómica

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>Filo</i>	<i>MAGNOLIOPHYTA</i>
<i>Clase</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Orden</i>	<i>Ericales</i>
<i>Familia</i>	<i>Ericaceae</i>

3.1.3. Distribución y hábitat

Es una familia cosmopolita, que viven en medios muy ácidos y generalmente presentan micorrizas.

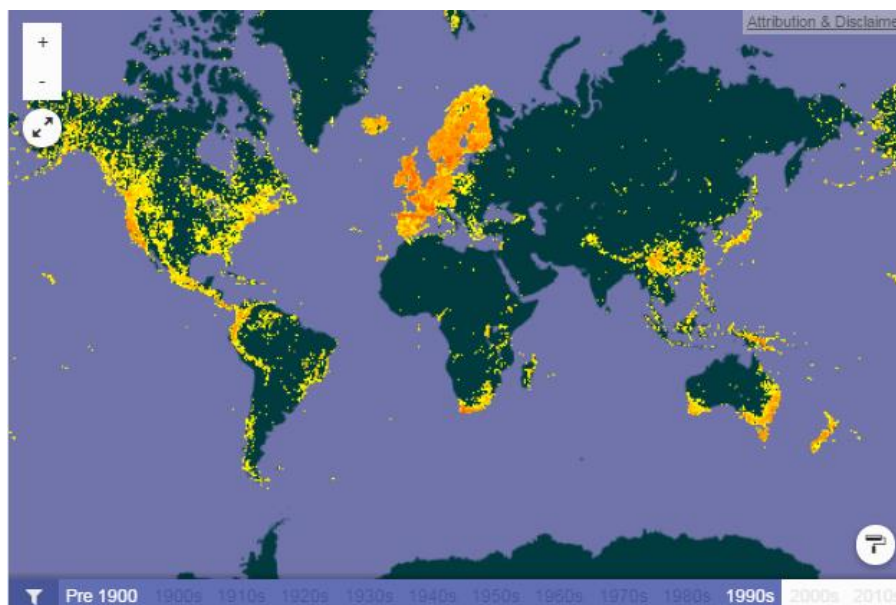


Figura 1. Mapa Distribución de la Familia Ericácea a nivel mundial
Global Biodiversity Information Facility GBIF

*Las zonas naranjas corresponden a mayor presencia de especies

Las ericáceas tienen 4.500 especies a nivel mundial con una amplia distribución geográfica que abarcan todos los continentes a excepción de la Antártida, en América tropical se encuentran alrededor de 900 especies (Smith, 2004); los principales centros de diversidad se encuentran en las regiones montañosas del neotropico donde se ve representada por 46 géneros y cerca de 800 especies, es decir, el 70% de sus géneros y el 95% de sus especies, aproximadamente (Luteyn, 2002).

3.1.4. Usos etnobotánicos

Por su importancia como frutal, la familia Ericáceas es uno de los componentes florísticos más sobresalientes en las zonas montañosas del noroccidente de Suramérica, especialmente en la vertiente pacífica de los Andes (Luteyn y Silva, 1999; Salinas y Betancur, 2005); en los bosques de niebla se destacan por su función ecológica (Luteyn y Pedraza-Peñalosa, 2008).

Las especies de la familia Ericaceae han sido utilizadas en diferentes regiones del mundo con fines medicinales y alimenticios. Por ejemplo, en algunas regiones de Turquía, las ramas y flores de Brezo *Calluna vulgaris* son usadas en infusión como diurético y desinfectante urinario. En otras regiones de Europa, esta planta es usada en tratamientos como antireumático, astringente, antiséptico, diurético, diaforético, expectorante, depurativo, sedante suave y como tratamiento para la gota (Orhan, Küpeli, Terzioglu y Yesilada, 2007).

Las hojas de Guyaba, *Arctostaphylos uva-ursi* L., ricas en glucósidos de hidroquinona son muy efectivas como antiséptico urinario. A partir de los frutos del arándano, *Vaccinium myrtillus* L., se preparan extractos antocianicos para el tratamiento sintomático de la fragilidad capilar cutánea (Bruneton, 2001).

En las islas Mascareña, Madagascar y algunas regiones del África tropical, la especie *Agauria salicifolia*, es conocida por ser tóxica al ser consumida por humanos y animales, sin embargo, gracias a sus principios activos como diterpenoides y triterpenoides, se utiliza tradicionalmente para tratar heridas ulcerosas, como depurativo e incluso para tratar la sarna (Luillier *et al.*, 2007).

En el suroeste de China, Myanmar y Vietnam, se utilizan las hojas de *Vaccinium dunalianum* W. para el tratamiento del reumatismo articular, también se usan sus brotes secos para preparar una bebida popular que sustituye el té (Zhao *et al.*, 2008).

Por su escaso interés alimenticio, las Ericáceas se usan principalmente en la decoración de parques y jardines (Bruneton, 2001).

Erica arborea L.(brezo): arbusto de hojas medicinales, con propiedades digestivas y diuréticas. Utilizado para tratar congestión de la vía urinaria (infusión), ronchas, manchas, dermatosis, erupciones, herpes (infusión caliente). Suele presentar un grueso tocón leñoso en la base de los tallos y que constituye un órgano con reservas que le permite sobrevivir tras la acción del fuego. Este tocón por su dureza suele ser utilizado en la fabricación de bastones y pipas (Heywood, 1985; Izco, 1998).

3.1.5. Estudios químicos

Los estudios químicos han permitido aislar e identificar metabolitos secundarios principalmente de tipo fenólico como flavonoides, antocianinas, taninos tanto hidrolizables como condensados y derivados del ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico, entre otros. Muchos de esos componentes han mostrado marcada actividad biológica como antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y vaso dilatatoria.

Los flavonoides son los metabolitos más representativos de la familia Ericaceae, se han aislado a partir de diferentes especies de los géneros *Erica* y *Vaccinium* flavonoles, antocianinas y flavonas como la catequina, quercetina y miricetina.

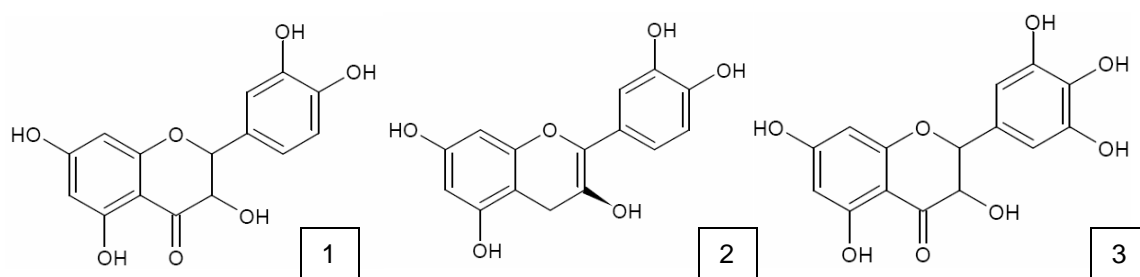


Figura 2. Estructuras químicas de Catequina(1), Quercetina(2) y Miricetina(3)

A partir de la parte aérea y flores de la especie *Ericaceae verticilata* se aislaron diferentes flavonas glicosiladas el 3,5,7,3',4'-Pentahidroxi-8,5'-dimetoxiflavona-3-O- α -L-ramnopiranosido(4) y el 3,5,7,4' Tetrahidroxi-8,3',5'trimetoxiflavona 3-O- α -L-ramnopiranosido(5) (Gournelis, 1995; Bennini, Chulia, y Kaouadji, 1994):

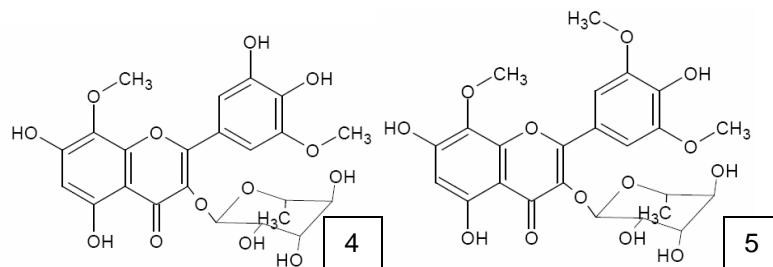


Figura 3. Flavonoides glicosidados aislados de *E. verticillata*

Otros de los metabolitos importantes en especies de esta familia son los derivados del ácido hidroxibenzóico e hidroxicinámico como agliconas y glicosidos, como la arbutina(6) y la -D-glucogalina(7) aislados de los frutos de la especie *A. unedo* (Pawlowska, De Leo, Braca, 2006).

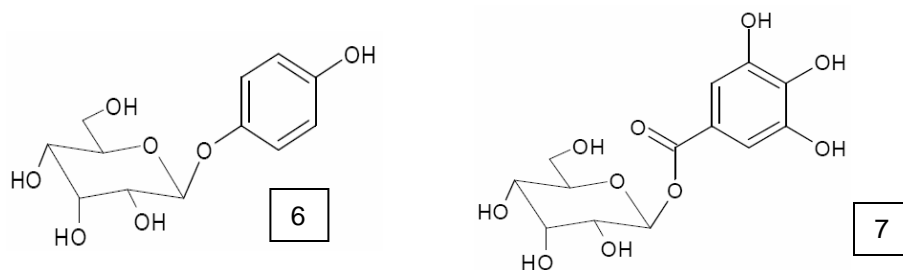


Figura 4. Derivados del ácido cinámico

Otros estudios han permitido aislar otros metabolitos como ácidos orgánicos como el ácido málico, tartárico, cítrico, butírico, acético y valerianico; enzimas como la gaultherasa o betulasa y la arbutasa; y pectina.

Por otro lado es importante resaltar que las ericáceas no producen alcaloides salvo algunos casos, en algunas especies se elaboran principios amargos que pueden ser tóxicos como la andromedotoxina y la ursona, y en raras ocasiones producen aceites y esencias (Font Quer, 2001).

En el género *Erica* se identificaron como pigmentos principales de las flores antocianinas glicosidadas: cianidina, delfinidina, malvidina, peonidina y pelargonidina (Crowden & Jarman, 1976). A partir de los brotes de *Vaccinium dunalianum* se aislaron cerca de 20 esteres fenólicos derivados del ácido caféico (Zhang, et al. 2008).

3.2. GÉNERO *DISTERIGMA*

Género de arbustos pequeños, rastreros distribuidos en Bosques andinos y paramos de Centro y Sur América perteneciente a la familia Ericácea. Este género se conoce popularmente como Blueberry o Arándanos por la presencia de frutos rojos comestibles (Luteyn, 1996).

3.2.1. Distribución

El género *Disterigma* es uno de los más pequeños de la familia Ericácea, comprende aproximadamente 37 especies distribuidas en las zonas montañosas de Centro y Sur América desde México hasta el sur de Bolivia y en Guyana (Pedraza, 2009). Antes de 1940 solo se conocía una especie en México, posteriormente se reportaron 15 especies exclusivas para Sur América, las continuas exploraciones botánicas permitieron acumular cerca de 35 especies en Centro y Sur América (Wilbur, 1992).



Figura 5. Mapa Distribución del genero *Disterigma* a nivel mundial.
Global Biodiversity Information Facility GBIF

*Las zonas naranjas corresponden a mayor presencia de especies

3.2.2. Clasificación taxonómica

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>Filo</i>	<i>MAGNOLIOPHYTA</i>
<i>Clase</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Orden</i>	<i>Ericales</i>
<i>Familia</i>	<i>Ericaceae</i>
<i>Género</i>	<i>Disterigma</i>

3.2.3. Características morfológicas

Las especies de este género son arbustos pequeños, rastreros, con ramas generalmente vellosas. Poseen flores pequeñas, subcoriaceas, axilares de 1 a 6, sostenidas por brácteas pequeñas. Las flores tienen corola blanca, verdosa o rojiza, cilíndrica o campanulado, 4-5 lóbulos, estambres, filamentos libres, ligulados, villosos o glabros. Los frutos comestibles en forma de baya con numerosas semillas (Smith, 1993).

3.3. ESPECIE *Disterigma alaternoides* (Kunth)

Nombres comunes: COLOMBIA: capulí silvestre (Nariño). ECUADOR: fiapilla, perlillo, tira, zchirpe, nigua, salapa chica. VENEZUELA: albricias. (Luteyn y Pedraza, 2002).

Sinónimos: *Disterigma alaternoides* var. *parvifolium* (Benth) A.C.Sm., *Disterigma popenoei* S.F. Blake., *Metagonia alaternoides* (Kunth) Nutt., *Vacciniopsis tetramera* Rusby., *Vaccinium alaternoides* Kunth., *Vaccinium alaternoides* var. *parvifolium* Benth. (Tropicos.org, 2010)

3.3.1. Descripción

Arbusto terrestre o epífita de hasta 4 m de alto; tallo terete o subterete, nítido, oscuro o cenizo, glabro; ramas subteretes, anguladas, de pubescentes a pilosas con pelos blancos, persistentes o glabros. Hojas coriáceas, bien espaciadas, ovadas a ampliamente ovadas-elípticas, base redondeada u obtusa a acuneada, ápice obtuso o subobtusado, raramente acusado, margen entero pero conspicuamente resuelto en la base del envés, glabro o moderadamente piloso, 3-5 plinervado desde la base, vena central hundida en el haz y sobresaliente en el envés, venas laterales usualmente planas o ligeramente hundidas en el haz y sobresalientes en el envés, pero usualmente oscuras, venas secundarias reticuladas oscuras en las dos superficies; peciolo subterete, usualmente aplanado en el haz, pelos cortos o puberulento en el haz, glabro. Inflorescencia fasciculada, 1-3-7 flores, rodeada por una serie de brácteas pequeñas, las más internas alcanzando el tamaño de las bracteolas, brácteas florales ovadas, obtusas, hasta 1.5 mm de largo, pero difíciles de distinguir de las brácteas de la inflorescencia; pedicelo subterete, 0-5-3 mm de largo, glabo o pubescente, a veces con fimbrias glandulares, pequeñas, dispersas.

Flores 4-meras, caliz de 3-4 mm largo, glabro, hipanto cilíndrico, terete, 1.5-2 mm de largo, lóbulos obados-deltados, subacutos, 1-2.5 mm de largo, en algunos casos con las bases imbricadas; corola delgadamente carnosa, cilíndrica, cilíndrica-urceolada, o en algunos casos hinchada distalmente, usualmente glabra pero a veces pubescente a cortamente pilosa, frecuentemente levemente pubescente entre blanco, blanco-rosado o rojo pálido, lóbulos fuertemente reflejos, pero en ocasiones exponen los ápices del estamen, deltados-oblongos, subacutos, 1-2 mm de largo; estamen 8, ca. mm largo, filamentos 2.5-4.5 mm de largo, densamente y conspicuamente vellosos distalmente con pelos de 1 ca. mm largo; anteras 1,5-3 mm largo. Bayas hasta de 1 mm diam., blancotranslucido o rosado translucido a rojizo-morado o rojo vino. (Luteyn y Pedraza, consultado 16 septiembre, 2010)

3.3.2. Clasificación taxonómica

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>Filo</i>	<i>MAGNOLIOPHYTA</i>
<i>Clase</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Orden</i>	<i>Ericales</i>
<i>Familia</i>	<i>Ericaceae</i>
<i>Género</i>	<i>Disterigma</i>
<i>Especie</i>	<i>D. alaternoides</i>

3.3.3. Distribución

Se encuentra en Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, en bosques húmedos premontanos, montanos húmedos, bosque húmedo y bosque lluvioso, subpáramo a páramo. (Luteyn y Pedraza, consultado 16 septiembre, 2010)

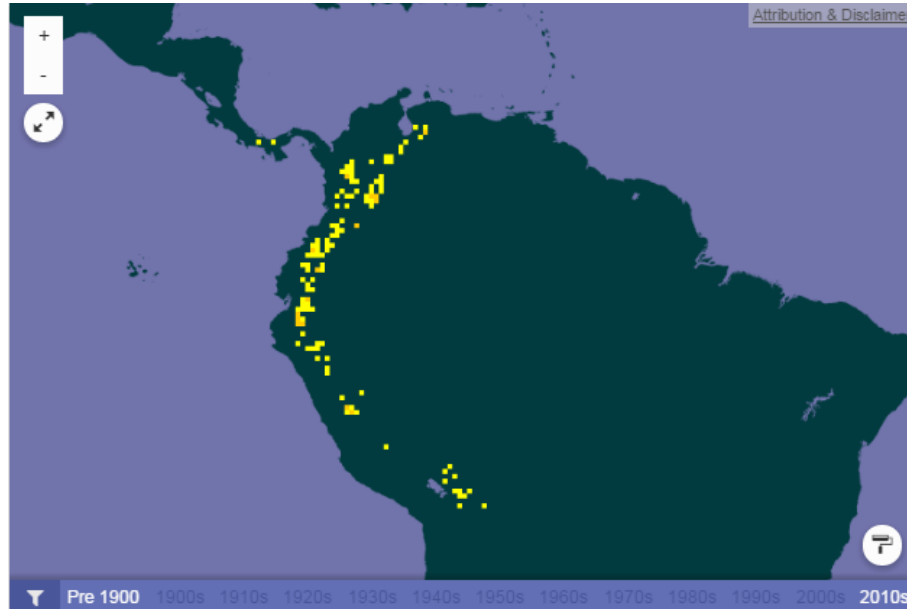


Figura 6. Distribución de la especie *D. alaternoides*.

Global Biodiversity Information Facility GBIF

*Las zonas amarillas corresponden a la distribución de la especies

3.3.4. Estudios químicos

El material vegetal de las especies *Disterigma alaternoides* se recolectó en el páramo de Guasca, la especie vegetal fue identificada en el herbario nacional de Colombia bajo el código Col345752, se analizaron los extractos y fracciones en busca de los componentes lipofílicos, se encontraron como resultado del trabajo de investigación siete compuestos de tipo terpenoide en el extracto etéreo los cuales fueron aislados y purificados y una mezcla de triterpenos no identificados con esqueletos de Urseno y Oleano. Los compuestos encontrados fueron el Friedooleanan 3-ona (Friedelina), Friedooleanan 3-ol (Friedelinol), Glutinol, Urs-12-ene-3 β -ol (α -Amirina), Urs-12-ene-3,28diol (Uvaol), β Sitosterol y alfa caroteno; los compuestos se les halló el punto de fusión, se les realizó espectroscopia a fin de poder conocer su estructura química. (Pino, 1993)

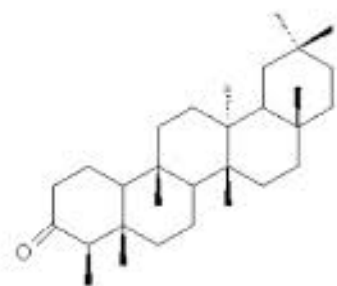


Figura 7. Estructura química de Friedooleanan 3-ona (Friedelina)

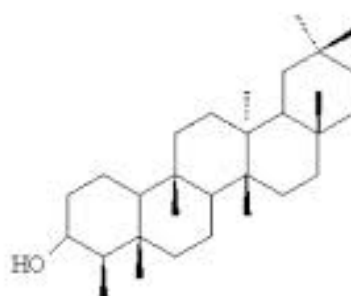


Figura 8. Estructura química de Friedooleanan 3-ol (Friedelinol)

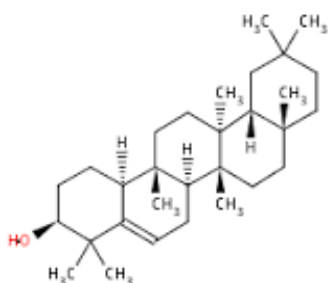


Figura 9. Estructura química de Glutinol

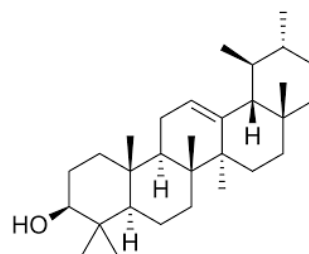


Figura 10. Estructura química de Urs-12-ene-3β-ol (α-Amirina)

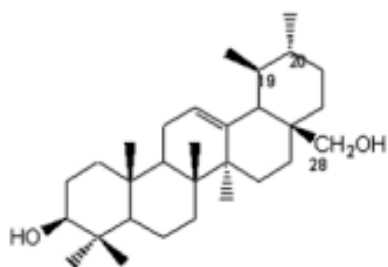


Figura 11. Estructura química de Urs-12-ene-3,28diol (Uvaol)

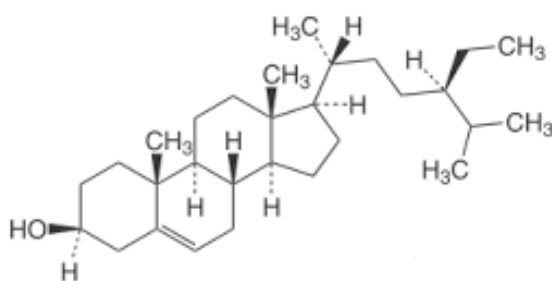


Figura 12. Estructura química de βSistosterol

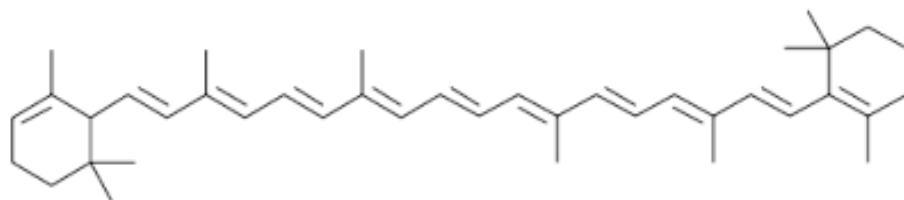


Figura 13. Estructura química de α Caroteno

El material vegetal de *Disterigma alaternoides* se recolectó en la cuenca alta del río Teusacá, vereda San Francisco del páramo de Cruz verde. Las pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos etanólicos de tallos, frutos, flores y hojas mostraron la presencia de flavonoides, quinonas, taninos, saponinas fenoles y esteroides o triterpenos. Debido a las intensas coloraciones formadas en las pruebas de cloruro férrico, Shinoda y leucoantocinidinas se decidió realizar la cuantificación de fenoles por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. El extracto de frutos de la especie *D. alaternoides* posee la menor cantidad de fenoles (357 mg/g) y el extracto de flores la mayor cantidad (482 mg/g) comparado con los demás órganos de la planta.

El ensayo de actividad antifúngica se realizó por el método de bio-autografía en cromatografía en capa delgada CCD, se pesaron 10 mg de cada extracto en un ependorff y se disolvieron con 1 ml de metanol. Se tomaron 10 μ L de las muestras fueron aplicadas sobre cromatoplasmas de sílica gel, se corrieron y revelaron a Luz Ultravioleta y posteriormente fueron asperjadas con la suspensión de esporas de *Botrytis cinérea*, se pusieron las cromatoplasmas en la incubadora durante tres días. Y se observó el crecimiento del hongo, se observó que en ninguna de las especies estudiadas se observaron zonas de inhibición, lo que indicó que no hay presencia de compuestos activos en los extractos evaluados. (Plazas, 2011)

Se realizaron ensayos de toxicidad en *Artemia Salina* donde se encontró que los extractos de hojas de *D. alaternoides* presentaron toxicidades medias bajas con CL50 de 196 μ g/mL por lo que se considera que la especie tiene una toxicidad media según los análisis de los resultados.

Para el ensayo de actividad antibacteriana se emplearon como microorganismos indicadores de actividad, las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli*. Se usó el método de sensibilidad y se utilizó una concentración de 30mg de extracto en 1mL de DMSO.

En los ensayos de actividad antibacteriana se consideran promisorios los extractos o compuestos con halos de inhibición superiores a 20 mm, donde la actividad frente a *S.aureus* fue muy baja comparada con el control usado y nula frente a *E. coli*, por lo que se puede concluir que los extractos estudiados poseen de baja a nula actividad antibacteriana.

Para la actividad antioxidante se usó el método de autografía en CCD usando como reveladores el β caroteno y DPPH que luego se exponen a Ultravioleta y luz Visible respectivamente, se encontró que en las fases móviles de compuestos de baja polaridad no se encuentra actividad antioxidante, mientras que las fases de compuestos de mediana alta polaridad se encuentran compuestos que poseen actividad protectora del antioxidante natural β -caroteno ya que permanecieron naranjas luego de la exposición a la luz UV y compuestos que poseen actividad antioxidante por captación de radicales libres DPPH ya que al ser revelado se observaron coloraciones amarillas en el fondo violeta del radical. (Plazas, 2013)

4. METODOLOGÍA

4.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal debe recolectarse teniendo en cuenta el estado vegetativo en floración. La planta debe ser identificada por un taxónomo y una muestra testigo debe disecarse para herbario, con un número registrado del mismo. El material se limpia y se separan su parte aérea, raíz, semilla, fruto y se seca a la sombra, con corriente de aire y a una temperatura de 40°C máximo, para asegurar un contenido de humedad no mayor a 10%, luego debe pulverizarse en molino eléctrico o mecánico limpio, que no genere mucho calor. (*Bilbao, M. 1997*)

4.2. EXTRACCIÓN

Las técnicas de extracción más comunes son las de maceración, extracción soxhlet y reflujo, con solventes de diferentes polaridades (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, etanol) y posterior concentración a presión reducida (*Cannell, 1998; Pasto, 1974*).

Para el presente trabajo se realizó la extracción soxhelt usando éter de petróleo y etanol para obtener los extractos etéreos y etanólico respectivamente. Posteriormente se fraccionó liquido-liquido el extracto alcohólico usando solventes en orden creciente de polaridad.

4.3. PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

Las pruebas químicas se realizaron mediante métodos de identificación cualitativa de grupos de sustancias, los cuales consisten en una reacción química que produce la alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un complejo de coordinación, lo cual da como resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas (*Bilbao 1997*).

4.4. CROMATOGRAFÍAS

Los grupos de sustancias se identificaron y purificaron usando métodos cromatográficos como lo son: cromatografía de capa delgada (CCD) para monitoreo y cromatografía en columna (CC) y capa preparativa (CCDP) para grupos de sustancias de acuerdo al gradiente de polaridad.

4.4.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Las placas de Sílica gel de 7cm se usan para un monitoreo preliminar de los extractos crudos y de las fracciones obtenidas de las columnas. Estas placas permiten verificar la pureza de los compuestos. (*Bolliger et al. 1965*).

4.4.2. Cromatografía en Columna (CC)

Se utiliza en la separación de compuestos de las fracciones de los extractos. Las muestras se suspenden y homogenizan en Sílica gel 60. En un solvente apropiado (éter de petróleo, cloroformo, metanol, etc.), se empacan en columnas de vidrio de 40 cm de altura y 2 cm de diámetro. Al separar las muestras se disuelven en el mismo solvente con

el que se preparó la columna para luego aplicarse en la parte superior de la misma. Se eluye con mezclas de solventes de polaridad creciente. (Bolliger *et al.* 1965).

4.4.3. Cromatografía en Capa Delgada Preparativa (CCDP)

Las placas de CCDP se emplean en la separación y purificación final de los compuestos; se preparan colocando una muestra pesada de Sílica gel 60 G en un volumen determinado de agua y extendida sobre placas de vidrio (20 x 20 cm), para producir una capa delgada de 0.5 a 1mm de grosor. Las placas se secan a temperatura ambiente y luego son activadas en un horno a 100°C por 4 a 5 horas. (Bolliger *et al.* 1965).

4.4.4. Agentes de Detección y Visualización de Compuestos

En las placas de CCD o CCDP con Sílica gel se utiliza luz UV de 254 nm (onda corta) y 366 nm (onda larga), que permite la detección de puntos o bandas de algunos compuestos fluorescentes. Algunas veces las placas se colocan en atmosfera de amoniaco (NH₃) y se observan luego a la luz UV; además se utilizan reactivos que se aplican en spray, que permiten visualizar o detectar los compuestos sobre placas de CCD o CCDP. En el caso de CCDP, el reactivo se roció solo en uno de los bordes de la placa, los reactivos más utilizados son unas soluciones de vainillina al 1% en H₂SO₄ concentrado, y CoCl₂ en H₂SO₄ 10%.

Las placas cromatográficas se impregnan con el reactivo y luego se calientan para visualizar los puntos o bandas (Bolliger *et al.* 1965).

4.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.5.1. Actividad antibacteriana

Consiste en realizar orificios con la ayuda de una pipeta pasteur estéril de 8 mm de diámetro sobre la superficie del agar que contiene el microorganismo, dentro de los cuales se depositaran 30µL de los diferentes extractos. Las cajas se incuban durante 24 horas a 37°C. Para cada microorganismo, se utilizan controles positivos de un antibiótico comercial y negativos de agua destilada, DMSO u otra sustancia en la que se diluyan los extractos. La evaluación se realiza por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de los orificios. El efecto inhibitorio de los extractos vegetales es obtenido por su eficiencia comparada con el control positivo. (Cuellar y Hussein, 2009).

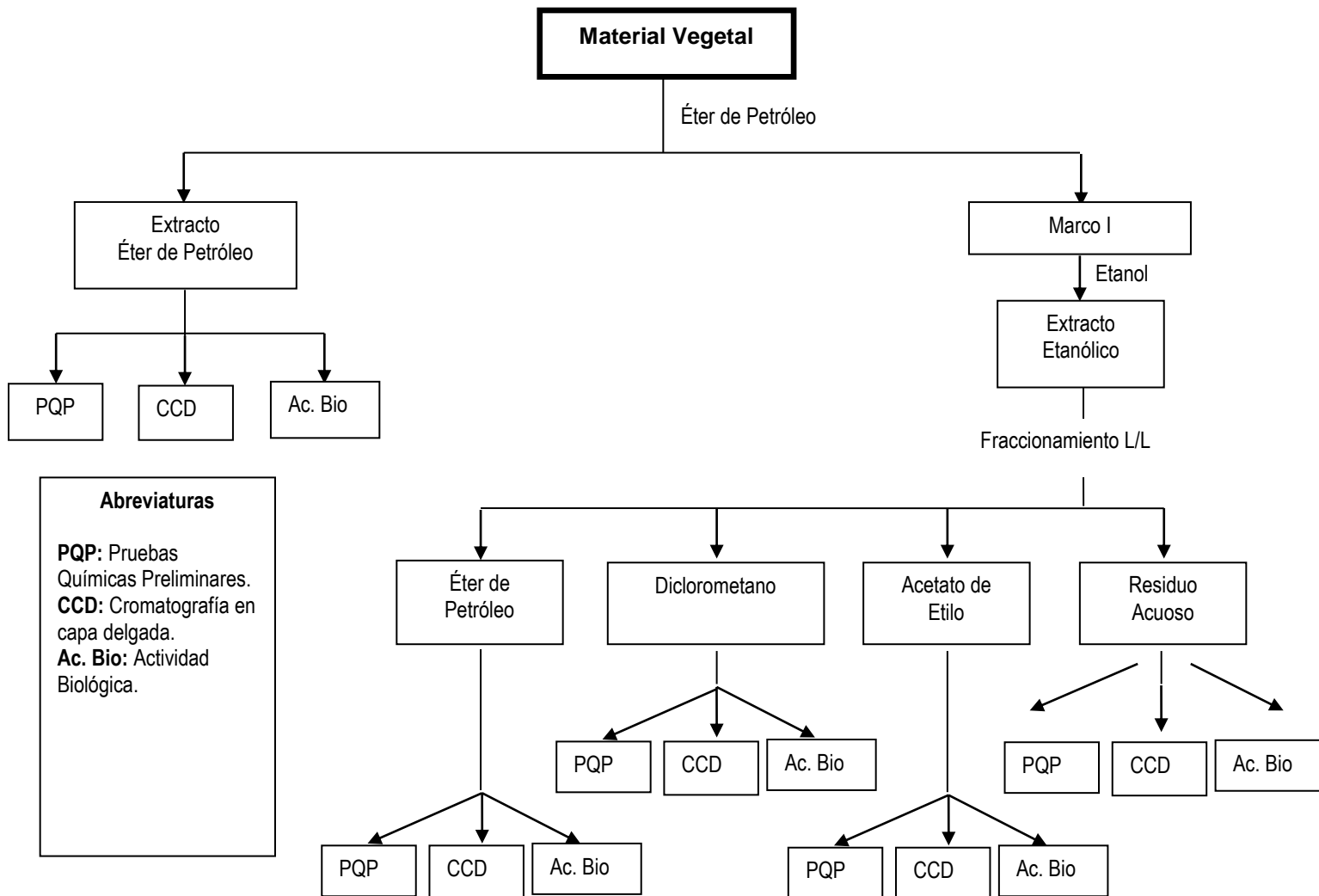


Figura 14. Diagrama general de trabajo en *Disterigma alaternoides*

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fue recolectado en el páramo de Guasca situado al nordeste de la ciudad de Bogotá (Colombia), en la cordillera oriental de los Andes en la carretera que Bogotá conduce al municipio de Gacheta (Cundinamarca) a una altitud entre los 3000 y los 3365 m.s.n.m. El material se recolectó en estado de floración y se empacó en bolsas plásticas para facilitar su transporte, el material se transportó hasta el laboratorio de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana en donde se desempacó y se organizó para su secado a temperatura ambiente bajo techo durante un periodo de 3 a 4 semanas.

La planta más representativa recolectada, se identificó en el Herbario Nacional de Colombia bajo el proyecto “estudio Fitoquímico de la familia Ericaceae” con número 04.

Luego de seco el material vegetal se separo según los órganos en hojas, flores y frutos; las flores y frutos se preservaron para posterior extracción, mientras que las hojas se les realizó un lavado para retirar contaminantes como tierra y líquenes y se continuo con el secado a temperatura ambiente, luego de 4 semanas las hojas se organizaron y se terminaron de secar en un horno a 40°C por 30 minutos.

Para moler el material no se utilizo molino ya que el tamaño de partícula al salir del molino resulta muy pequeño y esto hace que se compacte el material a la hora de la extracción y el equipo de Soxhlet no realiza el sifón, por lo que se decide triturar el material con las manos hasta un tamaño de partícula medio y se dispuso para la extracción.

5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

5.2.1. Extracto Etéreo

Se pesaron 540 gramos de material vegetal seco de las hojas de *D. alaternoides* y triturado que se sometieron a extracción continua usando el montaje soxhlet al que se añadieron como solvente 4L de éter de petróleo y el equipo se dejo extraer durante 3 días.

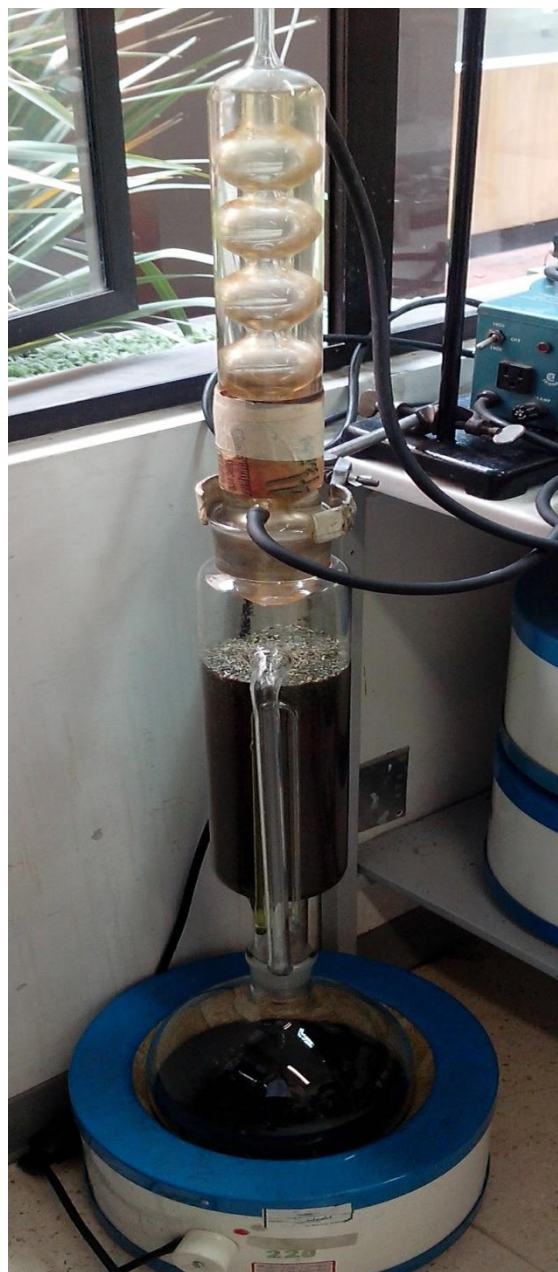


Figura 15. Extracción Soxhlet
Fuente el autor

El extracto etéreo de las hojas de *D.alaternoides* se concentró y se redujo de volumen en un rotaevaporador Buchi Vacuun Controller V-800 que permite recuperar el solvente usado controlando la presión y la temperatura de ebullición del solvente protegiendo las sustancias termolábiles presentes.

El extracto se envasó en un recipiente y se dejó terminar de evaporar el solvente durante algunos días a temperatura ambiente, al estar seco el extracto se peso y se determinó un peso de 45g.



Figura 16. Extractos concentrados en rotavaporador
Fuente: el autor

5.2.2. Extracto Etanólico

El material vegetal ya extraído con éter de petróleo al que se conoce como Marco 1 se extrajo con 4L de Etanol al 96% en un montaje continuo tipo soxhlet durante 3 días.

Al igual que el extracto etéreo, el extracto etanólico se concentró en rotaevaporador Buchii Vacuun Controller V-800 hasta reducir su volumen, luego se trasvaso y dejo secar durante algunos días. El extracto concentrado se pesó y se obtuvieron 125g.

5.3. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES

Del extracto etanólico seco se tomaron 120g que se deciden fraccionar y se guardaron 5g para las pruebas biológicas. Para el fraccionamiento se uso un sistema continuo líquido-líquido con diferentes solventes en los que se buscaba aumentar poco a poco la polaridad, por lo que se inicio con éter de petróleo, se continuo con Diclorometano y finalmente con Acetato de Etilo, cada uno de ellos por separado y en respectivo orden durante 72 horas.



Figura 17. Montaje fraccionamiento Líquido- Líquido
Fuente: el autor

5.4. Rendimiento de los extractos y fracciones obtenidos

A los extractos obtenidos se les tomó el peso seco (PE) y se evaluó el porcentaje de rendimiento obtenido (%Rend) con respecto a la cantidad de material vegetal con el que se inició el estudio fitoquímico; para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%Rend = (PE/Peso\ total\ material\ vegetal) * 100$$

El porcentaje de extracto obtenido (%Rend) se presenta en la siguiente tabla:

PESO MATERIAL VEGETAL	EXTRACTO	PE	% Rend.
540g	Petrol	45g	8.33%
	EtOH	125g	23.14%

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de los extractos de *Disterigma alaternoides*.

Una vez obtenidos los extractos, se decide realizar fraccionamientos en el extracto etanólico por el método líquido-líquido, se tomó el peso seco de las fracciones (PF) y se evaluó el porcentaje de rendimiento (%Rend.) con respecto al peso tomado del extracto (PE); para tal fin se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%Rend = (PF/PE) * 100$$

La siguiente tabla muestra el resultado de % fracciones obtenidas con respecto al extracto etanólico:

EXTRACTO	PE	FRACCIÓN	PF	% Rend.
Etanólico	100g	Etérea	0.3g	0.3%
		Diclorometano	11.18g	11.18 %
		Acetato de Etilo	17.92g	17.92%

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de las Fracciones obtenidas del extracto etanólico de *Disterigma alaternoides*.

5.5. Pruebas químicas preliminares

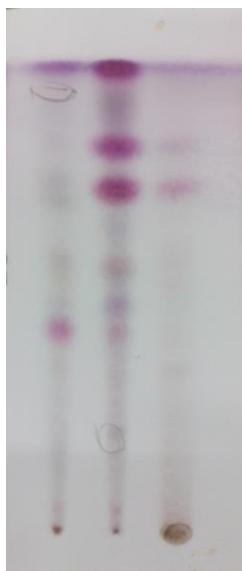
La marcha Fitoquímica permitió determinar de manera cualitativa la presencia de ciertos grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides* cuyos resultados se presentan en la siguiente tabla:

METABOLITO	PRUEBA QUÍMICA	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ETANÓLICO	FRACC. ÉTER DE PETRÓLEO	FRACC. DICLORO METANO	FRACC. ACETATO DE ETILO
Esteroides	Liebermman – Buchard	+	-	+	-	-
	Salkowski	+	-	+/-	-	-
Cumarinas	Erlich	-	+/-	-	+	-
	Fluorecencia	-	+	-	+	-
Quinonas	Zn/HCl	-	+	-	+	+
	Zn/NaOH	-	+	-	+	+
	Kraus	-	+/-	-	-	+
Fenoles	FeCl ₃	+/-	+	-	+	+
	Gelatina - sal	-	+	-	+	+
Flavonoides	Shinoda	-	+	-	+/-	+
	Rosenhein	-	+	-	-	+
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-
	Dragendorf	-	-	-	-	-

Tabla 3. Pruebas químicas preliminares de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*.

5.6. ELUCIDACIÓN DE COMPUESTOS

A los extractos y fracciones se les decide realizar cromatografía de capa delgada (CCD) para poder conocer las mezclas de metabolitos presentes usando como punto de partida las pruebas químicas preliminares. Las cromatografías obtenidas se presentan a continuación.



Cromatografía Fracción Etérea,
Exto Etéreo, Floculo

Sílica Gel
F.movil: 8 : 2
Éter de Petróleo : Acetato de Etilo

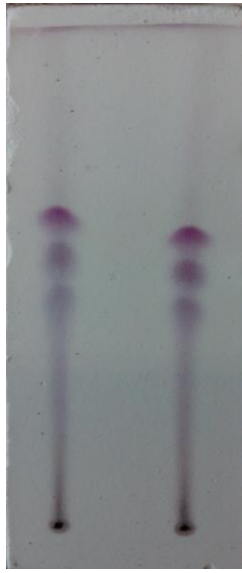
Figura 18. Cromatografía Fracc. Etérea, Extracto Etéreo y Floculo
Fuente: el autor.



Cromatografía Exto EtOH

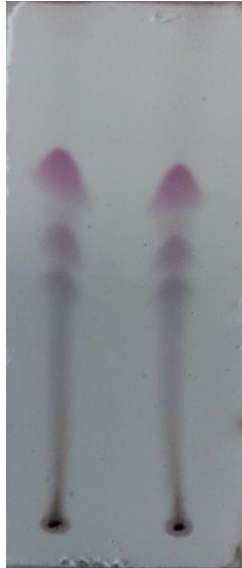
Sílica Gel
F.movil: 6 : 4
Éter de Petróleo : Acetato de Etilo

Figura 19. Cromatografía Extracto Etanólico
Fuente: el autor.



Cromatografía Fracc. Diclorometano

Sílica Gel
F.movil: 9.5 : 0.5
Cloroformo : Metanol
Una corrida



Cromatografía Fracc. Diclorometano

Sílica Gel
F.movil: 9.5 : 0.5
Cloroformo : Metanol
Dos corridas

Figura 20. Cromatografías Fracción Diclorometano
Fuente el autor.



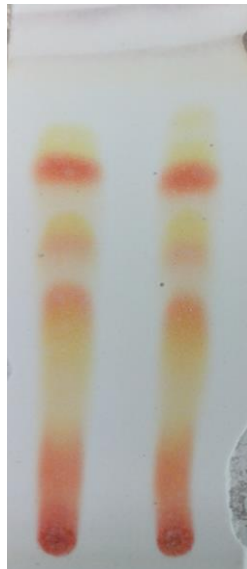
Cromatografía Fracc. Acetato de Etilo

Sílica Gel

F.movil: 9 : 1

Diclorometano : Metanol

Una corrida



Cromatografía Fracc. Acetato de Etilo

Sílica Gel

F.movil: 9 : 1

Diclorometano : Metanol

Dos corridas

Figura 21. Cromatografías Fracción Acetato de Etilo
Fuente: el autor

5.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.7.1. Actividad Antibacteriana

Para los estudios de actividad antibacteriana de los extractos y fracciones los ensayos se realizaron en los laboratorios de microbiología del Centro de Investigaciones Odontológicas CIO de la Pontificia Universidad Javeriana bajo la supervisión y asesoría del Doctor Fredy Gamboa.

Para este trabajo de investigación se decide trabajar con 2 cepas de bacteria Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y 2 cepas de bacterias Gram-negativo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* usando la metodología de pozos.



Figura 22. Resiembra de las cepas de bacterias en agar sangre
Fuente: el autor

Para el ensayo se tomaron 1mg, 2mg, 10mg y 100mg de los extractos etéreo y etanólicos, al igual que de las fracciones Diclorometano y Acetato de etilo de de *Disterigma alaternoides* y se solubilizaron en 1 mL de DMSO puro, para el extracto etéreo se usa Tween 80 buscando la concentración mínima inhibitoria.



Figura 23. Soluciones de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*
Fuente: el autor

Se prepararon soluciones bacterianas de 100µL a 0,5 en la escala de turbidez de Mcfarland en tubos con 15mL de agar Mueller Hinton las cuales se servían en cajas de petri estériles, con una pipeta pasteur estéril, se realizaban agujeros de 8mm de diámetro que servían como pozos en los que se agregaban 30µL de la solución de los extractos y fracciones.



Figura 24. Tubos con agar Muller Hinton esteriles para inocular las cepas de bacterias
Fuente: el autor

Se usaron como controles positivos soluciones de Vancomicina a 180µg/500µL, Amplicilina a 120µg/500µL y Sulfamethoxazole 150µg/500µL, se prepararon dichas concentraciones agregando 6 discos de cada antibiótico a 500µL de solución salina al 0.85% estéril y como controles negativos su usaron 30µL de DMSO y 30µL Tween 80.



Figura 25. Antibióticos usados como controles positivos

Las cajas incubaron a 36 °C, durante 24. Todos los ensayos se realizaron por triplicado



Figura 26. Incubadora Jouan Laboratorio microbiología CIO
Fuente: el autor

En los ensayos de concentración mínima inhibitoria se pudo determinar que la concentración optima para trabajar era la de 100mg/mL al probar una a una las concentraciones de 1mg/mL, 2mg/mL y 10mg/mL en las que no aparecieron halos de inhibición, solo hasta la concentración de 100mg/mL aparecen los primeros halos.

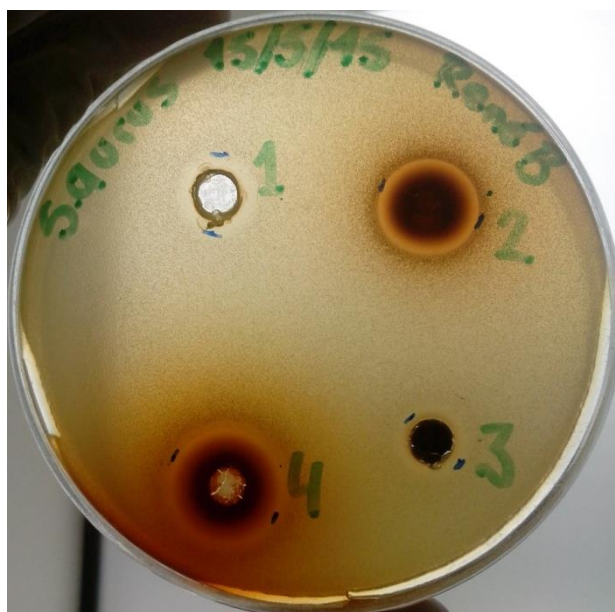


Figura 27. Primeros halos de inhibición y determinación de la concentración mínima inhibitoria
Fuente: el autor

Para una mayor disposición de las cajas y orden en los ensayos se decide numerar las soluciones de los extractos, las fracciones, los controles positivos y los controles negativos y organizarlos según las manecillas del reloj en las cajas de petri, la numeración correspondiente a cada una de las soluciones se encuentra en la siguiente tabla:

	Solución	Número
Extos y Fracc.	Extracto Etéreo	1
	Extracto Etanólico	2
	Fracción Diclorometano	3
	Fracción Acetato de etilo	4
Controles +	Vancomicina	5
	Sulfamethoxazole	6
	Ampicilina	7
Controles -	DMSO	8
	Tween 80	9

Tabla 4. Numeración de las soluciones para agregar en los pozos de las cajas de petri
Fuente: el autor

Al interior de las cajas de los extractos se dispusieron 6 pozos, 3 pozos para el extracto Etéreo y otros 3 pozos para el extracto Etanólico, de igual manera se prepararon las cajas de las fracciones 3 pozos corresponden a la fracción Diclorometano y 3 pozos para la fracción Acetato de etilo.

Para las cajas de los controles se dispuso una caja para los antibióticos Vancomicina y la Ampicilina y en otra caja el antibiótico más sensible para bacterias Gram-negativa el Sulfamethoxazole junto con los controles negativos.

Al analizar los estudios realizados de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de *D. alaternoides* se observa que estos muestran halos de inhibición frente a las cepas de bacterias de tipo Gram-positivo y ninguna actividad frente a las cepas de bacterias Gram-negativa

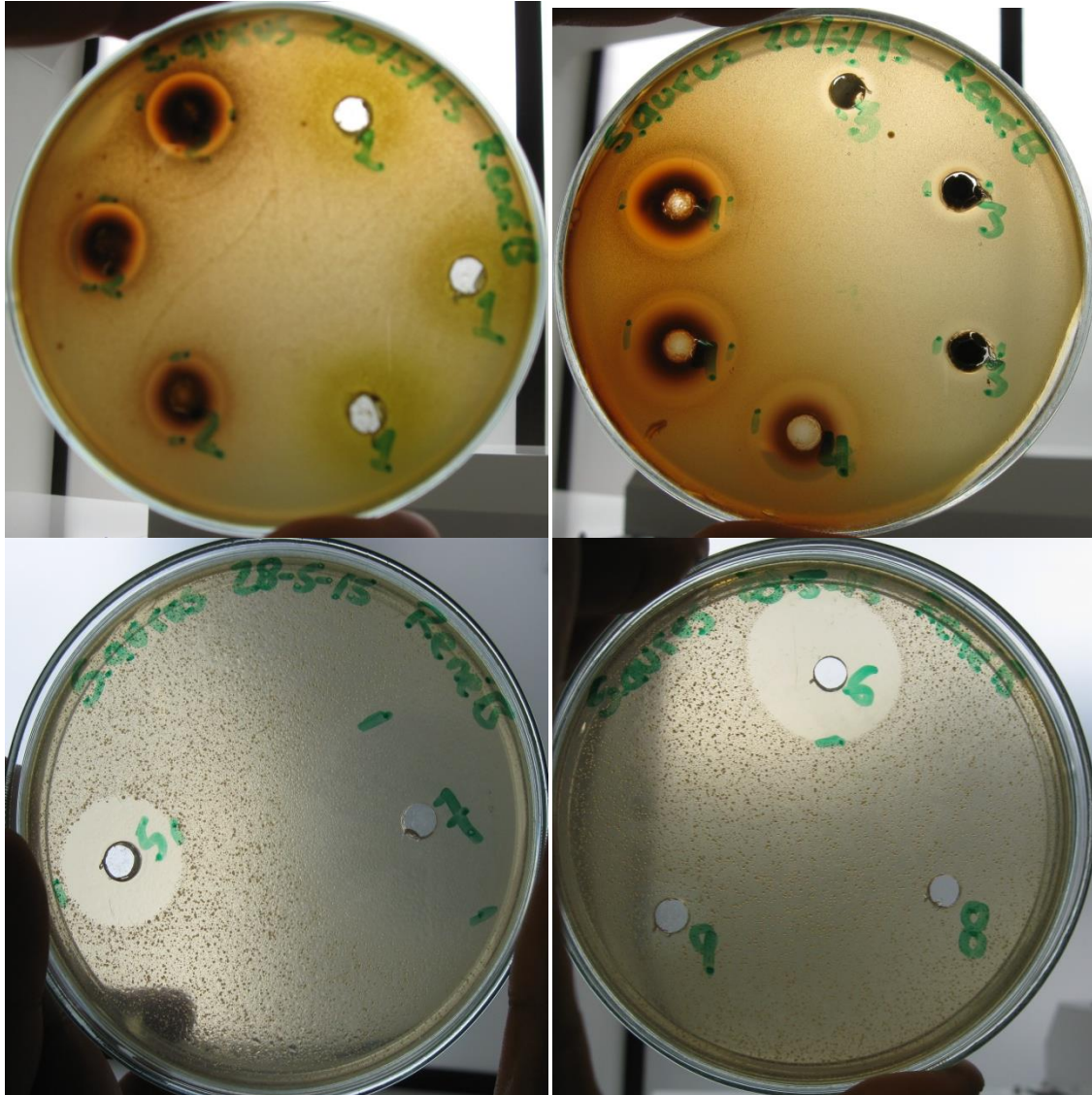


Figura 28: Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de *D. alaternoides* frente a *S. aureus*.

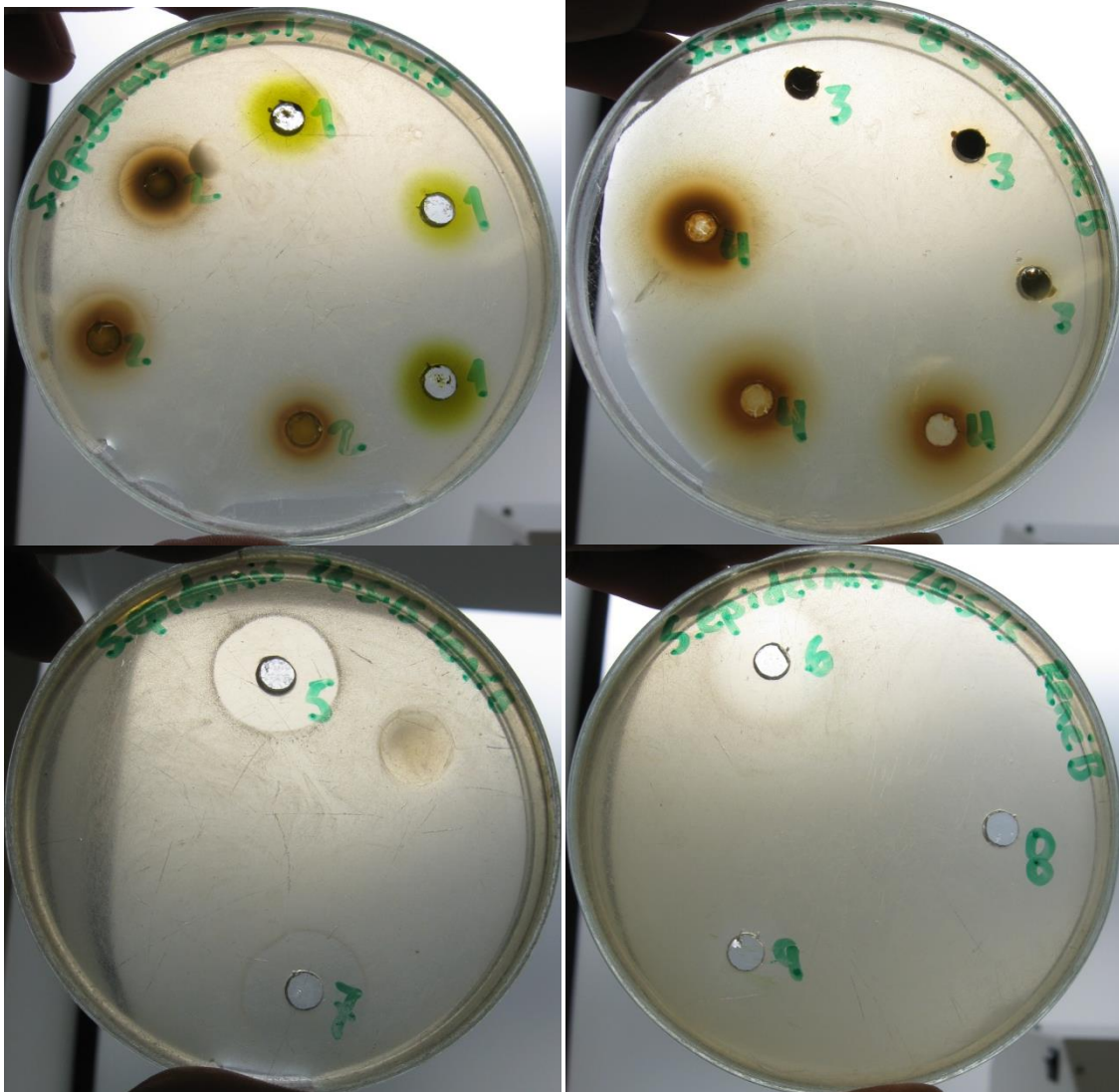


Figura 29. Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de *D. alaternoides* frente a *S. epidermidis*.

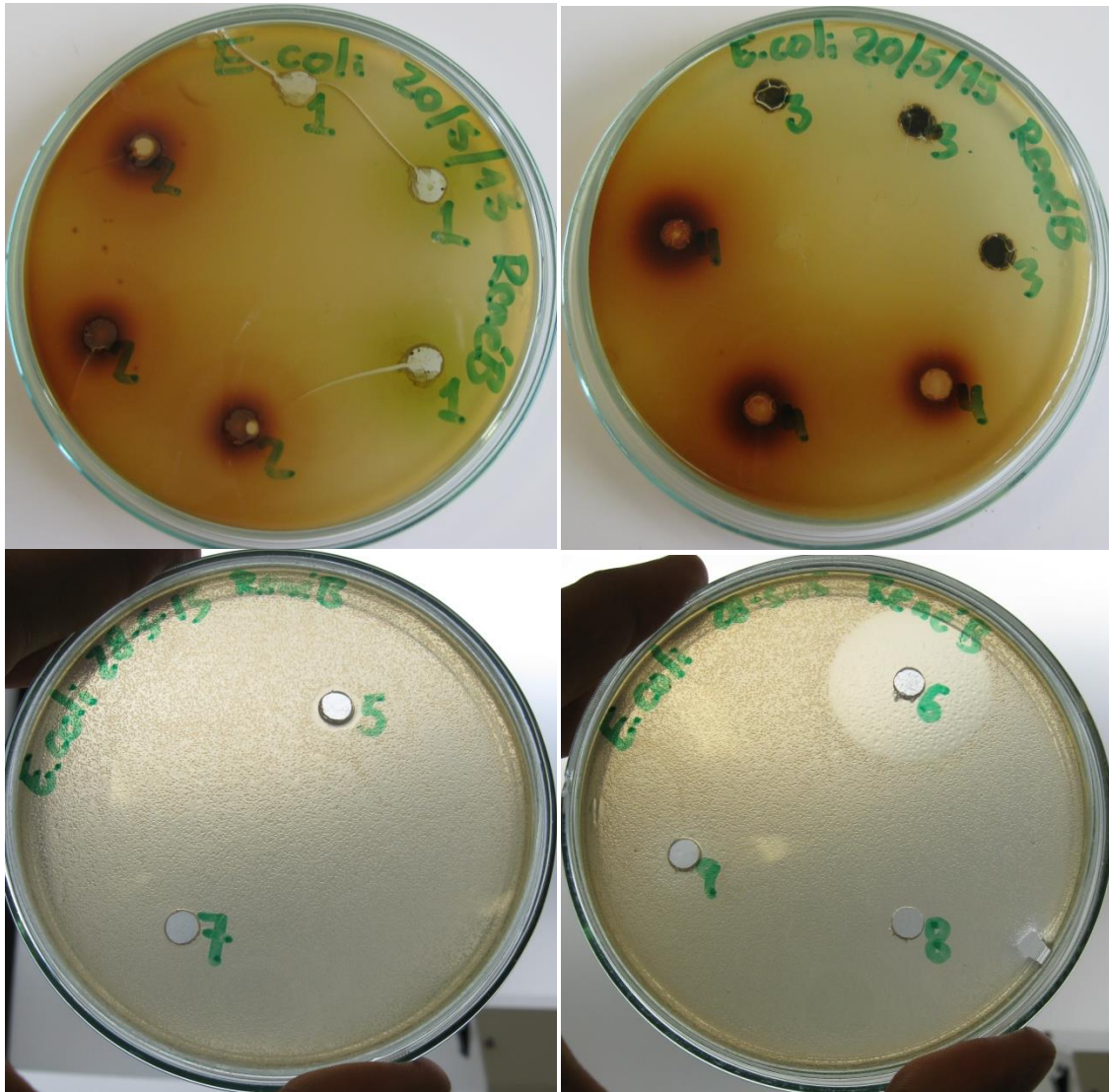


Figura 30. Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de *D. alaternoides* frente a *E. coli*.

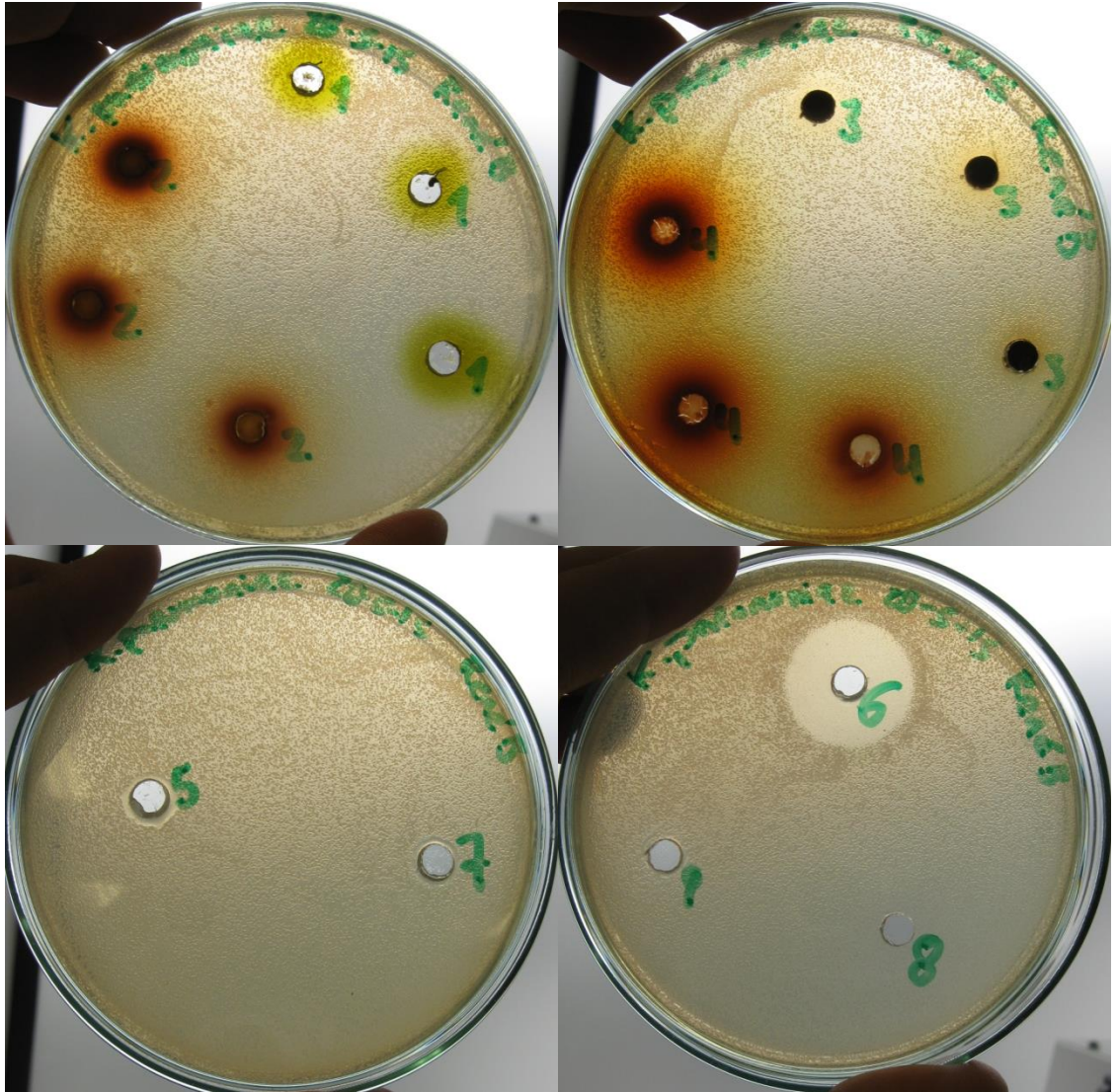


Figura 31. Actividad antibacteriana de los Extractos y Fracciones de *D. alaternoides* frente a *K. pneumoniae*.

Las actividades antibacterianas de los extractos y fracciones de los ensayos se determinaron mediante la medición del diámetro del halo de inhibición en milímetros y se calculó el porcentaje de inhibición.

Para los cálculos de porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula, los resultados se reportan en las siguientes tablas:

$$\% \text{ de Inhibición} = (\text{Halo extracto- pozo} / \text{halo control positivo- pozo}) \times 100$$

Solución	Halo	Halo promedio	Halo Promedio Vancomicina	% Inhibición
Exto EtOH	7mm	8.66mm	17mm	50.98%
	9mm			
	10mm			
Fracc. Diclorometano	3mm	4mm	17mm	23.52%
	4mm			
	5mm			
Fracc. Acetato etilo	8mm	10mm	17mm	58.82%
	10mm			
	12mm			

Tabla 5. Porcentaje de inhibición en *S. aureus* respecto al control positivo Vancomicina de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*

Solución	Halo	Halo promedio	Halo Promedio Ampicilina	% Inhibición
Exto EtOH	7mm	8.66mm	26mm	33.33%
	9mm			
	10mm			
Fracc. Diclorometano	3mm	4mm	26mm	15.38%
	4mm			
	5mm			
Fracc. Acetato etilo	8mm	10mm	26mm	38.46 %
	10mm			
	12mm			

Tabla 6. Porcentaje de inhibición en *S. aureus* respecto al control positivo Ampicilina de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*

Solución	Halo	Halo promedio	Halo Promedio Sulfamethoxazole	% Inhibición
Exto EtOH	7mm	8.66mm	22mm	39.39%
	9mm			
	10mm			
Fracc. Diclorometano	3mm	4mm	22mm	18.18%
	4mm			
	5mm			
Fracc. Acetato etilo	8mm	10mm	22mm	45.45%
	10mm			
	12mm			

Tabla 7. Porcentaje de inhibición en *S. aureus* respecto al control positivo Sulfamethoxazole de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*

Solución	Halo	Halo promedio	Halo Promedio Vancomicina	% Inhibición
Exto EtOH	7mm	7.333mm	14mm	52.38%
	7mm			
	8mm			
Frac. Acetato etilo	8mm	9.666mm	14mm	69.04%
	10mm			
	11mm			

Tabla 8. Porcentaje de inhibición en *S. epidermidis* respecto al control positivo Vancomicina de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*

Solución	Halo	Halo promedio	Halo Promedio Ampicilina	% Inhibición
Exto EtOH	7mm	7.333mm	12mm	61.11%
	7mm			
	8mm			
Frac. Acetato etilo	8mm	9.666mm	12mm	80.55%
	10mm			
	11mm			

Tabla 9. Porcentaje de inhibición en *S. epidermidis* respecto al control positivo Ampicilina de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*

Solución	Halo	Halo promedio	Halo Promedio Sulfamethoxazole	% Inhibición
Exto EtOH	7mm	7.333mm	13mm	56.41%
	7mm			
	8mm			
Frac. Acetato etilo	8mm	9.666mm	13mm	74.35%
	10mm			
	11mm			

Tabla 10. Porcentaje de inhibición en *S. epidermidis* respecto al control positivo Sulfamethoxazole de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*

En términos generales el extracto etanólico tiene una actividad antibacteriana promisoría que se ve aumentada cuando a dicho extracto se le fracciona y se determina que la Fracción Acetato de etilo presenta mejores rendimientos al encontrarse un poco más pura la mezcla de metabolitos.

Se pudo determinar también, que la bacteria más sensible a los extractos y fracciones es la *S. epidermidis* donde se presentaron los porcentajes de inhibición más altos y donde la fracción de Diclorometano no se mostro activa.

Los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides* muestran una actividad nula frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*, por lo que se puede determinar que no muestra una actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-negativas

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos propuestos y el trabajo realizado durante esta investigación se pudo determinar qué:

El estudio fitoquímico preliminar de la especie *Disterigma alaternoides* Kunth permitió conocer cualitativamente los grupos de metabolitos que constituyen la especie y dichos metabolitos se muestran promisorios en la acción biológica.

Las pruebas químicas preliminares pudieron determinar la presencia de Flavonoides, Esteroides, Terpenos, Fenoles, Cumarinas y Quinonas. También se pudo determinar que la especie no posee alcaloides ya que todas las pruebas de identificación para alcaloides fueron negativas.

En los estudios cromatográficos se pudo determinar que existen grupos de metabolitos interesantes en las fracciones del extracto etanólico que merecen ser aislados e identificados para continuar enriqueciendo los conocimientos químicos de la especie *Disterigma alaternoides*.

Los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides* muestran actividad biológica frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, lo que los convierte en extractos promisorios para bacteria de tipo Gram-positiva, pero en contraste se evidencia una actividad nula frente a *E.coli* y *K.pneumoniae*, por lo que se determina que no son útiles frente a las bacterias Gram-negativas

El extracto etanólico es el más activo de los extractos y la actividad antibacteriana se ve aumentada cuando a dicho extracto se fracciona, siendo la fracción Acetato de etilo la que presenta los mejores porcentajes de rendimiento al encontrarse más puras las mezclas de metabolitos.

7. RECOMENDACIONES

Al observar los resultados obtenidos, se propone continuar el trabajo en la especie, para añadir en la sustentación de Tesis en la Universidad Distrital que complementan este trabajo.

Aislar, purificar e identificar al menos una sustancia de la fracción Diclorometano y la fracción Acetato de etilo.

Realizar un estudio de Bioautografía para determinar los grupos de metabolitos que presentan actividad en los extractos y fracciones frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*

Evaluar diferentes tipos de actividad biológica de los extractos y fracciones de *Disterigma alaternoides*.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, R., Carvalho, C., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., Londoño, J. (2011). Citrus Juice Extraction Systems: Effect on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Clementine Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 774- 781.

Bennini, B. y Chulia, A. J. 1994. Flavonol glycosides from *Erica cinerea*. *Journal of Natural Products*. 57, 178-180.

Bilbao, M. R. (1997). *Análisis fitoquímico preliminar: química de los productos naturales*. Universidad del Quindío. Armenia. Colombia.

Bolliger, H., Brenner, M., Ganshirt, H., Seiler, H., Stanhi, E., & Waldi, D. (1965). *Thin layer chromatography a laboratory handbook*. Academic Press. Springer Verlac. 553 p.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). *Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*. *Lebensm. Wiss. Technol* 22, 25-30.

Bruneton, J. (2001). *Plantas Tóxicas, vegetales peligrosos para el hombre y los animales* (pp. 241-247). Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Colorado, J., Galeano, E. y Martínez, A. (2007). *Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra Escherichia coli*. Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Crowden, R., Jarman, S. (1976). Anthocyanins in the genus *Erica*. *Phytochemistry*. 15(11): 1796-1797.

Font Quer, P. (2001). *Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado*. Barcelona: Ediciones Península, Tercera Edición. Pp 350.

Global Biodiversity Information Facility (GBIF). <<http://www.gbif.org/species>> 25 de noviembre de 2015

Grupo consultor Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. (2009). *La cadena de valor de los ingredientes naturales del Biocomercio para las industrias Farmacéutica, Alimentaria y Cosmética – FAC*. Informe de consultoría para el Fondo de Biocomercio. Bogotá, Colombia.

Guía de Consultas Botánica II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) DILLENIDAE-Ericaceae

Luillier, A., Fabre, N., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fourasté, I., Moulis, C. (2007). Comparison of flavonoid profiles of *Agauriasalicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1160: 13-20.

Larralde – Corona C.P. (1996). *Cinética de crecimiento de hongos filamentosos: Morfometría de los micelios de A. niger y G. Fujikuroiy su posible utilización en la*

predicción de la tasa específica de crecimiento. Tesis de Doctorado. UAM. Iztapalapa. México.

Luteyn J. L. (1996). 54. Ericaceae. Flora of Ecuador 56: 1 - 404.

Luteyn J. L. (1999). Páramos: A check list of plant diversity, geographical distribution and botanical literature. Memoirs of the New York Botanical Garden 84: 1 - 278.

Luteyn J. L. y Pedraza P. Consultada 16 septiembre, 2014. Ericaceae – Neotropical Blueberries. The New York Botanical Garden. Disponible en <http://www.nybg.org/bsci/res/lut2/main.html>

Mabberley D. J. (1997). The Plant-Book: A portable dictionary of the higher plants.
Orhan, I., Küpeli, E., Terzioglu, S., Yesilada, E. 2007. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. *Journal of Ethnopharmacology*.114: 32-37.

Marcano D. y Hasegawa M. (1991). *Fitoquímica Orgánica. 1Ed-Universidad Central de Venezuela. Venezuela.*

Naciones Unidas. (2010). *Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad biológica.* Convenio sobre la Diversidad Biológica. Montreal, Quebec; Canadá.

Nagy, S., Köszegi, T., Botz, L., y Kocsis, B. (2003). *Optimization of conditions for culture of test bacteria used for direct bioautography-TLC detection.* 1. The Gram-Positive Test Bacterium *Bacillus subtilis*. *J Planar Chromatography* 15: 132-137. 2. Gram-negative test bacterium: *Escherichia coli*. *J. Planar Chromatography*; 16: 121-126.

Patiño, M. (2001). *Los Bionegocios: perspectivas del sector privado. Biocomercio: Estrategias para el Desarrollo Sostenible en Colombia.* Instituto de Investigación Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia

Pawłowska, A. M., De Leo, M. y Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10234-10238.

Pedraza, P. Systematics of the Neotropical Blueberry Genus *Disterigma* (Ericaceae). *Systematic Botany*. 2009. 34(2):406-413.

Pedraza. P. P. (2010). Insensitive blueberries: a total-evidence analysis of *Disterigma* s.l. (Ericaceae) exploring transformation costs. *Cladistics* .26: 388-407.

Pedrozo, J. (2001). *Química y actividad antimicrobiana de plantas autóctonas Colombianas.* Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia.

Pino, B, N. (1993). *Estudio químico de los componentes lipofílicos mayoritarios de hojas y frutos de *disterigma alaternoides*(HEK) ericaceae vacciniaceae.* Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia.

Plazas, G, E. (2011). Estudio fitoquímico y de actividad biológica de dos especies altoandinas JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS. Contrato 660-2010. Bogotá.

Plazas, G, E. (2012). Análisis fitoquímico y actividad biológica de tres especies nativas de las áreas rurales del distrito capital. JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS. Contrato 758-2012. Bogotá.

Plazas, G, E. (2013). Análisis Fitoquímicos y de actividad biológica de seis especies nativas de las áreas rurales del distrito capital. JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS. Contrato 758-2012. Bogotá.

Santana, I. (2010). *Estudio químico de la especie colombiana pentacalia abietina (willd. ex. wedd) cuatr. como nueva fuente natural de compuestos tipo kaurano y quinol.* Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

Smith, A. The Genera Sphyraspermum and Disterigma. Brittonia. 1993, 1(4): 203-232. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 19 septiembre 2014 <<http://www.tropicos.org/Name/40022317>>

Wilbur, R. A Synopsis of the Genus Disterigma (Ericaceae: Vaccinieae) in Mexico and Central America with the Description of Two Previously Undescribed Species. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 1992. 119(3):280-288.

Zhang, B., He, X., Ding, Y. y Du, G. (2006). Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug. *European Journal of Pharmacology*, 530: 166-171.

Zhang, Z., Guo, D., Li, C., Zheng, J., Koike, K., Jia, Z. y Nikaido T. (1999). Two diterpenoids from the roots of *Gaultheria yunnanensis*. *Journal of Natural Products*.62: 297-298.