

**UNIDAD DIDÁCTICA PARA LA ENSEÑANZA DE CONCEPTOS ASOCIADOS
A LA FITOQUÍMICA A PARTIR DE UN PERFIL QUÍMICO DE EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE LAS ESPECIES *Croton funckianus* Y *Croton bogotanus*
(EUPHORBIACEAE).**

FABIO ANDRÉS CASTIBLANCO ROJAS.

Código: 2009210023.

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA NACIONAL.

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA.

BOGOTÁ D.C.

2014.

**UNIDAD DIDÁCTICA PARA LA ENSEÑANZA DE CONCEPTOS ASOCIADOS A
LA FITOQUÍMICA A PARTIR DE UN PERFIL QUÍMICO DE EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE LAS ESPECIES *Croton funckianus* Y *Croton bogotanus*
(EUPHORBIACEAE).**

FABIO ANDRÉS CASTIBLANCO ROJAS.

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título
de**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA.

DIRIGIDA POR.

MSc. NUBIA LADINO OSPINA.

CODIRIGIDA POR:

PhD. CARLOS ANDRÉS COY BARRERA.

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA NACIONAL.

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA.

BOGOTÁ D.C.

NOTA DE ACEPTACIÓN.

Jurado No 1.

Jurado No 2.

Bogotá. Diciembre 01 de 2014.



DEDICATORIA.

Con todo mi cariño y amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mi sueño como Licenciado en Biología. Por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi más profundo pero sincero agradecimiento .

A mi padre Fabio Alonso y a mi madre María Edíth.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, la vida, mis padres Fabio Alonso Castiblanco y María Edith Rojas Romero, ya que siempre han creído en mí; a mis hermanos Edwin Camilo y Leidy Julieth por guiarme, ofrecerme el apoyo y orientación a lo largo de mi formación, darles a ellos muchas gracias por su infinito amor y confianza.

A la Universidad Pedagógica Nacional, su Facultad de Ciencia y Tecnología, al Departamento de Biología y a la línea de Investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica por formarme como licenciado en biología, a la gran oportunidad y orientaciones que me ofrecieron para ser el maestro de hoy con ayuda de cada uno de los profesores que estuvieron acompañándome dentro y fuera de las aulas.

A la Magister en Educación y Sistemática Vegetal Nubia Ladino Ospina y al Doctor en Ciencias-Química Carlos Andrés Coy Barrera por haberme dado la oportunidad de trabajar en sus grupos de investigación “Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica” e “INQUIBIO” por brindarme dedicación, orientación, conocimiento, amistad, apoyo total en la última etapa de mi formación como Licenciado en Biología.

A los profesores Ericsson David Coy Barrera, Lorena Orduz, Diana Gómez, Willy Cely, Camilo Guerrero y demás personal del laboratorio de química orgánica (Bioorgánica) de la Universidad Militar Nueva Granada por prestarme sus instalaciones y orientarme en la utilización de sus equipos para el desarrollo de este proceso de investigación, además de su amistad.

A mis amigos y licenciados en formación a Cristhian Matiz, Miller Urquijo, Esteban Romero, Jefferson Lozano, Frank Reyes, Kevin Silva y Andrés Becerra por ser un punto de apoyo y compañía de aventuras en este último año como estudiante de pregrado.

Por último a Johanna Cárdenas y Fabián Bautista, además a todas aquellas personas, profesores, compañeros de estudio que aunque no nombre, hicieron parte de mi formación académica y personal, a todos ellos infinitas gracias.

RESUMEN ANALÍTICO EDUCATIVO (RAE).

1. Información General	
Tipo de documento	Trabajo de grado.
Acceso al documento	Universidad Pedagógica Nacional. Biblioteca Central.
Título del documento	Unidad didáctica para la enseñanza de conceptos asociados a la fitoquímica a partir de un perfil químico de extractos etanólicos de las especies <i>Croton funckianus</i> y <i>Croton bogotanus</i> (Euphorbiaceae).
Autor(es)	Castiblanco Rojas, Fabio Andrés.
Director	M.Sc Sistemática Vegetal y Educación Nubia Ladino Ospina.
Publicación	Bogotá. Universidad Pedagógica Nacional. 2014. 160 p.
Unidad Patrocinante	Universidad Pedagógica Nacional.
Palabras Claves	Unidad didáctica, Enseñanza de la Botánica, Fitoquímica, Compuestos secundarios de plantas, Euphorbiaceae.

2. Descripción
<p>El trabajo de grado que se propone es el diseño de una unidad didáctica que posibilite la enseñanza de la botánica tomando como punto de referencia y de partida la fitoquímica ya que es un área que permite integrar los conocimientos biológicos y químicos que son relevantes en la formación de maestros pertenecientes al Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología (PCLB) de la Universidad Pedagógica Nacional (U.P.N.) Es una propuesta que le apunta a generar material educativo que permita en una primera instancia, abordar el análisis y la resolución de problemas de diferentes aspectos biológicos desde la química. Por otro lado, la de formar estudiantes desde los elementos conceptuales, procedimentales y actitudinales relacionados con la enseñanza de la botánica para que puedan ser aplicados con sus estudiantes desde su quehacer profesional. Esta propuesta contribuye a la interdisciplinariedad de las Ciencias Naturales.</p>

3. Fuentes
<p>Bilbao, M. 1997. Análisis fitoquímico preliminar: Química de los productos Naturales. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Quindío. Oficina de publicaciones. Armenia, Quindío, Colombia.</p> <p>Campos, A., Vargas, L. 2008. Diseño de una unidad didáctica con énfasis en metabolitos secundarios determinados cualitativamente, alcaloides y flavonoides de la especie <i>Ficus andicola</i>. Tesis para optar el título de Licenciadas en Química. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Pedagógica Nacional. Bogotá.</p> <p>Castillo, H. 2008. Aprendizaje de conceptos químicos desde el análisis fitoquímico del Madroño aplicando enseñanza para la comprensión. <i>Tev. IIEC</i>. 2 (3): 35-40.</p> <p>Cronquist, A. 1981. Lista de las clases, subclases, órdenes y familias de las angiospermas de acuerdo con el sistema de clasificación de Cronquist. Universidad de Columbia. NY, USA.</p> <p>Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación Fitoquímica. Departamento de Química Orgánica. Instituto Tecnológico y Estudios superiores de Monterrey. Limusa: Ciudad de México, México.</p>

Murillo J. 1999. Composición y Distribución del género *Croton* (Euphorbiaceae) En Colombia Con Cuatro Especies Nuevas. Rev. *Caldas*: 21 (2): 141-166.

San Martí, N. 2002. Didáctica de las ciencias en la educación secundaria obligatoria. Madrid: Síntesis Educación.

Sanabria, A. 1983. Notas sobre análisis fitoquímico preliminar de plantas para el laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

Grupo Integrado de Investigaciones en Química y Biología "Inquibio" Universidad Militar Nueva Granada. 2014.

4. Contenidos

INTRODUCCIÓN: En la cual se resalta la importancia de la fitoquímica como un elemento emergente que posibilita el acercamiento a la botánica a partir de análisis químicos y su importancia en el estudio de las ciencias biológicas.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA: Donde se menciona la importancia de contribuir a la enseñanza de la fitoquímica, botánica y en general de las Ciencias Naturales a nivel de educación básica secundaria y universitaria a partir de la creación de estrategias didácticas que le posibiliten tanto maestros como estudiantes cambiar concepciones y fomentar en el entendimiento de los procesos biológicos.

JUSTIFICACIÓN: Se posiciona desde diferentes esferas, desde el campo disciplinar resaltando la importancia química de las plantas para la validación de conocimientos en las comunidades científicas y académicas y desde el plano educativo resaltando el valor que tiene los saberes disciplinares en el campo de la enseñanza y aprendizaje de las ciencias naturales, estos dos referenciados desde instituciones de carácter institucional y gubernamental.

ANTECEDENTES: Diversas investigaciones que condujeron la continuación de investigaciones dentro de la familia de las euforbiáceas además de poderlas articular al campo educativo: Vegas; 2010., Vegas *et al.*, 2011., Chiappe. 2013., Riveros y Gómez, 2007., Campos y Vargas. 2008., Castillo. 2008.

OBJETIVOS: General: Diseñar una unidad didáctica para la enseñanza de conceptos en fitoquímica a partir de un perfil químico de extractos etanólicos de las especies *Croton funckianus* y *Croton bogotanus* (Euphorbiaceae.) **Específicos:** Caracterizar los extractos obtenidos de una de las especies de *Croton* mediante un análisis fitoquímico preliminar para determinar la posible presencia de algunos núcleos de metabolitos secundarios. Evaluar la capacidad antioxidante, el contenido total de fenoles y flavonoides de los extractos obtenidos mediante la captación de radicales libres por acción sobre DPPH, ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente. Establecer la variabilidad química en un estudio preliminar respecto a los componentes mayoritarios presentes en los extractos obtenidos mediante el perfilamiento por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE). Diseñar estrategias de enseñanza y aprendizaje encaminadas a lograr un cambio conceptual sobre conceptos asociados a la fitoquímica, en estudiantes del Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología (PCLB).

MARCO REFERENCIAL: Conceptos estructurantes del trabajo: Genero *Croton*, etnobotánica, flavonoides y unidad didáctica.

DISEÑO METODOLÓGICO: Disciplinar biológico-químico: Recolección y clasificación del material vegetal en el municipio de Fusagasugá y Bogotá, obtención de los extractos etanólicos, Análisis fitoquímico preliminar para metabolitos secundarios tipo alcaloide, flavonoide, taninos y carotenoides (Sanabria; 1983), cuantificación de fenoles totales (Durst y Wrolstad; 2001), cuantificación de flavonoides (Bernal *et al.*, 2013), Determinación de la capacidad antioxidante por método DPPH (Brand y Williams; 1995), análisis de los extractos etanólicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE), criterios de validez y confiabilidad: cálculo del promedio del metabolito secundario, cálculo del IC₅₀ derivado de la capacidad antioxidante por el software PRIMS GraphPad 6.0. ANOVA y prueba Tukey mediante el software InfoStat versión 2014. Cromatograma diseñado mediante el paquete estadístico ORIGIN 9.0 y Análisis de Componentes Principales mediante el software SIMCA Versión 13.0.332. **Pedagógico.** Fase 1: Identificación de la problemática. Fase 2: Diseño de la unidad didáctica: Fase 3: Construcción de la Unidad Didáctica: Fase 4: Resultados y validez de la Unidad didáctica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN Obtención de los resultados a partir de los objetivos planteados en el trabajo de grado que logró establecerse a partir del contenido de polifenoles y el análisis fitoquímico preliminar. El presente trabajo permite evidenciar que para la estructuración de materiales educativos es necesario realizar un estudio riguroso y sistemático de tópicos de interés socio-científico, con el propósito de darle validez a los materiales educativos que se usan en la enseñanza de las ciencias biológicas y en particular para la enseñanza de la temática de interés.

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES: Se logró determinar la presencia de metabolitos secundarios tipo flavonoide y alcaloide principalmente. Los 14 extractos presentaron cantidades significativas del contenido de polifenoles y flavonoides además de su posible caracterización como agentes antioxidantes. El cromatograma presentó un comportamiento similar, además el análisis estadístico posibilitó determinar que las variables estudiadas presentan diferencias estadísticas significativas. Desde el punto de vista pedagógico se recomienda en aplicar a totalidad el contenido presente en la unidad didáctica como un elemento posibilitador de la enseñanza de las ciencias naturales.

5. Metodología

Se realizó una colecta de 5 muestras de *C. funckianus* localizadas en el municipio de Fusagasugá (Cundinamarca-Colombia) y 9 muestras de *C. bogotanus* en las localidades de Teusaquillo y Usaquén ubicadas en la ciudad de Bogotá las cuales fueron determinadas taxonómicamente por el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (ICN).

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar (AFP) sobre un extracto etanólico seco proveniente de hojas de la especie *C. funckianus* con el fin de evaluar su composición en cuanto al contenido y presencia de metabolitos secundarios. Adicionalmente, se evaluó la capacidad antioxidante de los 14 extractos etanólicos por el método de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrílhidrazilo (DPPH), el contenido polifenólico mediante el método de Folin-Ciocalteu y el contenido de flavonoides totales mediante la reacción con tricloruro de aluminio (AlCl₃).

Los resultados para el contenido de fenoles totales y flavonoides están representados como el promedio del metabolito secundario hallado. Para el análisis de la actividad antioxidante se empleó el software PRISM GraphPad 5.0® con el cual se calculó el IC₅₀ (Índice de inhibición media) de cada uno de los extractos etanólicos. Así mismo, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Finalmente, las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de DSH (Diferencia significativa honesta) de *Tukey*, con el fin de encontrar diferencias significativas entre los

datos a un nivel de $P \leq 0.05$ utilizando el software InfoStat versión 2014. Se realizó un análisis de componentes principales con el paquete estadístico SIMCA versión 13.0. 332.

El modelo seleccionado para el diseño de la unidad didáctica orientada a la enseñanza y aprendizaje de los conceptos fitoquímica y metabolitos secundarios, utilizando un grupo de moléculas de interés biológico (flavonoides) y validado de forma oral con los estudiantes de la facultad de Ciencia y Tecnología inscritos en el componente electivo “mundo de las plantas” ofertado por la línea de investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica de la UPN. El diseño tiene un doble propósito: en primer lugar proporcionar referencias teóricas que puedan fundamentar la toma de decisiones del profesor en la planificación y en segundo lugar, facilitar un procedimiento para abordar cada una de las tareas propuestas. Por esta razón, se presentara en cada módulo de la unidad un análisis didáctico en la selección de contenidos, objetivos de enseñanza, la selección de estrategias didácticas como pilares necesarios en el diseño de la unidad didáctica.

6. Conclusiones

El análisis fitoquímico preliminar permitió demostrar la presencia de metabolitos secundarios tipo alcaloide y flavonoide principalmente.

La prueba con el reactivo de Folin-Ciocalteu en presencia de Na_2CO_3 reveló que los 14 extractos etanólicos derivados de las muestras de *Croton* poseen contenido polifenólico debido a la presencia de compuestos aromáticos que poseen un grupo hidroxilo $-\text{OH}$ unidos a un anillo aromático en su estructura; los cuales fueron detectados a 765 nm.

Por otro lado la reacción con FeCl_3 en presencia de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ de igual manera, permitió comprobar la presencia de flavonoides en los 14 extractos etanólicos debido a la formación de cromóforos basados en el complejo flavonoide-aluminio, orto-dihidroxilados de color amarillo detectados a una longitud de onda de 420 nm.

El método de decoloración del radical DPPH demostró que las 14 muestras poseen capacidad antioxidante detectado por el uso de la técnica espectrofotométrica además se su cuantificación mediante el cálculo del IC_{50} sin embargo, cabe resaltar que las presentaron una mejor capacidad fueron las muestras CF_2 , CF_5 y CB_8 .

El análisis por CLAE-DAD reveló que los 14 extractos etanólicos sometidos a evaluación presentaron un mismo comportamiento en el cromatograma además de, evidenciar un pico mayoritario cercano a los 11 minutos de corrida que es altamente probable que corresponda a un posible compuesto flavonoide.

La elaboración de la UD permitió el ejercicio de identificar particularidades de la enseñanza de las ciencias naturales, por otro lado, el desarrollo de la propuesta busca generar un pensamiento crítico, científico, constructivo y reflexivo en los estudiantes que la apliquen, y así estimular la sistematización de experiencias de aula que sirva de sustento a discusiones en redes y en comunidades pedagógicas que fortalezcan la enseñanza aprendizaje de las ciencias.

Elaborado por:	Castiblanco Rojas, Fabio Andrés.
Revisado por:	Ladino Ospina, Nubia.

Fecha de elaboración del Resumen:	01	12	2014.
--	----	----	-------

TABLA DE CONTENIDO.

	INTRODUCCIÓN.....	21
1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
1.1	Delimitación del problema.....	24
2.	JUSTIFICACIÓN.....	25
3.	ANTECEDENTES.....	28
4.	OBJETIVOS.....	35
4.1	Objetivo general.....	35
4.2	Objetivos específicos.....	35
5.	MARCO REFERENCIAL.....	36
5.1	Generalidades de la familia Euphorbiaceae.....	36
5.2	Clasificación taxonómica y datos generales de las especies <i>Croton funckianus</i> y <i>Croton bogotanus</i>	37
5.3	Distribución del género <i>Croton</i> en Colombia.....	38
5.4	Flavonoides.....	39
5.5	Etnobotánica.....	40
5.6	Unidad didáctica.....	41
6.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	43
6.1	Estandarización de técnicas.....	43
6.2	Muestreo y clasificación.....	44
6.3	Procesamiento del material vegetal y elaboración de los extractos etanólicos.....	44
6.4	Análisis Fitoquímico Preliminar (A.F.P).....	44
6.4.1	Alcaloides.....	45
6.4.2	Flavonoides.....	45

6.4.3	Taninos.....	45
6.4.4	Carotenoides.....	46
6.5	Cuantificación de fenoles totales.....	46
6.6	Cuantificación de flavonoides.....	46
6.7	Determinación de la capacidad antioxidante.....	46
6.8	Análisis por CLAE.....	47
6.9	Criterios de validez y confiabilidad.....	47
6.10	Realización de la unidad didáctica.....	48
6.10.1	Fase de construcción y diseño de la unidad didáctica.....	48
7.	RESULTADOS: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1	Recolección del material vegetal.....	50
7.2	Elaboración de los extractos etanólicos y obtención de los extractos secos.....	52
7.3	Análisis fitoquímico preliminar (A.F.P).....	55
7.3.1	Alcaloides.....	56
7.3.2	Flavonoides.....	59
7.3.3	Carotenoides.....	59
7.3.4	Taninos.....	60
7.4	Contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante.....	61
7.4.1	Contenido de fenoles totales.....	63
7.4.2	Contenido de flavonoides.....	65
7.4.3	Análisis de la capacidad antioxidante.....	66
7.5	Análisis por CLAE.....	70
7.6	Análisis de componentes principales.....	73

7.7	Discusión de la construcción de la unidad didáctica.....	75
7.7.1	Fase 1: Identificación de la problemática.....	77
7.7.2	Fase 2: Construcción de la unidad didáctica.....	78
7.7.3	Fase 3: Discusion de la unidad didáctica.....	79
7.7.3.1	Unidad 1: Constituyentes secundarios de plantas.....	79
7.7.3.2	Unidad 2: Flavonoides y compuestos afines.....	80
8.	CONCLUSIONES.....	82
9.	RECOMENDACIONES.....	83
10.	PERSPECTIVA.....	84
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	85

LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1	Hojas y frutos e inflorescencia de la especie <i>C. funckianus</i> .	37
Fig. 2	Distribución del genero <i>Croton</i> en países neotropicales. Adaptado de Murillo; 1999.....	39
Fig. 3	Estructura básica de un flavonoide.....	39
Fig. 4	Diseño metodológico.....	43
Fig. 5	Posición geográfica de la colección de las especies de <i>Croton</i> en el municipio de Fusagasugá, Ubicado en el departamento de Cundinamarca. Colombia.....	50
Fig. 6	Posición geográfica de la colección de las especies de <i>Croton bogotanus</i> (CB1: Rojo, CB2: Morado) en el sector de la séptima. Ubicado en Bogotá. Colombia.....	51
Fig. 7	Posición geográfica de la colección de las especies de <i>Croton bogotanus</i> (CB4: Rojo, CB5: Negro, CB6: Azul, CB7: Morado, CB8: Azul claro CB9: Violeta y CB10: Naranja) en la zona del Park Way, Ubicado en la localidad de Teusaquillo, Bogotá. Colombia.....	51
Fig. 8	Algunas muestras del material vegetal homogenizado para la elaboración de los extractos etanólicos.....	52
Fig. 9	Extractos etanólicos, filtrados y colocados en el rotaevaporador. Equipo actualmente presente en la U.M.N.G.....	53
Fig. 10	Relación entre los pesos finales del material vegetal homogenizado y el peso final de los extractos secos después de rotaevaporados. Cantidad dada en gramos con barras de error del 5%. (MH: Material Homogenizado, MS: Material seco).....	54
Fig. 11	Se muestra la precipitación de las clorofilas con presencia de Acetato de Plomo, evidenciándose en el precipitado del tubo de Eppendorf.....	56
Fig. 12	Prueba para evaluar la presencia de flavonoides, en el primer lugar en la placa de excavado se encuentra el patrón quercetina y en el último lugar la presencia del extracto de <i>C. funckianus</i> con coloración amarilla.....	59

Fig. 13	Resultados de la segunda prueba realizada para determinar la presencia de Taninos.....	60
Fig. 14	Prueba para carotenoides, se observa una fase intermedia en medio de la solución pero no se obtiene los resultados esperados por la literatura reportada, deben verse colores amarillos, naranjas o rojos pero como se observa se ve es una coloración oscura.....	61
Fig. 15	Extractos etanólicos empleados para el análisis del contenido total de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.....	62
Fig. 16	Contenido de fenoles totales de las muestras de <i>Croton</i> . Valores (\pm) intervalo de confianza como resultado de tres replicas.....	64
Fig. 17	Contenido de flavonoides de las muestras de <i>Croton</i> . Valores (\pm) intervalo de confianza como resultado de tres replicas.....	66
Fig. 18	Decoloración del color del reactivo DPPH en los extractos etanólicos.....	67
Fig. 19	IC ₅₀ <i>C. funckianus</i> (CF ₁).....	67
Fig. 20	IC ₅₀ <i>C. funckianus</i> (CF ₂).....	67
Fig. 21	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CF ₃).....	67
Fig. 22	IC ₅₀ <i>C. funckianus</i> (CF ₄).....	67
Fig. 23	IC ₅₀ <i>C. funckianus</i> (CF ₅).....	68
Fig. 24	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₁).....	68
Fig. 25	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₂).....	68
Fig. 26	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₄).....	68
Fig. 27	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₅).....	68
Fig. 28	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₆).....	68
Fig. 29	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₇).....	69
Fig. 31	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₈).....	69

Fig. 31	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₉).....	69
Fig. 32	IC ₅₀ <i>C. bogotanus</i> (CB ₁₀).....	69
Fig. 33	Cromatograma obtenido por el método HPLC para los 14 extractos de Croton software ORIGIN 5.0.....	72
Fig. 34	Análisis de componentes principales de las variables del contenido total de fenoles, contenido de Flavonoides y Capacidad antioxidante.....	74
Fig. 35	Fases de elaboración de la Unidad didáctica.....	77

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1	Constituyentes químicos aislados de diferentes partes del corno de algunas especies del genero <i>Croton</i> . Tomado y adaptado de Vegas 2010.....	30
Tabla 2	Distribución de algunos flavonoides pertenecientes a especies dentro del género <i>Croton</i> . Tomado y adaptado de Vegas; 2010.....	30
Tabla 3	Estructura de algunos flavonoides aislados de las partes vegetativas del género <i>Croton</i>	33
Tabla 4	Clasificación Taxonómica de las especies sometidas a estudio, clasificación basada en el sistema de clasificación APG III.....	37
Tabla 5	Posición geográfica de los sitios de recolección del material vegetal. Información suministrada por el Global Position System (GPS).....	52
Tabla 6	Resultados del A.F.P de las hojas de <i>C. funckianus</i> . Sanabria; 1983.....	55
Tabla 7	Prueba inicial para la evaluación de la presencia o ausencia de Alcaloides en <i>C. funckianus</i>	57
Tabla 8	Pruebas de confirmación para evaluar la presencia de alcaloides.....	58
Tabla 9	Contenido promedio de fenoles totales, flavonoides e IC ₅₀ de los 14 extractos etanólicos de <i>C. funckianus</i> y <i>C. bogotanus</i> . Valores (±) intervalo de confianza como resultado de tres replicas. Resultados con la(s) misma (s) letra (s) expresa (n) que no significativamente diferentes ($P \geq 0.05$) de acuerdo con la prueba de <i>Tukey</i> (grupos con igualdad de varianzas).....	62
Tabla 10	Resultados del Análisis de Componentes Principales para las 14 muestras pertenecientes a las especies <i>C. funckianus</i> y <i>C. bogotanus</i>	75

ANEXOS.

Anexo 1: Mediciones de la capacidad antioxidante.

Anexo 2: Poster Propiedades químicas de los flavonoides y su posible uso alternativo como bioplaguicidas: Revisión bibliográfica. Congreso Colombiano de Química Agrícola.

Anexo 3: Poster Caracterización del aceite esencial, análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Croton funckianus* XII Congreso Colombiano de Fitoquímica.

Anexo 4: Poster I: Evaluation of antioxidant capacity based in total phenolic compounds and total flavonoids from *Croton funckianus*. XIV International Congress of Ethnofarmacology.

Anexo 5: Poster II: Chemical variability of *Croton funckianus* based in phytoplasm infection and collection sites. XIV International Congress of Ethnofarmacology.

Anexo 6: Resumen del artículo de tesis: Estudio químico preliminar y evaluación de la capacidad antioxidante basado en el contenido polifenólico y flavonoides totales de las especies *Croton funckianus* y *Croton bogotanus* (Euphorbiaceae) colectadas en dos sitios diferentes.

Anexo 7: Unidad didáctica.

GLOSARIO.

µg/mL: Microgramos / mililitro.

µg: Microgramos.

µl: Microlitros.

A₀: Absorbancia inicial.

(Pb (C₂H₃O₂)₂): Acetato de Plomo.

AFP: Análisis Fitoquímico Preliminar.

AlCl₃: Tricloruro de Aluminio

Ba: Bares.

CLAE-DAD: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia – Detector de Arreglo de Diodos.

CHCl₃: Cloroformo.

(FeCl₃): Cloruro Férrico.

DBI: Departamento de Biología.

DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil.

FC: Reactivo de Folin Ciocalteau.

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

HCl: Ácido Clorhídrico.

HNO₃: Ácido Nítrico.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

ICBN: International Code of Botanical Nomenclature.

INQUIBIO: Grupo Integrado de investigaciones en Química y Biología de la Universidad Militar Nueva Granada.

KI: Yoduro de Potasio.

M.E.N: Ministerio de Educación Nacional.

mg/mL: Miligramos/mililitro.

Mg: Magnesio.

mgEAG/g: Miligramos Equivalentes a Acido gálico / gramos de extracto seco.

mgEC/g: Miligramos Equivalentes a Catequina / gramos de extracto seco.

mgEQ/g: Miligramos Equivalentes a Quercetina / gramos de extracto seco.

ml: Mililitros.

mUA: Miliunidades de absorbancia.

NaCO₃ : Carbonato de Sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio.

NaCH₃COO:Acetato de Sodio.

Nm: Nanómetros (nm)

PCLB: Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología.

pH: Potencial de Hidrogeniones.

Ppm: Partes por millón.

SINCHI: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas.

U.P.N: Universidad Pedagógica Nacional.

UD: Unidad didáctica.

UMNG: Universidad Militar Nueva Granada.

Vf: Volumen final.

Vi: Valor inicial.

INTRODUCCIÓN.

Desde varias décadas es importante resaltar el estudio de la biodiversidad de la flora colombiana para aprovecharla en beneficio del mejoramiento de la calidad de vida del hombre (Bulla *et al.*, 2012). El reino vegetal, en sus distintos escenarios ha sido un elemento crucial en los fenómenos biológicos, sociales y económicos determinantes en la evolución no solo de la naturaleza sino también de la humanidad. A la identificación de algunas plantas útiles y otras no tanto, se siguió la exploración y cultivo de esta manera surge así la agricultura. La observación de las semejanzas y las diferencias entre las plantas y entre éstas y otras formas de la vida terrestre, dan origen a la biología y la botánica, las cuales con sus lógicas, métodos de investigación y sistematización hacen posible junto con la química la emergencia de la fitoquímica (Barba; 1997).

En este orden de ideas, es importante resaltar que la fitoquímica, es un área que proporciona de manera integral el conocimiento de algunos de los muchos productos químicos naturales que pueden ser extraídos, separados, purificados y determinados fisicoquímicamente en las plantas. Éstos se encuentran inmersos dentro de la complejidad de las células vegetales, no solo como entidades químicas, sino también como productos de una serie de procesos que intervienen en su biogénesis, como sustancias activas que desempeñan una función en los procesos bioquímicos de las células o bien como elementos que pueden provocar alteraciones fisiológicas en los animales incluyendo el humano (Valencia; 1995). La individualidad bioquímica, característica de cada taxón o grupo pequeño de sistemas vivientes, determina la formación de elementos denominados metabolitos secundarios, sustancias de separación difícil, por la facilidad con la que forman complejos moleculares y por las pequeñas cantidades que se encuentran en cada ser vivo.

Teniendo en cuenta las investigaciones respecto al trabajo en plantas y conociendo que hoy con los constantes cambios que se están dando en el sistema educativo colombiano, es necesario que el maestro diseñe y aplique estrategias metodológicas que pueden ser de gran utilidad tanto para profesores como para estudiantes mediante un conjunto de actividades concretas que apoyen racionalmente el desarrollo del estudiante en los procesos de enseñanza y aprendizaje. Así vemos, que la planificación de la clase, tarea propia del maestro, es un escenario donde surgen preguntas como ¿qué enseñar?, ¿por dónde debo iniciar?, ¿qué prácticas de laboratorio debo diseñar? Preguntas que son de preocupación compartida por parte de los maestros de ciencias que quieren ejercer su labor de una mejor manera, para dar respuestas a esas preguntas, se propone realizar el diseño de una unidad didáctica que pueda ser de gran utilidad para los estudiantes con un conjunto de habilidades concretas, que permitan aplicar sus conocimientos y habilidades a fin de lograr con idoneidad un propósito determinado,

teniendo como eje principal además de la didáctica, los principios de la fitoquímica y la información que brinda usando técnicas convencionales y modernas con el fin de que el estudiante demuestre su interés en conceptos de química a través de lo que aprenda en el laboratorio con el uso de las plantas, sus componentes activos preliminares y sus posibles aplicaciones.

En esta medida, el proceso de elaboración de la unidad didáctica permite que el maestro integre sus conocimientos científicos y didácticos, a partir de la práctica docente con un grupo de estudiantes generando aportes actitudinales, procedimentales y conceptuales al proceso de enseñanza y aprendizaje. Por esta razón el presente trabajo es un aporte para la enseñanza de los conceptos en fitoquímica como elementos constituyentes de la diversidad vegetal tomando como referencia o eje de partida a las especies *Croton funckianus* (Müll. Arg., 1866) y *Croton bogotanus* (Cuatrec., 1935).

Teniendo en cuenta la importancia que tiene la formación de profesores en biología en aspectos metabólicos de los sistemas vivos, el presente trabajo de investigación pretende generar un aporte hacia el fortalecimiento del proceso de enseñanza de algunos de estos conceptos que han sido en ocasiones abordados de manera superficial por los licenciados en Biología, mediante la realización de una unidad didáctica utilizada para este fin. La unidad didáctica implica un conjunto de actividades sistemáticamente elaboradas para favorecer el aprendizaje significativo de los estudiantes. Además, esta estrategia tiene en cuenta la naturaleza del conocimiento científico vinculada al tema de la enseñanza de los conceptos asociados a la química vegetal. Bajo esta última perspectiva ha surgido el interés de elaborar este proceso de investigación frente a temas que son poco abordados en la escuela colombiana como en la formación de licenciados en Biología (Bautista *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista biológico, las plantas han sido desde tiempos inmemoriales un recurso para el ser humano desde su alimentación y la curación de ciertas enfermedades, estas últimas que poseen algún tipo de principios activos son denominadas plantas medicinales que aun en la actualidad, cientos de estas especies son utilizadas para estos fines, la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos, los cuales están comprendidos por unos compuestos denominados metabolitos secundarios que son de una estructura compleja, de distribución restringida y más característica de fuentes botánicas específicas.

1. DEFINICION DEL PROBLEMA.

En Colombia, la investigación en fitoquímica ha sido importante desde los años 80 evidenciándose en la consolidación de grupos de investigación y en el aumento de producción bibliográfica y científica recopilada en artículos, simposios, seminarios etc. Sin embargo, en toda la búsqueda bibliográfica se evidenció que fue escasa la información fitoquímica para especies del género *Croton* presentes en Bogotá y sus alrededores. En ese orden de ideas, es altamente necesario para el grupo de investigación, referenciar y caracterizar químicamente las especies vegetales *C. funckianus* y *C. bogotanus* con miras a generar información que permita el reconocimiento de dichas especies cuyo objetivo sea la de generar y divulgar conocimiento, además de esto, potenciar diferentes escenarios de acción de la línea de investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica a nivel interno y externo de la Universidad Pedagógica Nacional.

Desde el ámbito educativo, la enseñanza y aprendizaje de conceptos asociados a la química y a la biología como lo son los metabolitos secundarios, es vista como la memorización de conceptos y fórmulas que no tienen un uso en la cotidianidad del estudiante, por otro lado, los textos de fitoquímica se delimitan a definir sus conceptos y su deducción química y matemática, pero no se muestra la relación de dichos conceptos con las situaciones problema de la vida real, además, que hay poca o ninguna proyección de los mismos en el ámbito práctico. En este sentido Carriazo y Saavedra; 2004 consideran que la poca importancia al trabajo experimental en los procesos de enseñanza y aprendizaje no permite una mejor comprensión de los conceptos.

Teniendo en cuenta los pocos trabajos de investigación didáctica que arrojan información acerca de las ideas que poseen maestros en formación y estudiantes frente a los conceptos asociados a la fitoquímica, conviene indagar no solo acerca de dichas concepciones y obstáculos, sino preguntarse también por la posibilidad de generar estrategias didácticas que contribuyan a la evolución de dichas concepciones en procura de fortalecer los aprendizajes significativos. A partir de lo expuesto la pregunta que delimita el objetivo de la presente investigación es la siguiente:

¿QUÉ ASPECTOS DEBE TENER EN CUENTA EL DISEÑO DE UNA UNIDAD DIDÁCTICA PARA LA ENSEÑANZA DE CONCEPTOS ASOCIADOS A LA FITOQUÍMICA PARTIENDO DE UN PERFIL QUÍMICO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS ESPECIES *Croton funckianus* Y *Croton bogotanus* (EUPHORBIACEAE.)?

1.1 Delimitación del problema.

Al ser Bogotá y sus alrededores (especialmente el municipio de Fusagasugá) algunos ecosistemas en donde se presenta una mayor riqueza y abundancia de especies del genero *Croton*, se toma este como lugar de muestreo de material vegetal pertenecientes a las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus*, a realizar de forma aleatoria. Para caracterizar mejor cada una de las muestras fueron sometidas a un análisis fitoquímico preliminar, una evaluación del contenido total de flavonoides, fenoles totales, captación de radicales libres y poder reductor con miras a determinar una posible aplicación y se realizó un análisis cualitativo de acuerdo a un perfil cromatográfico específicamente buscando metabolitos del tipo flavonoides para continuar a futuro con otros trabajos que permitan fortalecer la presente investigación.

2. JUSTIFICACION.

Desde la visión del Proyecto Político Pedagógico de la U.P.N se señalan las implicaciones que asumen el saber pedagógico y el disciplinar como ejes articuladores para la transformación de las prácticas educativas en pro de la construcción de nuevas miradas acerca del desarrollo social y político de la nación (PPP-UPN; 2010), partiendo de lo anterior, desde el Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología (PCLB) el cual establece un vínculo a través del trabajo de grado relacionando lo que se aborda desde el aula y las experiencias que nos aproximan al quehacer del maestro (UPN-PCLB; 2010). En éste sentido, el Licenciado en Biología de la Universidad Pedagógica Nacional se reconoce como sujeto social que se encuentra en constante interacción con su medio y los diversos organismos que habitan en él, por ende, toma importancia la relación que existe entre los diferentes sistemas vivientes con el medio que los rodea, particularmente, a partir de la importancia que tiene el contexto en donde se encuentra inmerso el maestro como un espacio de enfrentamiento con la realidad de su quehacer, lo mencionado se muestra como a partir de la evaluación biológica que tiene los componentes metabólicos de las especies vegetales se puede llegar identificar el amplio rango de acción de las sustancias que emergen de los procesos fundamentales, en este sentido, el conocimiento y el uso de dichos componentes bioquímicos *“ofrece una oportunidad de reconocer-se desde mis propios procesos de formación, a pensar-me como sujeto que construye mi profesión desde experiencia personal (Sierra; 2011).*

Por otra parte, la importancia que tiene la escogencia de este tema, la cual radica principalmente en que se puede trabajar dentro de la línea de investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica, y que además, responde a producir conocimiento para las comunidades académicas y del común con una tendencia al desarrollo de procesos investigativos desde el trabajo botánico estrechamente relacionado con el estudio fitoquímico, el establecimiento de una red de comunicación con las instituciones dedicadas al mantenimiento de las actividades agrícolas, la conservación y el aprovechamiento sustentable de la flora colombiana y a su vez además de fortalecer la formación disciplinar en botánica de los futuros profesionales de la educación en diferentes áreas asociadas a las ciencias naturales. En segundo lugar el aporte académico del presente trabajo a la línea será la consolidación de actividades que se preocupan mantener la enseñanza y el aprendizaje de diversidad florística del país desde del estudio de las plantas, dar unos resultados preliminares en torno al conocimiento de la bioquímica vegetal para las diferentes comunidades tanto académicas como en general que se interesan por el saber que gira alrededor de las plantas. Por último el planteamiento de esta propuesta de grado propende contribuir a la formación de sujetos reflexivos y activos frente al aprovechamiento de la flora, asumir futuros procesos de enseñanza y aprendizaje como mecanismo para educar a las poblaciones en pro de la

conservación de la riqueza y abundancia vegetal presente en Colombia y la importancia que tiene la botánica en el contexto social colombiano (Ladino; 2011).

El proceso de trabajar en los laboratorios de química orgánica (Bioorgánica) de la Universidad Militar Nueva Granada en primera instancia, desde la visión de los procesos investigativos en el área de la biología no es ajeno a los maestros y estudiantes, ya que la ciencia y la tecnología juegan un papel fundamental para el desarrollo de cualquier sociedad. En esta medida, proporcionar conocimiento científico es clave para dotar a los sujetos de los conocimientos y las herramientas que les permitan entender la complejidad de la realidad. La investigación científica y con calidad hace posible el desarrollo y la aplicación de las ciencias; pues incentiva el carácter intrínseco por la pregunta, la curiosidad, el deseo de aprender, la búsqueda planeada y sistemática de soluciones y repuestas, la capacidad de relacionarse con los adelantos científicos y tecnológicos de manera eficaz y al mismo tiempo crítica.

Desde los referentes legales, para los profesionales de la educación la Ley general de educación (115 de 1994) propone en el parágrafo 9 del artículo 5 “*el desarrollo de una capacidad crítica, reflexiva y analítica que fortalezca el avance científico y tecnológico nacional, orientado con prioridad al manejo cultural..., a la participación de la búsqueda de alternativas de solución a los problemas y al progreso social del país*” (MEN; 1994), a partir de lo mencionado, se enmarca uno de los ejes importantes para la realización de este proceso investigativo, puesto que, con la aplicación de este ejercicio se identifica que conociendo la actividad biológica los metabolitos secundarios de las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus* (Euphorbiaceae) se puede llegar a elaborar materiales educativos para su conocimiento y divulgación para maestros en ejercicio y en formación de licenciatura en biología fortaleciendo y transponiendo didácticamente un nuevo cuerpo de conocimiento desde el componente químico, además, el poder establecer procedimientos de extracción de estos compuestos en condiciones de laboratorio, su uso permite el conocimiento de la biodiversidad intrínseca que se encuentran en las plantas, además del reconocimiento de su valor de uso no consuntivo como organismos fundamentales que han posibilitado el fenómeno de lo vivo desde 3.800 millones de años.

Desde un interés pedagógico, en primera instancia, la ejecución del presente trabajo investigativo realizado en campo y los demás espacios de las Universidades Militar y Pedagógica, le permite al futuro docente articular los saberes biológicos, pedagógicos y cotidianos que provienen de las diferentes experiencias a lo largo de su quehacer como maestro y la selección de conceptos estructurantes que actúen como elementos relacionados con otras ideas que permita integrarlas en la realización de la actividad, en segunda instancia, se piensa el aprendizaje y la enseñanza de la biología como una dinámica de cambio hacia un paradigma mucho más complejo de la realidad, esto se logra a través de la construcción de conocimiento con referentes conceptuales, procedimentales y actitudinales que

interactúan unos con otros, ampliando las estrategias de pensamiento y articulando el conocimiento científico.

3. ANTECEDENTES.

Aunque se han realizado varias investigaciones sobre el contenido de metabolitos secundarios en varias especies del genero *Croton* aún son muy pocos los estudios sobre el contenido de polifenoles y flavonoides totales así como la evaluación de la capacidad antioxidante especialmente de las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus*, encontradas en Bogotá y sus alrededores cuya principal utilidad es de carácter ornamental, la información colectada en la base de datos responde a la fenología de las plantas, su distribución biogeográfica y características morfológicas más que a su evaluación química, además de esto, no se tiene registros de los datos anteriormente mencionados.

Vegas; 2010 en su investigación sobre el estudio de los compuestos bioactivos de las hojas senescentes de la especie *Croton funckianus*, en zonas tropicales y subtropicales, los zancudos son considerados como los dípteros más perjudiciales desde el punto de vista médico y veterinario. El mosquito *Culex quinquefasciatus* es un díptero perteneciente a la familia Culicidae, es un vector patógeno que transmite al hombre diversas enfermedades y parásitos tal como filariasis, virus del Nilo, dengue hemorrágico, malaria. El extracto etanólico de hojas senescentes frescas de *Croton funckianus* se sometió a partición líquido- líquido con disolventes de diferente polaridad. Los ensayos de actividad larvicida frente a larvas de tercer estadio de *Culex quinquefasciatus*, mostraron que los extractos en éter de petróleo, acetato de isopropilo y butanol poseen actividad prometedora. El estudio químico guiado por el bioensayo de actividad larvicida de una de las fracciones en butanol condujo a la obtención de quercetina; este compuesto presentó bioactividad. Del extracto se obtuvieron dos mezclas conformadas por flavonoides glicosidados.

Vegas *et al.*, 2011 muestra que el uso de insecticidas sintéticos genera varios problemas ambientales en ecosistemas acuíferos, aire, suelo, contaminación en alimentos y en animales, son ecológicamente inaceptables porque producen efectos adversos sobre los organismos benéficos y desarrollan resistencia en insectos, hongos, bacterias y malezas, lo que trae como consecuencia la aplicación de dosis cada vez más altas, con un mayor riesgo de intoxicación humana. Adicional a los problemas ambientales, la salud pública se ve seriamente afectada por enfermedades que usualmente son transmitidas por insectos vectores, dentro de estos se encuentra el zancudo *Culex quinquefasciatus* lo que causa problemas al bienestar humano. El género *Croton* (Euphorbiaceae) ha sido objeto de estudio por la gran cantidad de compuestos químicos que lo constituyen, entre estos se destaca la presencia de diterpenoides de tipo labdano, ciclitoles, neo-inositol, triterpenoides pentacíclicos, aceites volátiles, sustancias fenólicas y alcaloides. Estudios previos al extracto etanólico proviene de las hojas senescentes de la especie *C. funckianus* mostraron actividad larvicida prometedora frente a las larvas del zancudo *Culex quinquefasciatus*. Como resultado mostro que el fraccionamiento bio guiado de la fracción soluble en éter de petróleo de las hojas senescentes de *Croton funckianus*

		hidroxytrachylobano, 3, 18,19-trihydroxytrachylobano.
<i>C. oblongifolius</i>	Tallo	Ácido crotoembraneico, A. neocrotoembraneico, cembranoide neocrotoembranal.
<i>C. hirtus</i>	Tallo	20 nuevos compuestos bis-nor dolabradanos 2,3 dolabradanos 4-7 kauran, 8 y 9 cicloptopakaurano 10-15 hirtusano, 16-18 ester germaradieno.
<i>C. tiglium</i>	Semillas	éster forbol
<i>C. kerrii</i>	Hojas secas	E,E,Z)-11-hidroximetil-3,7,15-trimetil-2,6,10,14- hexadecatetraen1-ol y (E,E,E)-11-formil-3,7,15- trimetil 2,6,10,14-hexadecatetraen1-ol
<i>C. poilanei</i>	No reportado	Ácido poilaneico y diterpeno cembranoide
<i>C. macrostachys</i>	Frutos	Crotopóxido
<i>C. cajucara</i>	Hojas	crotonin y trans dehidrocrotonin, noclerodanos cajucarín A, cajucarín B, cajucarín-β, cajucarínolido y sacacarin
<i>C. eluteria</i>	No reportado	Clerodanos eluterins A-J
<i>C. urucurana</i>	Raíces	Sonderianin, 15,16-epoxy-3,13 (16)-clerodatrieno- 2-ona y 12-epi-methylbarbascoate
<i>C. lechleri</i>	Corteza	Clerodanos Crolechínol, ácido crolechínico, korberina A, korberina B
<i>C. californicus</i>	No reportado	trans-clerodano Metil barbascoato

Tabla 1: Constituyentes químicos aislados de diferentes partes del corno de algunas especies del género *Croton*. Tomado y adaptado de Vegas 2010.

En la tabla 2 se evidencia la distribución de algunos flavonoides presentes en las especies pertenecientes al género *Croton*. Tomado y adaptado de Vegas; 2010.

TIPO DE FLAVONOIDES	PLANTA	PARTE	NOMBRE QUIMICO	PAIS	PROPIEDAD
Flavonoles	<i>C. oblongifolius</i>	Aérea	Quercetina	Tailandia	Vasorrelajante

Quercetina	<i>C. glabellus</i>		3,4'7-tri-O-Metilquercetina	Colombia	
	<i>C. sciedeanus</i>				
	<i>C. schiedeanus</i>			Colombia	
Flavonoles glicosidados	<i>C. glabellus</i>	Latex	3,3-O- L-ramnosidoquercetina		No reportado
	<i>C. schiedeanus</i>				
	<i>C. bonplandiarus</i>			India	
	<i>C. panamensis</i>			Costa Rica	Antihipertensivo
Flavonoles glicosidados	<i>C. oblongifolius</i>	Aérea	3- D-galactosido quercetina	Ecuador	Vasorrelajante
	<i>C. menthodoros</i>		3-O- rutinosido quercetina	Ecuador	
			3-O-(2-0-β-d-apofuranosil) Rutinosidoquercetina		
Kaempferol	<i>C. cajucara</i>		3,7-di-O-metilkanferol	Brasil	
			3,4'7-tri O-metilkaempferol		
	<i>C. pyramidalis</i>		4',7-di-O-metilkaempferol	México	

	<i>C. menthodorus</i>		3-O-rutinosidokanferol 3-O-(2-O-trans-p-cumaroil)-β d-glucopiranosidokaempferol	Desconocido		
Miricitina	<i>C. panamensis</i>	Látex	3-O-ramnosidomiricetina	Desconocido	No reportado	
	<i>C. draco</i>					
Flavonoides simples.	<i>C. lechleri</i>	Látex	(+)catequina	Ecuador		
	<i>C. panamensis</i>			Desconocido		
	<i>C. urucurana</i>	Corteza		Brasil		
	<i>C. lechleri</i>	Látex	(-)epicatequina	Desconocido		
	<i>C. panamensis</i>					
	<i>C. lechleri</i>		(+)galocatequinas	Desconocido		
	<i>C. draconoides</i>					Perú
	<i>C. panamensis</i>					
	<i>C. urucurana</i>	Corteza		Desconocido		
	<i>C. lechleri</i>	Látex	(-)epigalocatequina		Actividad antiviral	
<i>C. lechleri</i>	(-)epigalocatequina		Desconocido			
<i>C. draconoides</i>						
<i>C. panamensis</i>						
Flavonol	<i>C. draconoides</i>		3,3',5,5'-pentahidroxiflavano			

Tabla 2: Distribución de algunos flavonoides pertenecientes a especies dentro del género *Croton*. Tomado y adaptado de Vegas; 2010.

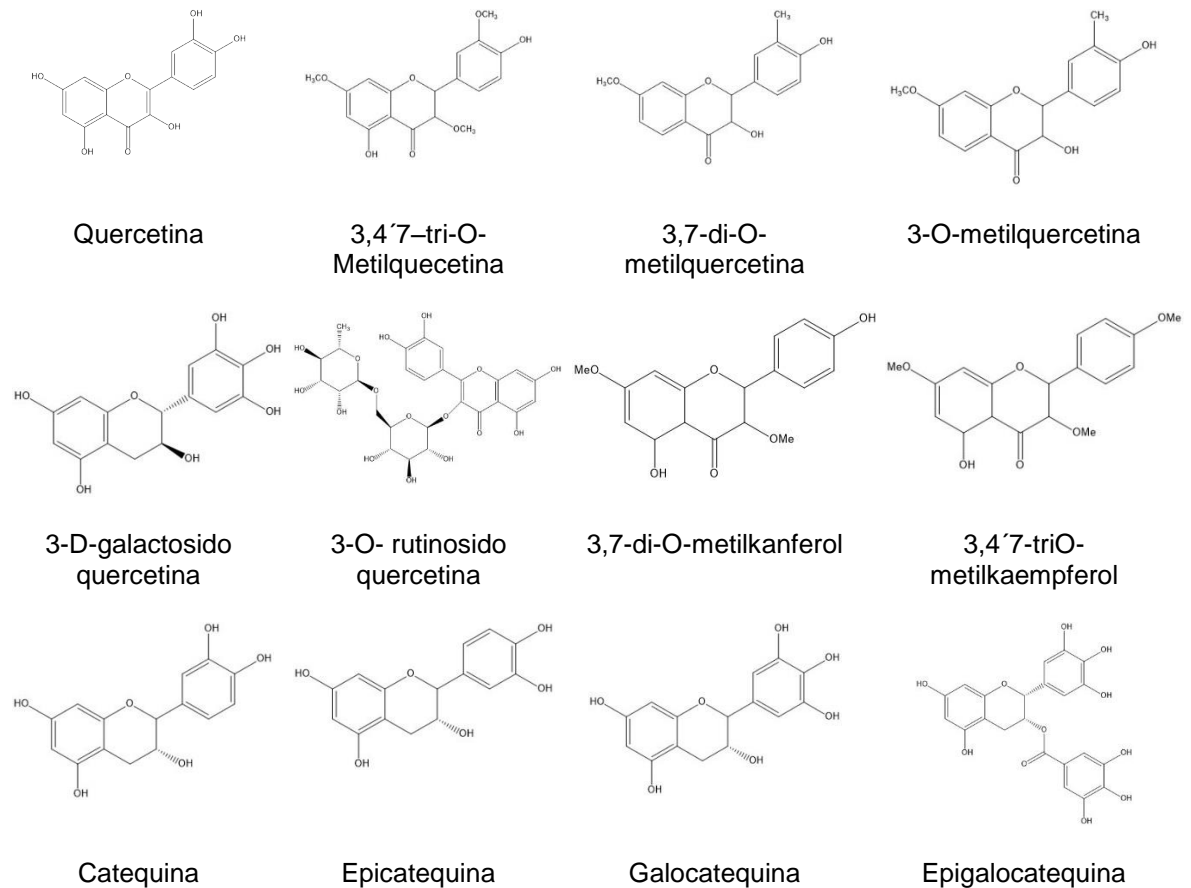


Tabla 3: Estructura de algunos flavonoides aislados de las partes vegetativas del género *Croton*.

Desde un plano pedagógico, Riveros y Gómez; 2007 en su proyecto de investigación *Análisis fitoquímico de Niphogeton ternata, como mecanismo de aprendizaje de conceptos de las ciencias naturales* aplicado con estudiantes de noveno grado de la I.E.D. Enrique Pardo Parra de Cota Cundinamarca su principal objetivo fue caracterizar y extraer las cumarinas presentes en esa especie a fin de someterlas a cultivos de *E. coli* comprobar su acción bactericida y su utilidad en el tratamiento de enfermedades digestivas. Se pretendió motivar a los estudiantes de la educación media hacia el aprendizaje de las ciencias naturales desde tres perspectivas: contexto químico, contexto microbiológico y contexto ecológico.

Campos y Vargas; 2008 realizaron el diseño de una unidad didáctica con énfasis en metabolitos secundarios, alcaloide y flavonoide de la especie *Ficus andicola*. Esta investigación de tipo disciplinar, cualitativa y didáctica, inscrita como trabajo de grado acerca de la fitoquímica con énfasis en metabolitos secundarios, utilizando como herramienta metodológica y de planeación una unidad didáctica, orientada desde un enfoque constructivista y por competencias interpretativas, argumentativas y propositivas. Esta unidad fue dirigida a estudiantes que cursan el

seminario de sistemas biológicos de la Licenciatura en Química de la Universidad Pedagógica Nacional. Se tuvo en cuenta instrumentos preinstruccionales de ideas previas, e instrumentos postinstruccionales, material didáctico y fichas de valoración de instrumentos de análisis. Como resultado final del trabajo de grado, se manifiesta que a través de la unidad didáctica titulada “los alcaloides y flavonoides: sustancias químicas de origen vegetal implicadas en la salud humana”, se pretendió incentivar al estudiante a lograr un proceso de aprendizaje representativo de la fitoquímica que integre en su profesión docente.

Castillo; 2008 en su trabajo titulado *aprendizaje de conceptos químicos desde el análisis fitoquímico del madroño aplicando la enseñanza para la comprensión* menciona que la investigación relacionada con los procesos educativos ha llevado a diseñar actividades de clase basadas en las personas en cómo las personas aprenden. El diseño propuesto reconoce que las personas aprenden construyendo su propio entendimiento en un proceso que involucra conocimientos previos y experiencias, siguiendo un currículo de aprendizaje. Este ciclo incluyó la exploración, formación de conceptos y aplicación, discusión e interacción con otros reflejando su progreso en el aprendizaje, y evaluando su desempeño.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General.

Diseñar una unidad didáctica para la enseñanza de conceptos en fitoquímica a partir de un perfil químico¹ de extractos etanólicos de las especies *Croton funkianus* y *Croton bogotanus* (Euphorbiaceae.)

4.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar los extractos obtenidos de una de las especies de *Croton* mediante un análisis fitoquímico preliminar para determinar la posible presencia de algunos núcleos de metabolitos secundarios.
- Evaluar la capacidad antioxidante, el contenido total de fenoles y flavonoides de los extractos obtenidos mediante la captación de radicales libres por acción sobre DPPH, ensayo con el reactivo de Folin- Ciocalteau y cloruro de aluminio respectivamente.
- Establecer la variabilidad química en un estudio preliminar respecto a los componentes mayoritarios presentes en los extractos obtenidos mediante el perfilamiento por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE).
- Diseñar estrategias de enseñanza y aprendizaje encaminadas a lograr un cambio conceptual sobre conceptos asociados a la fitoquímica, en estudiantes del Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología (PCLB).

¹ Entiéndase que el perfil químico corresponde a la cuantificación de fenoles totales, flavonoides, capacidad antioxidante y el análisis cromatográfico por CLAE.

5. MARCO REFERENCIAL.

5.1 Generalidades de la familia Euphorbiaceae y del género *Croton*.

En primera instancia se identifica que dentro de las ciencias naturales, la habilidad de la observación juega un papel importante a la hora de reconocer la biodiversidad dentro de la cual estamos inmersos, compartimos y que este evento ha sido un proceso evolutivo que ha ocurrido en la Tierra durante 3800 millones de años, en este orden de ideas esa habilidad de contemplar el fenómeno de lo vivo, nos conduce a reconocer que dentro del reino Plantae encontramos a un grupo en particular que son las Euphorbiaceae las cuales son objeto de nuestro estudio. A nivel morfológico se puede identificar que son plantas que poseen una consistencia desde herbáceo hasta arbóreo con la característica de presentar exudado llamado látex. Por otro lado, se ha citado en la bibliografía que las euforbiáceas son un ejemplo para hablar de evolución convergente con las cactáceas puesto que la gran mayoría de las especies de esta familia poseen sustancias tóxicas como una estrategia evolutiva para defenderse de los depredadores de primer orden que son los herbívoros.

Las hojas presentan una disposición respecto al tallo opuestas o alternas mientras que la composición pueden llegar a ser simples, cuando menos a ser palmadas, otra característica de este grupo es que presenta estipulas que pueden llegar a transformarse en espinas o glándulas. Este grupo de plantas suelen formar a menudo estructuras florales llamadas inflorescencias llamada cimosa o ciato que es una estructura especializada en forma de copa que contiene glándulas a los bordes dentro del cual hay numerosas flores reducidas a un estambre llamadas flores estaminadas que se hallan rodeando a una única flor central con pistilo. La ecología de la polinización de estas plantas puede ser por vectores bióticos como lo son insectos del orden Díptera que se sienten atraídos por la segregación de sustancias. Estas flores por lo general tienen tendencia a la reducción del número de piezas por ende, son flores unisexuales y actinomorfas, es decir que poseen un plano de división de forma radial (Fig. 1).

En términos cuantitativos, es una familia que contiene aproximadamente 300 géneros y 7.500 especies de amplia distribución en las regiones tropicales y templadas. Algunos géneros importantes son *Euphorbia* (Euforbio o noche buena), *Phyllanthus* (600), *Hevea* (12) Pará o árbol de hule en Brasil); *Aleurites* (2) Árbol de aceite de Tung; *Croton* (700) aceite de Croton; *Manihot* (150) cazabe, mandioca, yuca, tapioca; *Acalypha* (450); *Ricinus* (1) Higuera, ricino; *Hippomane* (5) (manzanillo); *Pedilanthus* (14); *Traiga* (100); *Sapium* (120) y *Jatropha* (175) (Cronquist; 1981).

5.2 Clasificación taxonómica y datos generales de las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus*.

CATEGORIA	ESPECIE 1	ESPECIE 2
DOMINIO	Eukaria	Eukaria
REINO	Plantae	Plantae
DIVISION	Magnoliophyta	Magnoliophyta
CLASE	Equisetopsida	Equisetopsida
ORDEN	Malpighiales	Malpighiales
FAMILIA	Euphorbiaceae	Euphorbiaceae
GENERO	Croton L.	Croton L.
ESPECIE	<i>C. funckianus</i> (Müll. Arg 1866)	<i>C. bogotanus</i> (Cuatrec; 1935)

Tabla 4: Clasificación Taxonómica de las especies sometidas a estudio, clasificación basada en el sistema de clasificación APG III.



Fig. 1: Hojas, frutos e inflorescencia de la especie *C. funckianus*. Fotos tomadas por Andrés Castiblanco.

Reconocimiento en campo: Hierbas, arbustos, o arboles; a menudo con savia lechosa; principalmente hojas alternas, flores unisexuales; ovario súpero y usualmente trilocular, óvulos con frecuencia con una carúncula flores de tipo “Euphorbia”: $(CA^0 CO^0 A^1 G^0)$ o $(CA^0 CO^0 A^0 G_{-3})$; las flores de distinto tipo $(CA^{0.5} CO^{0.5} A^{1-\infty} G^0)$ $(CA^{0.5} CO^{0.5} A^{1-\infty} G_{-3})$

El sangregado (*Croton*) son árboles ornamentales que se siembran en parques y jardines. Alcanza los 30 m de altura y su tronco los 70 cm de diámetro, la corteza es grisácea, lisa y produce un exudado rojizo. El fruto es una cápsula globosa, sus colores van desde el verde claro hasta el rojizo al madurar, se abren por sí solos (dehiscentes) en tres valvas y contienen tres semillas. Las semillas son de color crema, tienen 1 cm de longitud por 5 mm de ancho y presentan en uno de los extremos una pequeña carnosidad blanca que atrae las aves.

5.3 Distribución del género *Croton* en Colombia.

Según Murillo; 1999 *Croton*, es el segundo género con más riqueza y abundancia dentro de la familia Euphorbiaceae, con un número aproximado de cerca de 800 especies de distribución pantropical. Para Colombia, los primeros registros del género se remontan a los trabajos de Croizant a partir de los años 1940, 1943, 1944 y 1954 donde los avances en estas investigaciones dieron como resultado el conocimiento para la comunidad académica 13 nuevas especies y se hizo una discusión taxonómica y biogeográfica con las especies relacionadas. En la actualidad aún no se encuentran revisiones actualizadas de *Croton*.

En términos cuantitativos, a partir de la investigación desarrollada por Murillo; 1999, en Colombia se registraron 83 especies de *Croton* distribuidas en 19 departamentos de las regiones Caribe, Andina y Amazónica. En comparación con otros países del trópico se llegó a la conclusión preliminar que nuestro país posee la mayor diversidad de especies con un 10.5%, después de Brasil y seguida por Venezuela con un 8.4% (Fig. 2). Por otro lado la familia es cosmopolita con un mayor número de especies en la zona tropical. Esta familia se encuentra principalmente en los trópicos, con la mayoría de especies distribuida por la región Indo – Himalaya y la América tropical. Hay una amplia variedad en el África tropical, aunque no tan abundante y variada como en las otras dos regiones.

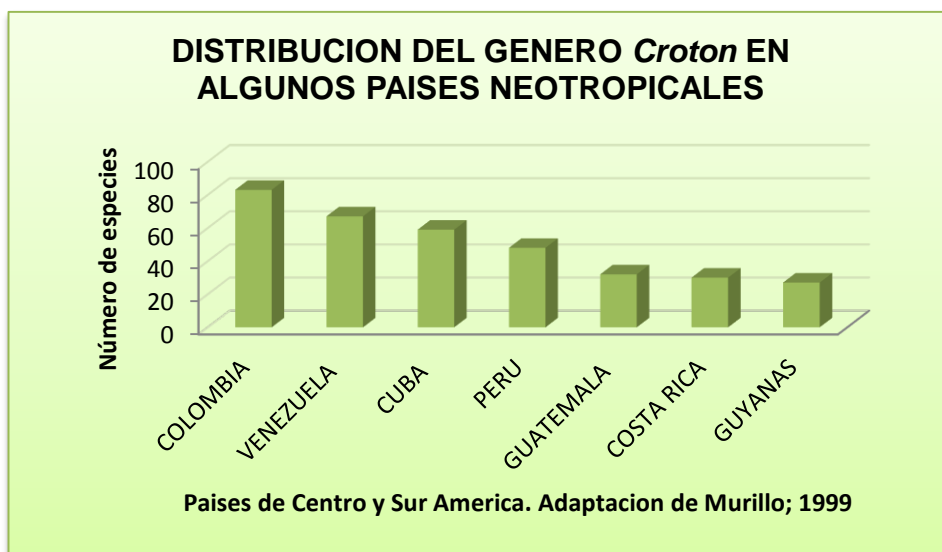


Fig. 2: Distribución del genero *Croton* en países neotropicales. Adaptado de Murillo; 1999.

5.4 Flavonoides.

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en las plantas cuyas estructuras se derivan del núcleo aromático flavano o 2-fenilbenzopirano. También son compuestos de la serie $C_6-C_3-C_6$ por lo que su esqueleto de carbonos consiste en dos grupos C_6 que son anillos de benceno sustituidos por una cadena alifática de tres carbonos (Domínguez; 1973) (Fig. 3).

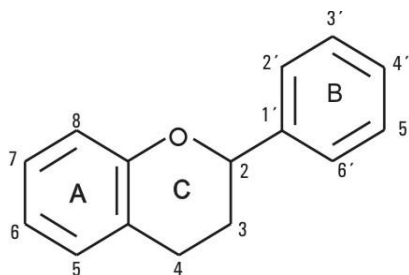


Fig. 3: Estructura básica de un flavonoide (Domínguez; 1973).

Dentro de la función biológica de los flavonoides, algunos de estos suelen ser incoloros y acumularse en las capas más superficiales de las plantas y captan hasta el 90% de las radiaciones impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos. Algunos flavonoides como taninos, protegen a las plantas generando sabores desagradables para los herbívoros, principalmente amargos o

texturas que suelen resultar desagradables para los herbívoros, que se ven estimulados a elegir otras plantas. Las plantas mutantes no poseen la enzima chalcona sintasa que forma parte de la vía biosintética de los flavonoides, muestran un crecimiento irregular debido a una deficiencia en el transporte de la auxina a través de la planta, probablemente esa deficiencia se deba a la ausencia de ese flavonoide en la planta mutante (Barba; 1997).

Muchos flavonoides son componentes de pigmentos de las flores y hojas que le confieren coloraciones atractivas de insectos, con lo que la función de muchos flavonoides sería la de atraer polinizadores hacia las flores. Las plantas carnívoras como *Dionaea muscipula* poseen antocianinas en sus hojas y flores y cumplen una función de atracción de los insectos los cuales le provee de alimento. Algunos flavonoides confieren aromas y colores a los frutos que los hacen más apetecibles para los herbívoros que se alimentan de ellos cumpliendo así una función de dispersión de semillas (Domínguez; 1973).

5.5 Etnobotánica.

El exudado del sangregado es uno de los productos más utilizados a nivel popular en las zonas tropicales húmedas de Centro y Suramérica. Las primeras referencias escritas datan del siglo XVII, cuando el naturalista español Cobo conoció las propiedades curativas del látex, ampliamente utilizado por las tribus indígenas de México, Perú y Ecuador (Risco *et al.*, 2005).

A nivel popular se usa fundamentalmente como cicatrizante por sus propiedades antiinflamatorias, antisépticas y hemostáticas y como antidiarreico (Pieters; 1992) También en el tratamiento de úlceras gastrointestinales, cólicos uterinos, retención de orina y como anticancerígeno. Algunas poblaciones indígenas lo han utilizado para el tratamiento de fiebres de origen digestivo, baños vaginales antes del parto, en el caso de hemorragias postparto y para tratar diferentes afecciones de la piel (Risco *et al.*, 1995) Generalmente, en la medicina popular se utilizan alrededor de 8 gotas (aunque se alcanzan incluso dosis de 20 a 30 gotas), aplicadas directamente sobre la piel o administradas vía oral, para lo cual se suele añadir a una infusión de la planta aromática. En los países de origen resulta habitual encontrar este látex en diferentes presentaciones, tanto en forma líquida como incorporado a diversos preparados.

Los compuestos en *Croton* podrían ser la base de importantes datos de carácter sistemático que ayudarían o posibilitarían resolver relaciones filogenéticas del grupo. Además, el amplio rango y diversidad de compuestos como alcaloides, terpenos y otros compuestos químicos poseen altas propiedades de carácter económico lo cual posibilitarían proveer a las industrias farmacéuticas nuevos productos para el tratamiento de diferentes enfermedades. El aceite de *Croton*, que

alguna vez se empleó como purgante, se obtiene las semillas de *C. tiglium* (Cronquist; 1981).

5.6 Unidad didáctica.

El concepto que se adopta dentro de este trabajo es el propuesto por Mosquera *et al.*, 2012 que hacen referencia a que el diseño de las unidades didácticas se asume como un proyecto curricular en profundidad, planteado como hipótesis que orienta y facilita el desarrollo práctico y obedece a una necesidad sentida de un profesional de la educación y de la enseñanza. La unidad didáctica está formada por unidades, cada una de las cuales tienen unos objetivos de aprendizaje específicos, una secuencia que está formada por sesiones de clase y estas a su vez por un conjunto de actividades mediante una actividad central alrededor de la cual se planifican las demás.

Se puede observar varias propuestas para el diseño de unidades didácticas, pero de forma general cada una debe intentar reflejar lo que puede ser la preparación de un curso: desde la clarificación de los contenidos científicos, el diseño de actividades, pasando por la discusión de los problemas didácticos que pueden aparecer abordando en su máximo nivel la concreción para todos los elementos del currículo: el que, el cómo enseñar y cuando enseñar, como evaluar (San Marti; 2002).

Dentro de este marco es importante diseñar la enseñanza como un proceso a través del cual unos modelos iniciales pueden evolucionar hacia unos modelos planteados desde el referente de la ciencia actual, esta implica generalmente:

- Afrontar el estudio de un problema relevante socialmente y que pueda ser analizado desde un modelo científico importante.
- Promover que los estudiantes identifiquen formas de ver y conceptualizar el fenómeno o fenómenos de la ciencia y reconozcan nuevas relaciones, analogías formas de hablar etc.
- Valorar la diversidad de formas de pensar y de evolucionar que se dé desde el aula como un factor de riqueza colectiva.

En este sentido la UD pretende lograr cambios en las ideas de expresadas por parte de los estudiantes, que sean significativas para los alumnos de manera que expliquen más observaciones y mejor. Esta concepción hace referencia a que no es necesario repetir conceptos, sino aplicarlos a situaciones cotidianas por ejemplo a la función que cumple un metabolito secundario en el crecimiento y desarrollo de los vegetales.

Con el fin de aplicar la anterior idea se pretende hacer uso de la modelización del uso de fenómenos, este planteamiento considera la enseñanza como el conjunto de acciones que promueve el profesorado para fortalecer el proceso de modelización que realizan los estudiantes con la finalidad de dar sentido a los hechos del mundo, un sentido que ha de tender a ser coherente con el conocimiento científico actual.

La selección de contenidos debe hacerse de forma que sean muy significativos y posibiliten la comprensión de fenómenos y conceptos. Hasta hace pocos años la selección de contenidos que se seleccionaban era básicamente en función de las necesidades previstas para que algunos estudiantes siguieran con éxito sus estudios posteriores. Actualmente, al generalizarse una educación básica para toda la población, es necesario plantearse la enseñanza de contenidos relevantes para comprender fenómenos, problemas cotidianos y ser capaz de actuar coherentemente. Comprender fenómenos reales exige identificar múltiples variables y la complejidad de sus interrelaciones (San Martí; 2002).

6. DISEÑO METODOLÓGICO.

Todo el proceso metodológico estuvo acompañado de una exhaustiva y permanente revisión bibliográfica. La metodología corresponde a la clasificación, extracción y cuantificación del contenido total de fenoles, flavonoides, la evaluación de la actividad antioxidante y el análisis cromatográfico por CLAE de los 14 extractos de *C. funckianus* y *C. bogotanus* colectados en Bogotá y sus alrededores (Fig. 4).

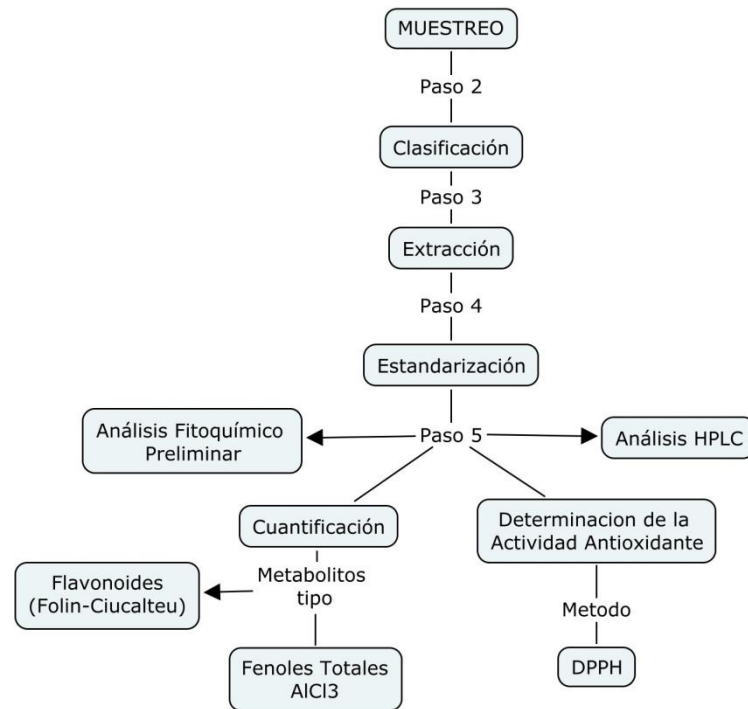


Fig. 4: Diseño metodológico.

6.1 Estandarización de las técnicas utilizadas.

Para la cuantificación del contenido total de fenoles, flavonoides se utilizaron los métodos descritos a continuación, previa estandarización a las condiciones de laboratorio mediante la construcción de curvas de calibración correspondiente.

Para el caso del contenido total de fenoles se utilizó el método de Folin–Ciocalteu (Jimoh *et al.*, 2011) cuya curva de calibración se construyó utilizando ácido gálico como patrón en el rango lineal de la Ley de Lambert-Beer. De igual manera, para

hallar el contenido de flavonoides se utilizó el método descrito por Jimoh *et al.*, 2011 cuya curva de calibración se construyó usando quercetina como patrón.

6.2 Muestreo y clasificación.

Se colectaron 5 muestras de la especie *Croton funckianus* en una zona de bosque natural ubicado en la vereda Bosachoque (Fusagasugá-Colombia) y 9 muestras de la especie *Croton bogotanus* en las localidades de Chapinero y Teusaquillo de la ciudad de Bogotá D.C. (Colombia), para un total de 14 muestras. Las especies colectadas se determinaron en el Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia– Sede Bogotá¹, en donde reposan los ejemplares con su respectivo número de radicación.

6.3 Procesamiento del material vegetal y elaboración de los extractos etanólicos.

El material vegetal colectado se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente por aproximadamente 8 días, posteriormente se seleccionaron las hojas secas sin peciolo, se pasaron por un homogenizador con el fin de fragmentar el material vegetal y se registró el peso seco de cada muestra. El material vegetal fue depositado en frascos de vidrio y se le adicionó como solvente de extracción etanol al 96% en cantidad suficiente para cubrir el material vegetal. Para la obtención del extracto se filtró cada una de las muestras y el etanol se evaporó mediante rotaevaporación con el equipo IKA RV-10 Control, el extracto recuperado se secó en un horno a 37⁰C. Este procedimiento se realizó al menos 10 veces para cada muestra.

Una vez obtenidos los extractos vegetales se preparó para cada una de las muestras una solución de trabajo de 2,5 mg/ml en etanol absoluto y se procedió a realizar las pruebas de capacidad antioxidante, contenido polifenólico y flavonoides totales, para el casi del análisis fitoquímico preliminar se describe a continuación.

6.4 Análisis Fitoquímico Preliminar (AFP).

Para realizar el AFP, se utilizó la metodología propuesta por Sanabria; 1983, la cual se divide en tres etapas: 1. Procesamiento del material vegetal, 2. Obtención de los extractos etanólicos y 3. Pruebas de identificación de algunos metabolitos secundarios, en este caso, se realizaron pruebas para alcaloides, flavonoides, taninos y carotenoides. Inicialmente se disolvieron 10g de extracto seco en 10ml de Pb (C₂H₃O₂)₂, esta solución inicial se centrifugó a 2000 rpm durante 8 minutos con

el fin de precipitar las clorofilas, esta solución fue empleada para la identificación de metabolitos secundarios.

6.4.1 Alcaloides.

Se realizaron pruebas de precipitación en medio ácido utilizando para ellos los siguientes reactivos con su correspondiente método: Inicialmente 4ml de la solución inicial se disolvieron en 100ml de HCl, se agitó y se filtró hasta quedar completamente transparente.

Dragendorft: Se tomó 1ml de la solución inicial y se depositó en un tubo de ensayo más 10ml del reactivo de Dragendorft el cual presentaba 8g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ pentahidratado en 20ml de HNO_3 y 27.2g de KI en 50ml de agua destilada. Se mezclaron las soluciones y se añadieron al tubo de ensayo.

Wagner: El reactivo de Wagner contenía 1.27g de I y 2g de KI disueltos en 20ml de agua destilada, se adicionó 10ml al segundo tubo de ensayo; y

Reactivo de Hager que fue una solución saturada de ácido pícrico en agua, de igual manera, se añadió 10ml del reactivo por las paredes del tercer tubo de ensayo (Sanabria; 1983).

6.4.2 Flavonoides.

A 1ml de la solución inicial se le realizó la reacción de Cianidina o Shinoda (coloración roja con Mg en polvo + HCl concentrado al 5%) la cual es positiva para γ -benzopironas. Se llevó a cabo sobre una placa de excavado (Sanabria; 1983).

6.4.3 Taninos.

Para la identificación de taninos se realizaron dos pruebas: la primera se llevó a cabo con Pb ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂ agregando a un 1ml de la solución inicial 5 ml del reactivo. La segunda se lleva a cabo en una placa de excavado en donde a 1ml de la solución inicial se le adicionó 5ml de FeCl_3 , ambas reacciones posibilitan detectar la presencia de polifenoles, con lo cual se obtienen coloraciones rojas, azules (taninos derivados del ácido gálico) o verdes (derivados del ácido protocatético) (Sanabria; 1983).

6.4.4 Carotenoides.

A 1 ml de la solución inicial presente en un tubo de ensayo se le adicionó lentamente por las paredes 1 ml de ácido sulfúrico al 85%. Observar una coloración azul en la interfase (Sanabria; 1983).

6.5 Cuantificación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales en los extractos se determinó siguiendo el método Folin-Ciocalteu (RFC) con algunas modificaciones (Durst & Wrolstad; 2001). En una celda de espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico, se adicionó una alícuota de 25µl del extracto etanólico (2.5 mg/ml) y 175µl de etanol. Posteriormente se le adicionaron 400µl del RFC al 10% y 1500µl de carbonato de sodio 7.35%. La mezcla se homogenizó en un vortex durante 10 minutos y se dejó reposar durante 2 horas en oscuridad. Se leyó la absorbancia por triplicado a 765nm utilizando el espectrofotómetro Spectroquant® Pharo 300M. Los valores de la absorbancia obtenidos fueron interpolados en la curva de calibración construida en función del ácido gálico. El contenido final de fenoles totales se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por kilogramo de material seco (Jimoh *et al*; 2011).

6.6 Cuantificación de flavonoides.

El contenido de flavonoides en los extractos se determinó siguiendo el método de reacción con Tricloruro de Aluminio con algunas modificaciones (Bernal *et al*; 2013). Se llevó una alícuota de 50µl del extracto (2.5mg/ml) en una celda de 1 cm de paso óptico. Se adicionaron 1650µl de etanol, 150µl de tricloruro de aluminio (AlCl₃) y 150µl de acetato de sodio 0.1M. Se agitó y se dejó en oscuridad durante 40 minutos. Se leyó la absorbancia por triplicado a 420 nm. Los valores de la absorbancia obtenidos fueron interpolados en la curva de calibración previamente construida en función de la concentración de quercetina. La concentración se expresó en mg equivalentes de quercetina por kilogramo de material seco.

6.7 Determinación de la capacidad antioxidante.

Este método desarrollado por Brand-Williams; 1995 se basa en la reducción de la absorbancia media a 515 nm del radical DPPH por antioxidantes. Para este ensayo se preparó inicialmente una disolución de 0.1mM de DPPH en etanol cuya absorbancia fue medida a 517 nm, la solución de trabajo debió estar dentro un rango de 0,8 a 0,008 nm. Una vez preparada la solución de trabajo, se tomaron cinco

volúmenes del extracto vegetal (5µl, 15µl, 25µl, 35µl y 50µl) llevando a volumen de 50 µl en una celda de espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico adicionando etanol. Se adicionó posteriormente 1950µl de la solución de trabajo DPPH para la obtención de un volumen final de 2000µl. Cada una de las concentraciones se realizó por triplicado y se encubó en oscuridad 30 minutos. Se leyó la absorbancia por triplicado a 517 nm en un espectrofotómetro marca Spectroquant® Pharo 300M.

6.8 Análisis de los extractos por CLAE.

El análisis de los datos se realizó usando el programa LC Solution, proveído por el software del cromatógrafo Shimadzu Prominence UFLC equipado con una bomba LC-20 AD Series, un detector de arreglo de diodos (multilongitud de onda) SPD-M20A y un automuestreador SIL 20-A (Velásquez; 2013), que actualmente se encuentra en el laboratorio de química orgánica “Bioorgánica” de la Universidad Militar Nueva Granada. El análisis cromatográfico se realizó con una columna Premiere C-18 (150 x 4.6 nm). La monitorización simultanea se realizó a 470 nm a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min, la temperatura de funcionamiento fue de 30°C y un volumen de inyección de 0.5 µl.

Para la estandarización del método, se utilizó como fase A una disolución de TFA: 0.005% en H₂O destilada grado analítico para HPLC. Como fase B se utilizó Acetonitrilo a diferentes concentraciones según el tiempo de duración (22 minutos) del método en gradiente de elusión.

6.9 Criterios de validez y confiabilidad.

Los resultados para el contenido de fenoles totales y flavonoides están representados como el promedio del metabolito secundario hallado. Para el análisis de la actividad antioxidante se emplea el software PRISM GraphPad 5.0 ® con el cual se halló el IC₅₀ (Índice de inhibición media) de cada uno de los extractos etanólicos. Así mismo, se realizó una prueba ANOVA con el fin de encontrar diferencias significativas entre los datos y una prueba TUKEY para establecer correlaciones entre todos los datos utilizando el software versión 2014. El cromatograma del método HPLC se diseñó en el software ORIGIN 9.0, mientras que para el análisis de componentes principales se empleó el paquete estadístico SIMCA versión 13.0. 332.

6.10 Realización de la unidad didáctica.

El modelo seleccionado para el diseño de la unidad didáctica orientada a la enseñanza y aprendizaje de los conceptos fitoquímica y metabolitos secundarios, utilizando un grupo de moléculas de interés biológico (flavonoides) y validado por medio de comunicación oral y un trabajo experimental con los estudiantes de la facultad de Ciencia y Tecnología inscritos en el componente electivo “mundo de las plantas” ofertado por la línea de investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica de la Universidad Pedagógica Nacional. El diseño tiene un doble propósito: en primer lugar proporcionar referencias teóricas que puedan fundamentar la toma de decisiones del profesor en la planificación y en segundo lugar, facilitar un procedimiento para abordar cada una de las tareas propuestas. Por esta razón, se presentara en cada módulo de la unidad un análisis didáctico en la selección de contenidos, objetivos de enseñanza, la selección de estrategias didácticas como pilares necesarios en el diseño de la unidad didáctica.

6.10.1 Fase de construcción y diseño de la unidad didáctica.

Todo proceso de formación parte de un diseño curricular cuyos ejes son los planes y programas de estudio., Es importante considerar que el diseño de la unidad didáctica parta de los propósitos y aprendizajes esperados mismos que guían la práctica educativa a partir de actividades y estrategias que consideren pertinentes para alcanzar las metas propuestas.

Es importante señalar que una vez construida las unidad didáctica y su puesta en marcha en el espacio académico, es necesaria una presentación de la misma por parte del maestro, señalando el bloque en el que se encuadra, así como de los propósitos y los aprendizajes esperados, a fin de proporcionar un panorama general de los aspectos a abordar en el proceso educativo. En este sentido es pertinente, dar a conocer al estudiante la estructura lógica de la unidad didáctica o conjunto de actividades relacionadas y secuenciadas que se van a trabajar en el aula o laboratorio, esto se sugiere con la intención de lograr que los estudiantes conozcan la orientación y los fines de la actividad que el profesor plantea, a fin de promover su comprensión y participación en el proceso educativo (Díaz y Hernández; 2002).

La unidad didáctica deberá partir de un enunciado que brinde una panorámica del proceso a realizar, que ilustre las **expectativas o intencionalidades formativas** que se pretende lograr. Este elemento es sustancial en la propuesta de unidad didáctica sin embargo deberá ir acompañado de un conjunto de actividades secuenciadas que permitan abordar en profundidad los contenidos de cada unidad de referencia. En términos generales el enunciado solicitado, parte del hecho de señalar el problema concreto a trabajar en el aula o laboratorio, a partir del desarrollo de procesos técnicos, la resolución de problemas y el trabajo por proyectos como prácticas de laboratorio.

La propuesta de las **actividades secuenciadas** deberá contar con una explicación detallada de los ejercicios o tareas a realizar, durante las diferentes sesiones que ocupe la unidad, a través de las cuales se alcanzarán los propósitos definidos. Una vez definidas el conjunto de actividades que integran la unidad didáctica, es necesario señalar los **propósitos específicos** para cada una de las actividades propuestas, los cuales deberán alinearse con los propósitos del bloque de referencia (Díaz y Hernández; 2002).

La unidad didáctica tendrá que señalar los **materiales** y **recursos didácticos** a emplear en las actividades propuestas a lo largo de la unidad didáctica. En este sentido entran a evaluación y consenso las referencias bibliográficas, equipos y material de laboratorio empleados por el maestro para realizar las prácticas de laboratorio. Finalmente, los **tiempos** que se prevén para el desarrollo de las actividades programadas en la unidad didáctica. Es importante señalar que los tiempos serán definidos según su pertinencia de acuerdo al nivel de profundización que se pretende lograr o por el tipo de actividad propuesta.

7. RESULTADOS: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

En el siguiente apartado se expondrán los resultados obtenidos a partir del estudio fitoquímico preliminar de las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus* desde la recolección del material vegetal hasta el fraccionamiento de los extractos etanólicos depurados con el fin de elucidar algunos de los compuestos mayoritarios de las especies por medio de la metodología CLAE.

7.1 Recolección del material vegetal.

Se colectaron 14 muestras en total, 5 muestras correspondientes a individuos pertenecientes a *C. funckianus* y 9 muestras pertenecientes a *C. bogotanus*, llevando un registro de la geoposición de cada árbol. Las muestras de *C. funckianus* se colectaron en el municipio de Fusagasugá, (Cundinamarca – Colombia) vereda Bosachoque (bosque natural) con coordenadas: Vereda Bosachoque Km 5 Vía Fusagasugá, Bosque Villa Rita. Las muestras de *Croton bogotanus* se colectaron en las localidades de Chapinero y Teusaquillo correspondientes a la ciudad de Bogotá D.C. (Colombia). Cada una de las especies colectadas se prepararon especímenes de herbario, los cuales se determinaron en el Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá-, en donde reposan los ejemplares con su respectivo número de radicación. En las fig. 5 a 7 se muestran los sitios de recolección de las especies, mapas obtenidos por la aplicación de Google Earth.

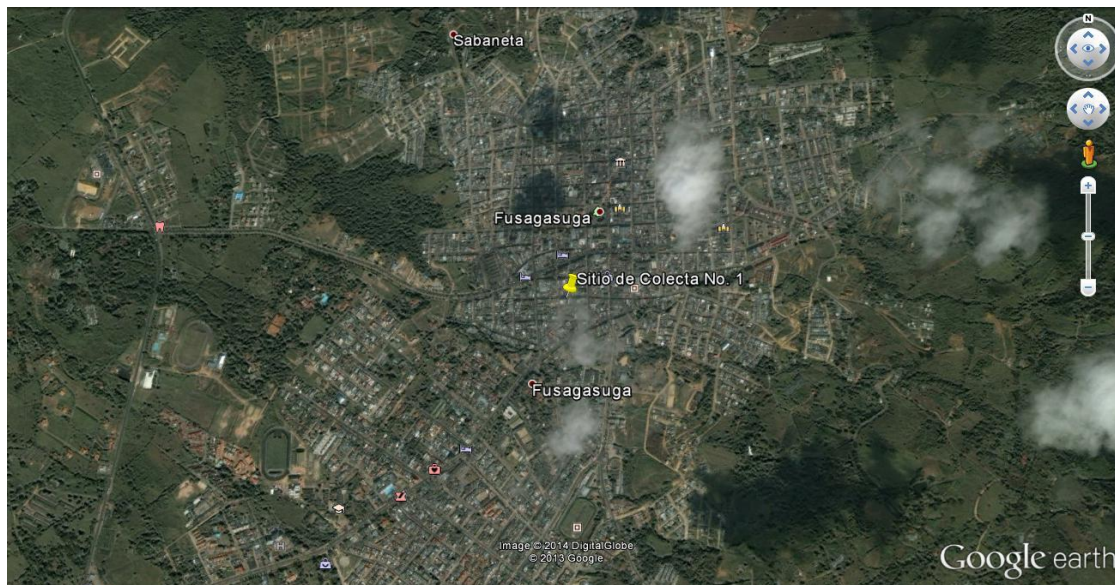


Fig. 5: Posición geográfica de la colección de las especies de *Croton* en el municipio de Fusagasugá, Ubicado en el departamento de Cundinamarca. Colombia.

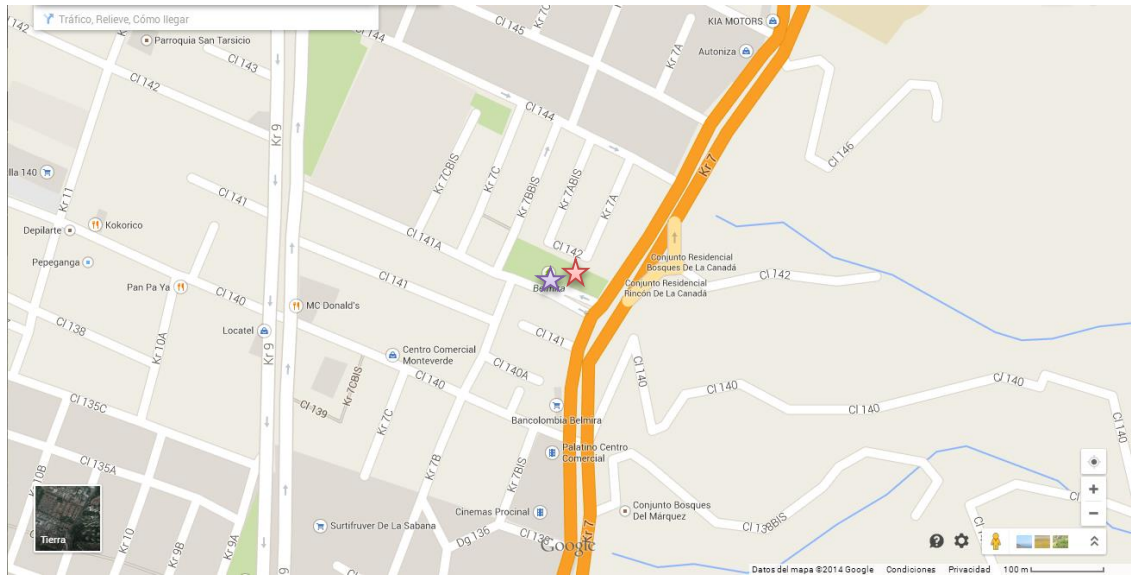


Fig. 6: Posición geográfica de la colección de las especies de *Croton bogotanus* (CB1: Rojo, CB2: Morado) en el sector de la séptima. Ubicado en Bogotá. Colombia.

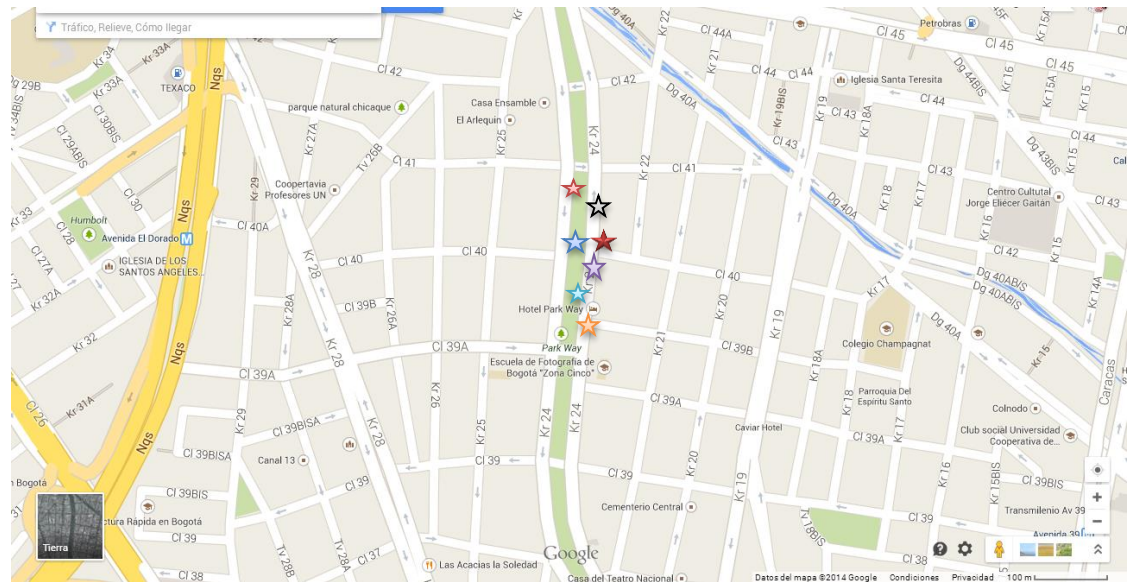


Fig. 7: Posición geográfica de la colección de las especies de *Croton bogotanus* (CB4: Rojo, CB5: Negro, CB6: Azul, CB7: Morado, CB8: Azul claro CB9: Violeta y CB10: Naranja) en la zona del Park Way, Ubicado en la localidad de Teusaquillo, Bogotá. Colombia.

En la tabla 5 se ilustra las coordenadas de los sitios de recolección del material vegetal.

POSICION GEOGRAFICA DE LOS DIFERENTES SITIOS DE RECOLECCION DEL MATERIAL VEGETAL.			
Especie	Ubicación	Latitud	Longitud
<i>C. funckianus</i>	Fusagasugá	4° 20' 37.71" N	4° 21' 42.89" O
<i>C. bogotanus</i> CB1	Séptima	4°8'39.5604" N	74°1'51.7974" O
<i>C. bogotanus</i> CB2	Séptima	4°8'39.5604" N	74°1'51.7974" O
<i>C. bogotanus</i> CB4	Park Way	4°40'39.2052" N	74°2'36.6634" O
<i>C. bogotanus</i> CB5	Park Way	4°40'47.7192" N	74°2'39.9264" O
<i>C. bogotanus</i> CB6	Park Way	4°41'14.7870" N	74°3'28.3494" O
<i>C. bogotanus</i> CB7	Park Way	4°37'38.7228" N	74°4'31.1340" O
<i>C. bogotanus</i> CB8	Park Way	4°37'41.6676" N	74°4'31.5726" O
<i>C. bogotanus</i> CB9	Park Way	4°37'41.6676" N	74°4'31.5726" O
<i>C. bogotanus</i> CB10	Park Way	4°37'38,4162" N	74°4'31.3630" O

Tabla 5: Posición geográfica de los sitios de recolección del material vegetal. Información suministrada por el Global Position System (GPS).

7.2 Elaboración de los extractos etanólicos y obtención de los extractos secos.

Según los protocolos estandarizados en el laboratorio de Química Orgánica (Bioorgánica) de la Universidad Militar Nueva Granada, en primera instancia después de colectado el material se dispuso el mismo en unas bandejas para su secado a temperatura ambiente durante un tiempo aproximado de 3 a 8 días. Posteriormente, para la reducción del tamaño de las hojas secas se utilizó un homogenizador para facilitar la extracción de los compuestos químicos. El material homogenizado se depositó en bolsas transparentes Ziploc para luego pesarlo y obtener así el resultado final del total de material seco. En la Fig. 8 se muestran algunos de los materiales homogenizados y almacenados.



Fig.8: Algunas muestras del material vegetal homogenizado para la elaboración de los extractos etanólicos.

El siguiente paso fue la obtención de los extractos etanólicos, empleando como solvente orgánico etanol (EtaOH) con una concentración al 96%, se empleó este solvente ya que es el que tiene más polaridad con compuestos orgánicos de origen vegetal además de que es el menos tóxico. El procedimiento fue depositar el material vegetal homogenizado en frascos de vidrio y posteriormente se agregó el solvente de tal manera que quede cubriendo más de la mitad de la muestra vegetal. Se dejó aproximadamente entre 5 a 10 días para que el solvente fuese retirando la gran mayoría de los compuestos.

Teniendo el material vegetal en presencia de EtaOH, el siguiente paso fue la extracción de los compuestos presentes en los extractos etanólicos empleando un rotaevaporador automático marca IKA modelo RV10-CONTROL. Para la realización de este procedimiento inicialmente se filtró el extracto etanólico en un balón de 500 ml, posteriormente este es colocado en el rotaevaporador con un tiempo aproximado de una hora hasta que el líquido presente en el balón no se encuentre. Cabe resaltar que como el equipo es de modo automático para la extracción del etanol se debió llevar a cabo a una temperatura de 40°C, con una presión de 120 ba (bares) a 100 rpm (Fig. 9).

Luego del proceso de rotaevaporación el contenido resultante en el balón es retirado con EtaOH y se deposita en frascos de vidrio para su secado en un horno a temperatura de 40°C, procedimiento que da como resultado la obtención de los extractos secos y empleados para el análisis de fenoles totales, flavonoides, actividad antioxidante y análisis por CLAE.

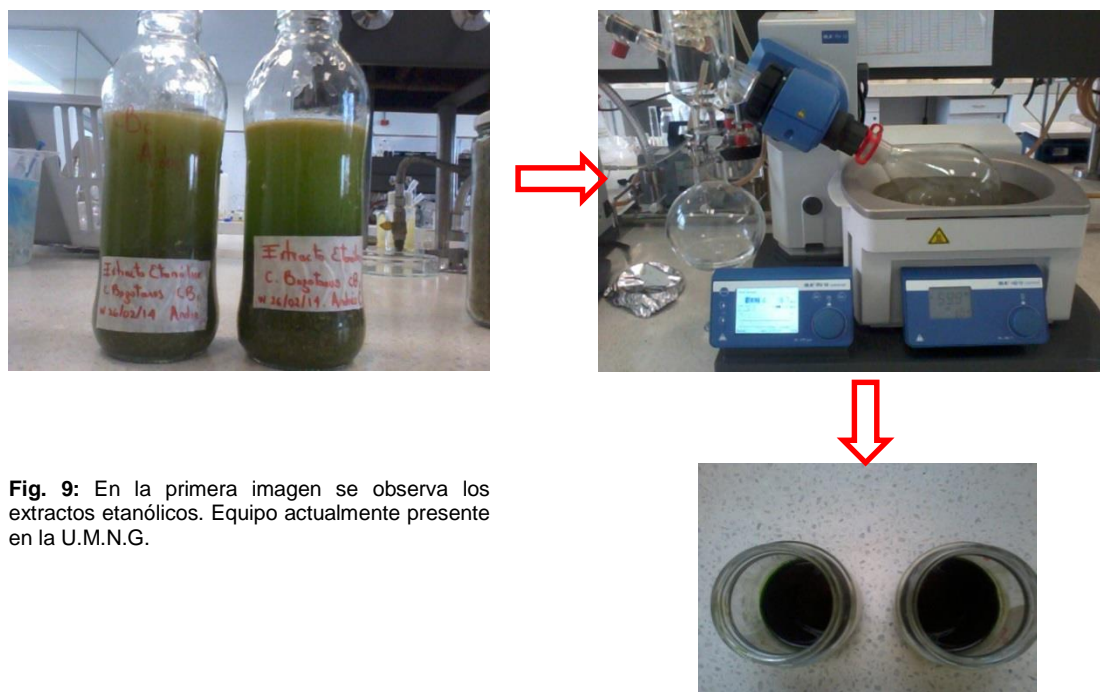


Fig. 9: En la primera imagen se observa los extractos etanólicos. Equipo actualmente presente en la U.M.N.G.

En la fig. 10 se muestra una relación entre el material homogenizado y el material seco después de rotaevaporado y secado en el horno.

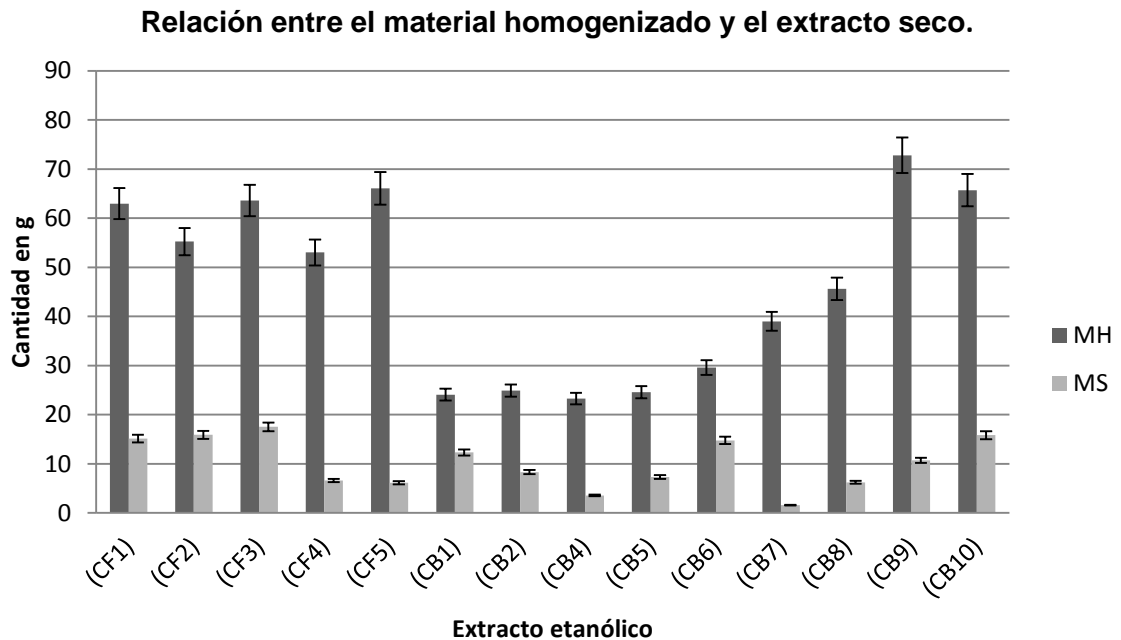


Fig. 10: Relación entre los pesos finales del material vegetal homogenizado y el peso final de los extractos secos después de rotaevaporados. Cantidad dada en gramos con barras de error del 5%. (MH: Material Homogenizado, MS: Material seco).

Como se puede evidenciar en la fig. 10, existen algunas diferencias significativas en cuanto a los resultados finales de los extractos homogenizados y los extractos secos después de rotaevaporados. Las iniciales CF corresponden a los extractos etanólicos derivados de las especie *C. funckianus*, mientras que los extractos derivados de la especie *C. bogotanus* se encuentran representados por las iniciales CB.

Analizando las barras de los extractos homogenizados, se identifica que las muestras CF₁, CF₂, CF₃ y CF₄ son los extractos mayoritarios pues son los que contienen entre un 55 y 65% de material vegetal al igual que las muestras CB₉ y CB₁₀. Incluso la CB₉ es la que posee mayor contenido con aproximadamente 72g de material. De igual manera, de estos mismos extractos se obtuvo la mayor cantidad de extracto seco aunque los pesos finales no superan los 20g excepto los extractos CF₄ y CF₅ que no superan aproximadamente los 10g. Las muestras vegetales que poseen registrados los pesos más bajos son los que se encuentran dentro del rango de 22g a 45g, los cuales se encuentran presentes en las muestras CB₁, CB₂, CB₄, CB₅, CB₆. CB₇ y CB₈.

7.3 Análisis fitoquímico preliminar (A.F.P).

El presente A.F.P de las hojas de *C. funckianus* se partió de un extracto etanólico seco puesto que este solvente tiene la capacidad de extraer compuestos de una amplia gama de polaridades, además de ser la menos costosa y tóxica. La metodología para este análisis fue previamente estandarizada por Sanabria; 1983 y contempla la detección de los metabolitos secundarios generalmente relacionados con actividades biológicas.

La marcha fitoquímica preliminar consistió en un conjunto de pruebas de coloración y/o precipitación que nos dan el indicio de los posibles tipos de metabolitos secundarios que se encontraron en el extracto etanólico seco. Esta marcha se realizó con el extracto de la muestra *C. funckianus* (CF₁) con pruebas de identificación para taninos, flavonoides, carotenoides y alcaloides (Sanabria; 1983), (Bilbao; 1997), (Shenoy *et al.*, 2009), para la comparación de estos resultados se utilizaron controles positivos.

A continuación se presenta la discusión de los resultados consignados en la tabla 6, en relación a las hojas de las especie *C. funckianus*. Este análisis fue guiado por la M.Sc Juliana Cardona, asociada a la facultad de Ingeniería de la Universidad Militar Nueva Gradada en las instalaciones del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI), ubicado en el centro de la ciudad de Bogotá en Marzo de 2014.

ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR			
METABOLITO	PRUEBA	HOJA	RESULTADO
Alcaloides	Dragendorft	(-)	No detectado.
	Wagner	(+)	Presencia escasa.
	Hager	(+)	Presencia escasa.
	Filtrado A	(+)	Presencia escasa.
	Filtrado B	(-)	No detectado.
	Filtrado C	(+)	Presencia escasa.
	Filtrado D	(-)	No detectado.
Flavonoides	Prueba de Shinoda y con Ácido sulfúrico.	(++)	Presencia relativamente abundante.
Taninos	Prueba con Acetato de plomo y Cloruro Férrico.	(++)	Presencia relativamente abundante.
Carotenoides	Cloroformo sobre ácido sulfúrico	(-)	No detectado

Tabla 6: Resultados del A.F.P de las hojas de *C. funckianus*. Sanabria; 1983.

Después de secado los extractos vegetales en el horno de secado, se cogió uno de ellos para su respectivo análisis, en donde se tomó una porción de 1ml el extracto etanólico seco de *C. funckianus* en un tubo de Eppendorf con 1ml de Acetato de Plomo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$) para la precipitación de clorofilas debido a que el extracto se encontró concentrado y por ende no posibilitaba la elucidación de los metabolitos presentes (Sanabria; 1983) (Fig. 11).



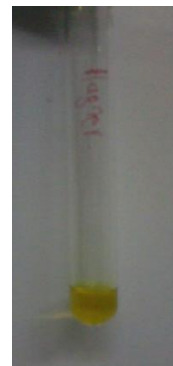
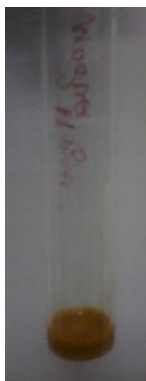
Fig. 11: Se muestra la precipitación de las clorofilas con presencia de Acetato de Plomo, evidenciándose en el precipitado del tubo de Eppendorf.

7.3.1 Alcaloides.

Para mirar la presencia o la ausencia de estos metabolitos se realizó con tres pruebas diferentes cada una de ellas propuesta por Sanabria; 1983. Se realizó inicialmente la de Wagner la cual es una solución de yodo-yoduro de potasio. Solución de 12.7 g y 20 g de yoduro de potasio. Se evidenció la presencia de un precipitado café con alcaloides. La segunda prueba fue la de Dragendorff, esta contenía subnitrate de bismuto disuelto en 20 ml de HNO_3 y esta se añadió a 28g de KI en 50 ml de agua, en donde el reactivo formo un precipitado naranja-marrón con la mayoría de los alcaloides aunque no fue del 100% concluyente. La última de las pruebas fue la reacción de Hager (reacción del ácido pícrico) es una solución acuosa saturada de ácido pícrico da precipitados cristalinos de forma que permiten la caracterización microquímica de los alcaloides, el resultado de la prueba fue positiva (Tabla 7).

Uno de los mayores inconvenientes para realizar las pruebas de reconocimiento de estos metabolitos, es la especificidad de las mismas, puesto que, uno de los problemas al ejecutar este método es la formación de falsos positivos, que se pueden dar por lo general debido a la presencia de un grupo carbonilo α - β insaturado, además de posiciones oxigenadas cercanas a una alta densidad

electrónica (carbono beta unidos a grupos alquilo); por esta razón, aunque las pruebas para alcaloides dieron un resultado positivo al realizar la marcha fitoquímica preliminar, no se puede afirmar completamente la presencia de estos en este extracto por ende se procedió a realizar prueba de confirmación para estos metabolitos. (Tabla 8) (Chiappe; 2013).



Prueba de Wagner donde se evidencia la formación de un precipitado café en el tubo de ensayo, resultado de la prueba positivo.

Prueba de Dragendorff donde no se evidencia por completo una coloración amarilla, roja o naranja. Resultado de la prueba no concluyente

Prueba de Hagner donde se observa una coloración amarilla dando como resultado de la prueba positivo para la presencia de alcaloides.

Tabla 7. Prueba inicial para la evaluación de la presencia o ausencia de Alcaloides en *C. funckianus*.

Los alcaloides fueron el grupo de metabolitos secundarios que se encontraron presentes en una concentración relativamente baja, sin embargo, la cantidad del precipitado obtenido fue proporcional a la concentración de alcaloides en la muestra, se puede inferir que las hojas son el órgano de la planta donde tiene lugar la mayor acumulación de alcaloides de acuerdo a la bibliografía (Carvajal *et al.*, 2009), aunque también cabe aclarar que se pueden encontrar tanto en tallos como en semillas si se les evalúa de una manera más exhaustiva.

Es conocido que en las especies del género *Croton* se han encontrado diferentes tipos de alcaloides derivados del núcleo de la tetrahidroprotoberberina como por ejemplo la hemiargirina, aislada de la especie como *Croton hemiargyreus* además que se encuentran reportes de la presencia de alcaloides de tipo aporfínico como la glaucina y la taspina (Carvajal *et al.*, 2009).





PRUEBA	RESULTADO	IMAGEN
Filtrado A	Extracción con Ácido clorhídrico (HCl) con una concentración al 5% el cual se extrajo a una temperatura de 60° C. Se genera una precipitación al fondo del tubo de Eppendorf. Al resultar positivo se realiza la siguiente prueba con Hidróxido de Sodio (NaOH), se filtra y se extrae con cloroformo (CHCl ₃)	
Filtrado B	Al realizase el procedimiento con Hidróxido de Sodio (NaOH), se filtra y se extrae con cloroformo (CHCl ₃), la muestra se pone a calentar para eliminar el contenido de cloroformo y lo resultante se extrajo con Ácido clorhídrico y se filtró en frio. Como resultado no mostro ninguna reacción del contenido en el tubo de Eppendorf.	
Filtrado C	Para obtener el resultado se extrajo de la reacción con Hidróxido de Sodio (NaOH), y cloroformo (CHCl ₃) un volumen de 25 ml el cual se centrifugó y se formó la fase acuosa, de esa fase se evaporo la fase de cloroformo y el resultado se filtró para luego agregar Ácido clorhídrico al 5% dando como resultado una precipitación en el fondo del tubo de Eppendorf, arrojando como resultado la presencia de alcaloides fenólicos.	
Filtrado D	De los restos de la capa acuosa 1 se llevó a un pH 2, se evapora y se filtra. Al filtrado se le denomina D y se realiza la prueba con ácido clorhídrico dando como resultado negativo en la no formación de precipitados.	

Tabla 8: Pruebas de confirmación para evaluar la presencia de alcaloides.

7.3.2 Flavonoides.

El AFP de las hojas de *C. funckianus* permitió comprobar también la presencia de flavonoides en la especie ya que en el órgano a evaluar se obtuvieron resultados positivos con la primera reacción : Shinoda (Coloración roja con Mg en polvo con presencia de ácido clorhídrico), lo anterior indica la presencia de flavonoides de tipo flavona, flavonól, flavononas, flavanonol, isoflavonoide y leucoantocianidinas ya que el anillo de Gamma benzopirona reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y Magnesio (Carvajal *et al.*, 2009). La segunda de las pruebas se realiza con ácido sulfúrico (H₂SO₄) arrojando resultado positivo evidenciado en la formación de precipitado amarillo debido a que las flavonas y flavonoles generan ese color (fig. 12). Para esta prueba se toma como control positivo quercetina.



Fig. 12: Prueba para evaluar la presencia de flavonoides, en el primer lugar de la placa de excavado se encuentra el patrón quercetina y en el último lugar la presencia del extracto de *C. funckianus* con coloración amarilla.

7.3.3 Taninos.

Al extracto de *C. funckianus* se le realizaron dos pruebas, la primera de ellas se llevó a cabo con Acetato de Plomo (Pb (C₂H₃O₂)₂) agregando 5ml del reactivo. Es una reacción para conocer polifenoles, por otro lado, los taninos reaccionaron con una solución de acetato de plomo, produciéndose turbidez o precipitado blanco. La segunda prueba se realizó sobre una placa de excavado en donde a 1 ml del extracto se agrega 5 ml de Cloruro Férrico (FeCl₃). Es reacción es para conocer polifenoles. Los taninos reaccionaron con una solución acuosa de tricoluro férrico al 1% con lo cual se obtienen coloraciones intensas de color rojo, azul (taninos derivados del ácido gálico) o verde (taninos derivados del protocatético) (Sanabria; 1983).

Los resultados positivos de estas pruebas nos infieren que en las hojas de la especie se encuentra una cantidad de taninos producidos por la planta puesto que las pruebas se basan en la propiedad que tienen estos compuestos de producir

precipitados con sales de plomo y hierro, además de la formación de soluciones azules o negras al ser adicionado el cloruro férrico, esta última prueba es específica para reconocer grupos fenólicos, dando coloración azul para derivados del ácido gálico tal como se mencionó anteriormente (Chiappe; 2013) fig.13.

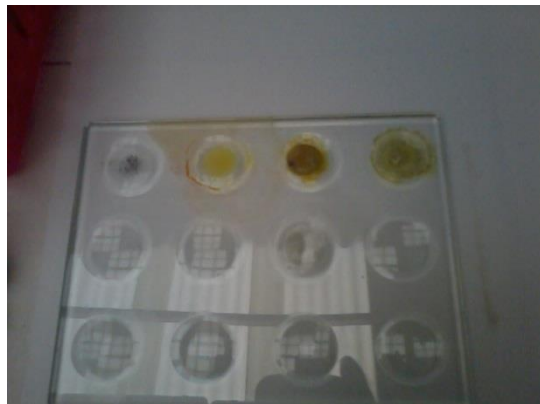


Fig. 13: Resultados de la segunda prueba realizada para determinar la presencia de taninos.

7.3.4 Carotenoides.

Estos compuestos pertenecen al grupo de los isoprenoides. Los carotenoides son compuestos amarillos, anaranjados o rojos ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal. En las plantas superiores se encuentran junto con las clorofilas. Para la determinación fitoquímica se realiza estratificando una solución etérea o clorofórmica del carotenoide sobre H_2SO_4 del 85%, formándose en la zona de separación de ambas capas un color azul. Se realizó esta prueba con 1ml del precipitado del extracto etanólico y se traspasa con una micropipeta a un tubo de Eppendorf donde se le adiciona la solución clorofórmica con ácido sulfúrico, dando como resultado la no presencia de este compuesto pero si podría indicar la presencia de otros compuestos como esteroides o triterpenoides basándonos en la prueba de Liebermann-Burchard, prueba que se basa en la formación de complejos coloreados o formación en fases (Chiappe; 2013) fig. 14.

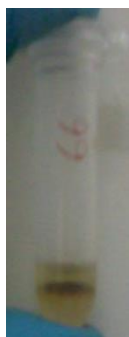


Fig. 14: Prueba para carotenoides, se observa una fase intermedia en medio de la solución pero no se obtiene los resultados esperados por la literatura reportada, deben verse colores amarillos, naranjas o rojos pero como se observa se ve es una coloración oscura.

Para confirmar de alguna manera la posible presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y determinar de acuerdo a ellos una posible capacidad antioxidante, de los extractos de *Croton* se realizaron las pruebas mediante métodos convencionales, los cuales se describen en el siguiente ítem.

7.4 Contenido total de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.

Los métodos de Folin-Ciocalteu de Jimoh *et al*; 2011 en carbonato de sodio, con su previa estandarización permitieron determinar el contenido total de fenoles. El contenido de flavonoides mediante la disolución de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) y acetato de sodio Jimoh *et al*; 2011, posibilitaron determinar el contenido de flavonoides presentes en los extractos etanólicos (Fig. 15). Finalmente el reactivo DPPH (Brand-Williams; 1995), mediante su decoloración en presencia del extracto permitió establecer la capacidad antioxidante del material vegetal trabajado.

Los datos obtenidos en las pruebas metodológicas de fenoles totales y flavonoides se trataron estadísticamente para validar los datos obtenidos y fortalecer los resultados así como el análisis de los mismos, para tal efecto se comienza hallando el promedio equivalente en miligramos de ácido gálico sobre gramos del extracto para fenoles y para flavonoides el promedio equivalente en miligramos de quercetina sobre gramos del extracto. Los resultados obtenidos para la prueba de capacidad antioxidante se analizaron mediante el software estadístico PRIMMS 6.0® para establecer el índice de inhibición media (IC_{50}).



Fig. 15: Extractos etanólicos empleados para el análisis del contenido total de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.

Posteriormente, se realizó a los resultados obtenidos un análisis de varianza (ANOVA) mediante el paquete estadístico Infostat versión 2014, lo que permitió establecer que existe una diferencia significativa para cada prueba de cuantificación de fenoles, flavonoides e IC₅₀ al considerarse un $p \geq 0.05$ para los datos. Además, se aplicó una prueba TUKEY para determinar la diferencia significativa honesta (DSH), que agrupó los datos de acuerdo a la homogeneidad de sus medias, grupos que se designan con letras. A continuación se presentan en la tabla 9 los valores obtenidos.

Muestra	Contenido total de fenoles	Contenido total de flavonoides	IC ₅₀
CF ₁	205.9±1.76 ^d	38.5±1.83 ^{cd}	13.55±2.01 ^{ab}
CF ₂	436.2±2.92 ^g	22.1±0.40 ^{ab}	10.78±1.56 ^a
CF ₃	247.0±1.29 ^e	49.9±2.10 ^{de}	32.56±2.9 ^c
CF ₄	271.1±4.98 ^e	9.5±0.04 ^a	14.44±1.84 ^{ab}
CF ₅	261.6±2.95 ^e	49.7±2.18 ^{de}	10.1±1.12 ^a
CB ₁	124.1±1.70 ^{bc}	32.8±0.93 ^{bc}	124.1±3.07 ^g
CB ₂	317.5±1.33 ^f	9.2±0.06 ^a	29.54±2.67 ^{bc}
CB ₄	99.3±1.61 ^{ab}	12.2±0.03 ^a	70.4±9.66 ^{de}
CB ₅	319.9±2.47 ^f	100.7±0.45 ^f	2.871±8.68 ^a
CB ₆	149.2±2.24 ^c	51.2±0.26 ^{de}	19.87±2.59 ^{abc}
CB ₇	94.4 ±1.77 ^a	64.1±1.79 ^e	84.69±10.1 ^{ef}
CB ₈	146.0±2.61 ^c	12.7±0.24 ^a	7.696±2.94 ^a
CB ₉	78.2±0.75 ^a	42.1±2.72 ^{cd}	60.1±1.18 ^d
CB ₁₀	106.1±1.18 ^{ab}	10.9±0.33 ^a	88.07±1.87 ^f

Tabla 9: Contenido promedio de fenoles totales, flavonoides e IC₅₀ de los 14 extractos etanólicos de *C. funckianus* y *C. bogotanus*. Valores (±) intervalo de confianza como resultado de tres replicas. Resultados con la(s) misma (s) letra (s) expresa (n) que no significativamente diferentes ($P \geq 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey (grupos con igualdad de varianzas).

7.4.1 Contenido total de Fenoles.

En la fig. 16 se presenta el contenido de fenoles totales de las catorce (14) muestras de *Croton*, de las cuales se puede observar que todas contienen fenoles, debido a la presencia de compuestos aromáticos que poseen un grupo hidroxilo –OH unidos a un anillo aromático en su estructura; los cuales fueron detectados a 765 nm mediante el espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300M gracias a la formación de los cromóforos basados en los cromógenos óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) obtenidos luego de la reacción de los fenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu puesto que, funciona midiendo la cantidad de la sustancia analizada que se necesita para inhibir la reacción del reactivo (Vinson *et al.*, 2005).

Se observa en la Fig. 16 que la muestra con el menor contenido de fenoles totales es la muestra CB₉ con 78.2 ± 0.30 mg AG/g Ex, seguido de la muestra CB₇ con 94.4 ± 0.71 mg AG/g Ex, agrupados por la prueba Tukey, datos que se observan en la tabla 8 y en la figura 15, en el grupo a; mientras que las muestras con el mayor contenido de fenoles totales son: CF₂ con una concentración de 436.2 ± 1.17 mg AG/g Ex seguida de la muestra CB₂ con 319.9 ± 0.54 mg AG/g Ex agrupados en dos grupos diferentes, g y f respectivamente.

Las demás muestras poseen un contenido de fenoles totales entre los 100 mg AG/g Ex hasta los 320 mg AG/g Ex como se puede evidenciar en la fig. 15, sin embargo la prueba *Tukey* demostró que hubo diferencias significativas evidenciadas en la agrupación de las muestras: las muestras CB₄ y CB₁₀ son clasificadas en el grupo b debido a su cercanía a los 100 mg AG/g Ex, las muestras CB₁, CB₆ y CB₈ fueron clasificadas en el grupo c por contener un contenido de polifenoles entre 124 y 149 mg AG/g Ex.

Se puede también apreciar en la fig. 16, que el contenido de fenoles totales en las muestras evaluadas es independiente de la especie y su ubicación geográfica, además se puede observar que las muestras que fueron tomadas en una misma zona, como lo son las muestras CB₁ y CB₂ colectadas en la zona de la séptima o las muestras CB₄ a la CB₁₀ en el Park Way poseen diferencias significativas entre sí.

En comparación con el estudio reportado por Méndez *et al.*, 2014, el contenido de fenoles totales evaluados a un extracto etanólico proveniente de hojas de la especie *Croton niveus* colectada en el departamento del Atlántico (Colombia), demostró que el contenido de polifenoles evaluado mediante el método de Folin-Ciocalteu presentó un contenido de 48 ± 2 mgEAG/ mg de extracto, un resultado inferior al obtenido en nuestro estudio, lo que infiere que las especies de *Croton* ubicadas en la zona andina probablemente posean los contenidos de fenoles más altos que las especies reportadas en la zona Caribe colombiana.

De los resultados obtenidos se identifica que, por lo menos, todos los extractos contienen compuestos polifenólicos en cantidades significativas lo que podría justificar de alguna manera el uso medicinal que se le atribuye y el aumento de estudios de tipo farmacológico, además de su habilidad para atraer y capturar radicales libres, la que está relacionada con la presencia de su grupo hidroxilo y afines (Gülçin *et al.*, 2003). Por otro lado, hay una clara relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos en las plantas estudiadas como era de esperarse. Posiblemente, una planta con mayor contenido de compuestos fenólicos totales presenta una mayor capacidad antioxidante, sin embargo, se puede observar que algunas plantas presentan una capacidad antioxidante inferior a lo esperado, es decir, una baja actividad no siempre podría relacionar con el contenido de compuestos fenólicos. Esto puede ser un indicativo de que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como son la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes, o bien, una actividad pre-oxidativa que se contrapone con el potencial antioxidante.

El contenido de fenoles es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico, en especial para la capacidad antioxidante, en este orden de ideas, los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar del ácido graso protegiendo las células contra el daño de los radicales libres (García *et al.*, 2000).

A nivel vegetal, se ha reportado que estos compuestos pueden actuar interrumpiendo la reacción de oxidación de lípidos (Torel *et al.*, 1986), inhibiendo las reacciones de quimioluminiscencia (Krol *et al.*, 1996) y capturando varias especies reactivas de oxígeno (Bors *et al.*, 1999).

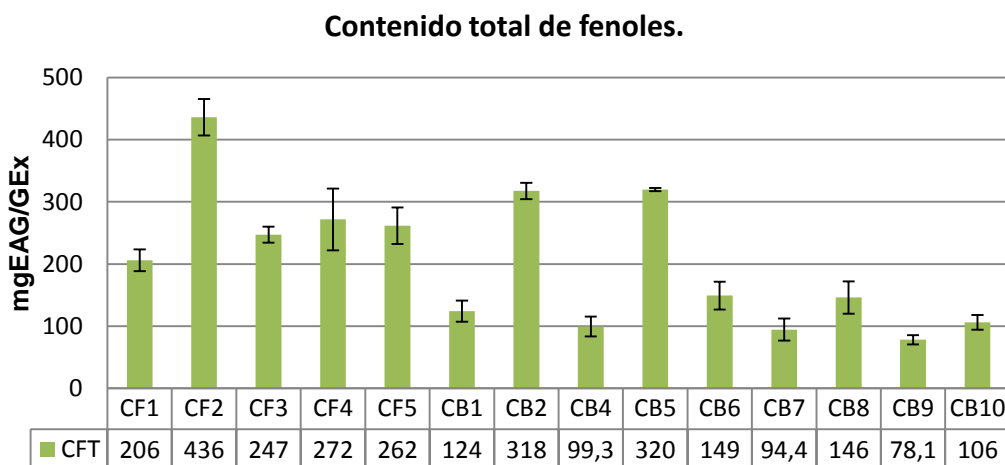


Fig. 16: Contenido de fenoles totales de las muestras de *Croton*. Valores (\pm) intervalo de confianza como resultado de tres replicas.

7.4.2 Contenido de flavonoides.

En la fig. 17 se observa que las muestras presentan un contenido de flavonoides totales, detectado gracias a la formación de cromóforos basados en el complejo flavonoide-aluminio, orto-dihidroxiados de color amarillo, detectado gracias a una longitud de onda de 420 nm por el espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300M. El método con $AlCl_3$ se basa en el acomplejamiento metálico, explicado como la formación del complejo entre el metal por quelatación con sales de flavilo rojas de color azul para las antocianinas y de color amarillo para los flavonoides (Rein; 2005 en Velásquez; 2013).

Entre las muestras con un mayor contenido de flavonoides se destaca la muestra *C. bogotanus* (CB₅) con 100.7 ± 0.45 mgEQ/gEx clasificada en el grupo f según la prueba *Tukey*, seguido de las muestras CB₇ con 64.1 ± 1.79 mgEQ/gEx agrupado en el grupo e y las muestras de CF₅ y CF₃ con 49.9 ± 2.10 mgEQ/gEx y 49.7 ± 2.18 mgEQ/gEx respectivamente y agrupadas dentro de la categoría de. La muestra con el menor contenido de fenoles totales fue la muestra CB₂ con 9.2 ± 0.06 mgEQ/gEx categorizada en el grupo a. Sin embargo, la mayoría de las muestras restantes poseen un contenido de flavonoides relativamente bajo cercano a 10 y 40 mg EQ/g Ex como se puede evidenciar en la fig. 17.

Cabe indicar que los flavonoides juegan un papel importante en la salud; es evidente que el consumo alto en alimentos ricos en compuestos fenólicos puede llegar a disminuir el riesgo de enfermedades crónicas, tales como la enfermedad cardiovascular y el cáncer (Boyer y Liu; 2004). Como se puede evidenciar en la fig. 16, el contenido de flavonoides resulto siempre tener las concentraciones las inferiores respecto al contenido total de fenoles.

Como era de esperarse, el contenido de flavonoides presentes en cada muestra al igual que el contenido de fenoles totales es independiente del sitio de colección, la cercanía de la especie o el estatus taxonómico puesto que, cada una de las muestras evaluadas presentó diferencias estadísticas significativas a partir de la prueba ANOVA y *Tukey*.

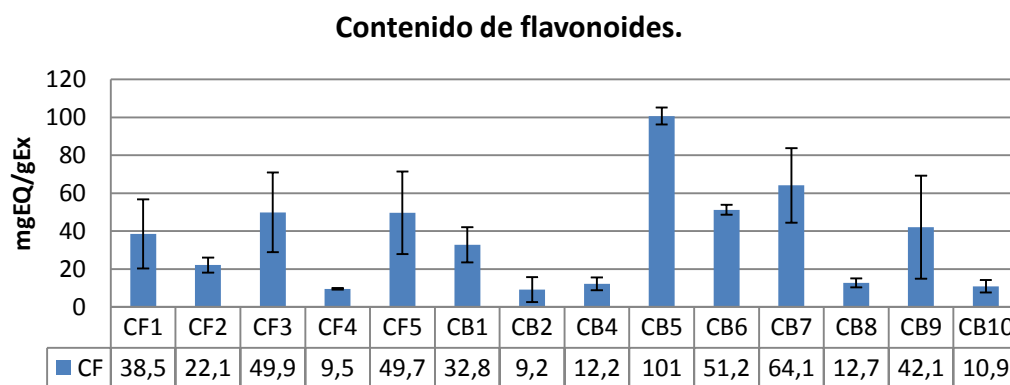


Fig. 17: Contenido de flavonoides de las muestras de *Croton*. Valores (\pm) intervalo de confianza como resultado de tres replicas.

Vale la pena señalar que la actividad antioxidante no está simplemente relacionada con los compuestos fenólicos totales determinados en los extractos. Los siguientes hechos deben ser tomados en cuenta: La existencia de agliconas libres y su incorporación a la determinación, además el hecho de que pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto. El sinergismo de los flavonoides con tocoferoles, palmitato de ascobilo y ácido cítrico ya ha sido reportado (Rizner *et al.*, 2000).

En comparación con el estudio reportado por Mohd Ali *et al.*, 2011, el contenido de flavonoides evaluados provenientes de hojas, tallo y raíz de la especie *Croton argyratus* revela un contenido de 17.78, 14.29 y 7.08 mgEC/g extracto seco respectivamente, lo que demuestra la posible existencia del contenido de flavonoides totales en los diferentes órganos vegetativos que componen la planta. Sin embargo, el contenido polifenólico encontrado en las hojas de *Croton argyratus* es bajo respecto al obtenido en nuestro estudio si lo comparamos con los resultados derivados de las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus*.

Como los resultados preliminares permiten ver que hay una cantidad significativa de los compuestos a los cuales se les atribuye actividad antioxidante, se decide realizar el estudio y análisis de la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos.

7.4.3 Análisis de la capacidad antioxidante.

El método DPPH permite medir la capacidad de reducción de los radicales libres que tienen los extractos etanólicos. Para el presente estudio, consistió en determinar la actividad del antioxidante (flavonoides y compuestos fenólicos) frente a una sustancia cromógena de naturaleza radical, midiendo la degradación del color

de una sustancia estable (Fig. 18). El método DPPH utiliza el reactivo 2,2-difenil-1-picril hidracilo como sustancia cromógena estable, solo puede disolverse en medio orgánico y su pico de absorbancia se encontró a los 517 nm. En base al análisis de los datos obtenidos en las mediciones por espectrofotometría, se analizaron en el programa estadístico PRISM 6.0 ® donde se obtuvo el índice de inhibición media IC_{50} de cada uno de los extractos además de su grafica correspondiente como se observa a continuación desde la fig. 19 hasta la fig. 32.



Fig. 18: Decoloración del color del reactivo DPPH en los extractos etanólicos.

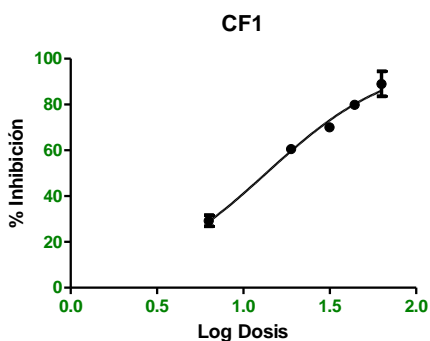


Fig. 19: IC_{50} *C. funckianus* (CF₁)

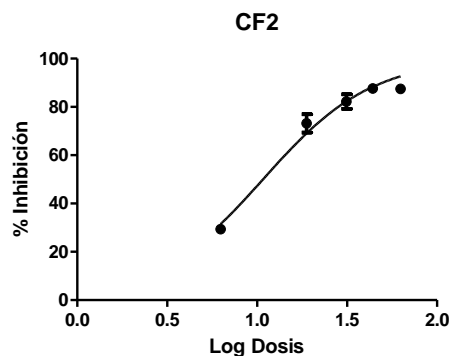


Fig. 20: IC_{50} *C. funckianus* (CF₂)

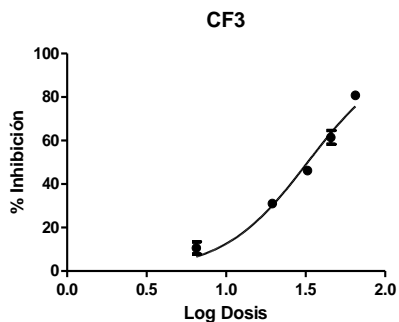


Fig. 21: IC_{50} *C. funckianus* (CF₃)

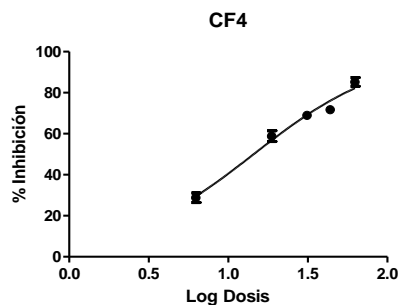


Fig. 22: IC_{50} *C. funckianus* (CF₄)

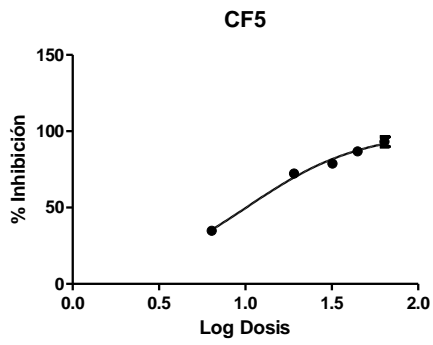


Fig. 23: IC₅₀ *C. funckianus* (CF₅)

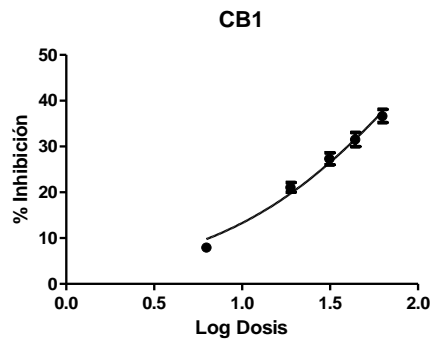


Fig. 24: IC₅₀ *C. bogotanus* (CB₁)

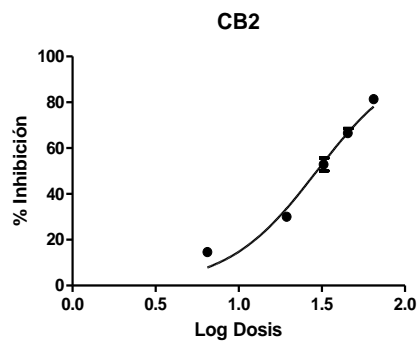


Fig. 25: IC₅₀ *C. bogotanus* (CB₂)

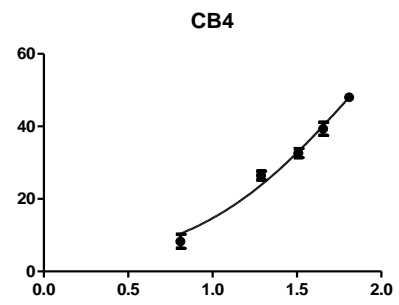


Fig. 26: IC₅₀ *C. bogotanus* (CB₄)

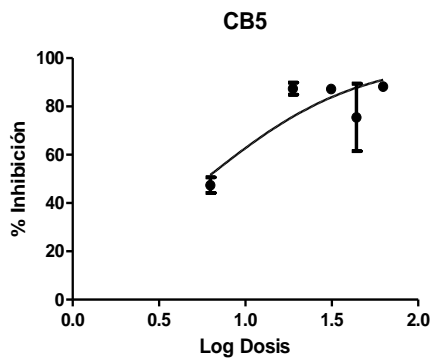


Fig. 27: IC₅₀ *C. bogotanus* (CB₅)

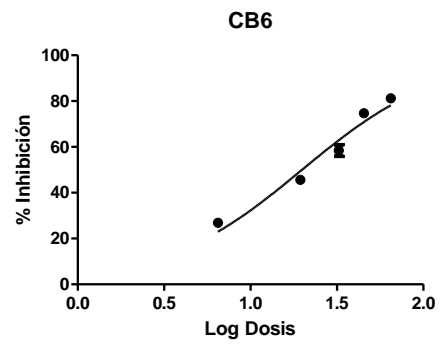


Fig. 28: IC₅₀ *C. bogotanus* (CB₆)

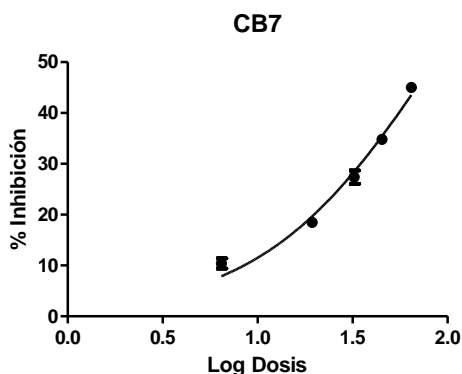


Fig. 29: IC₅₀ C. bogotanus (CB7)

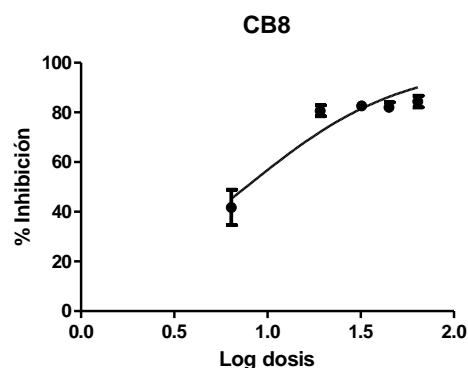


Fig. 30: IC₅₀ C. bogotanus (CB8)

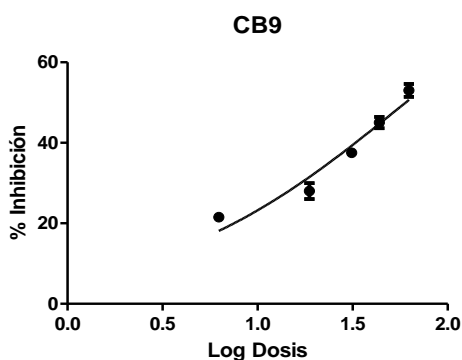


Fig. 31: IC₅₀ C. bogotanus (CB9)

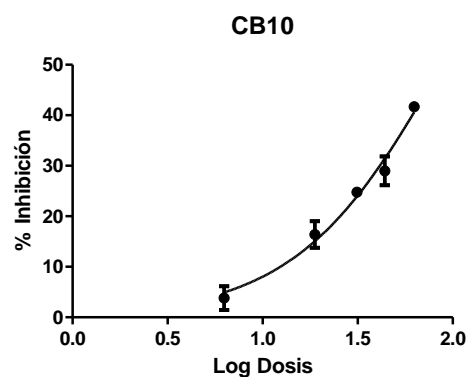


Fig. 32: IC₅₀ C. bogotanus (CB10)

Si bien es cierto que existen diferentes métodos para evaluar la capacidad antioxidante, ya sea *in vitro* o *ex vivo*, los métodos *in vitro* nos posibilitan tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. El método más utilizado es el DPPH ya que presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones aunque también, presenta diferencias entre las mismas mediciones. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa. Aunque la medición de la absorbancia se realizó a los 60 minutos, es recomendable medir en un periodo de tiempo más corto ya que, los radicales libres tienen vida media corta Kuskosky *et al*: 2005 en Castañeda *et al*; 2008.

Al utilizar este método, se observa que el extracto etanólico de la muestra CF₂ presentó una capacidad antioxidante con un IC₅₀ de 10.78±1.56 agrupada en el grupo a, al igual que la muestra CF₄ con un IC₅₀ de 14.44±1.84. Por otro lado, los extractos que poseen una menor capacidad antioxidante son CB₁ con un IC₅₀ de

124.1±3.07 clasificada dentro del grupo g y CB₁₀ con un IC₅₀ de 88.07±1.87 y categorizada en el grupo f.

En comparación con el estudio reportado por Mohd Ali *et al.*, 2011 en donde por el mismo método se evaluó la capacidad antioxidante de extractos etanólicos derivados de hojas, tallo y raíz provenientes de la especie *Croton argyratus* lo que demostró que solo las hojas presentan capacidad antioxidante atribuido a la composición química del contenido polifenólico y que este órgano evaluado obtuvo un IC₅₀ de 1.45 mg/ml, un resultado similar a la muestra CB₈.

Vale la pena mencionar que dentro de los objetivos de este trabajo, además de contribuir a la información sobre el contenido de flavonoides, fenoles y capacidad antioxidante, se planteó un perfilamiento utilizando la CLAE, con el fin de observar la posible variabilidad química de los extractos, de acuerdo a un método creado para este tipo de extractos enriquecidos en flavonoides y compuestos fenólicos que puede colaborar en estudios posteriores y permitiría determinar si un extracto posiblemente corresponde a estas especies de este género.

7.5 Análisis de los extractos por CLAE-DAD.

Se analizaron los extractos de 13 de las 14 muestras de *Croton*, con el método estandarizado para análisis de flavonoides en el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD) del laboratorio de Química Bioorgánica de la Universidad Militar Nueva Granada, a partir del cual se obtuvo el siguiente cromatograma graficado mediante software estadístico ORIGIN 9.1 Graphing & Analysis.

En la fig. 33 se evidencia el perfilamiento cromatográfico de 13 extractos etanólicos detectados a una longitud de onda de 420 nm y un tiempo aproximado de 22 minutos de detección de compuestos. Como se puede evidenciar en la fig. 33, se observan perfiles similares cada uno de ellos con la presencia de 13 picos luego de los 22 minutos de corrida los cuales corresponden a compuestos de tipo flavonoide diferentes cuyos tiempos de retención y porcentaje lo demuestran.

Para las muestras CF₁, CF₂, CF₃, CF₄, CF₅, pertenecientes a la especie *Croton funckianus* recolectadas en el municipio de Fusagasugá, se detectaron 15 picos en diferentes tiempos de retención y con elevaciones fluctuantes en los picos lo cual demuestra miliunidades de absorbancia (mUA) diferentes. Sin embargo, estas muestras presentan un pico mayoritario en común cercano a los 13 minutos donde el pico mayoritario que se encuentra con una mayor concentración está presente en la extracto CF₂, seguido de las extractos provenientes de las plantas CF₃ y CF₅, por último las muestras CF₁ y CF₄ son las que contienen las menores concentraciones de este compuesto según lo evidencia el cromatograma. Es importante resaltar que

las muestras de *Croton funckianus* evaluadas mediante este método no evidencian diferencias significativas en tanto que todas presentan similitudes en la biosíntesis de los compuestos que fueron detectados a una longitud de onda de 270 nm.

Las plantas de *Croton bogotanus* (CB₁, CB₂, CB₄, CB₅, y CB₆), de igual manera presentan el mismo pico mayoritario a los 12:90 minutos de retención mostrando que la muestra CB₆ es la que presenta el pico con mayor porcentaje de área expresado en mUA, seguido de las muestras CB₂ y CB₄ con aproximadamente entre 110.000 y 135.000 mUA. Por otro lado la muestra CB₄ presenta dos picos entre los 16:00 min y 16:30 min de retención lo que evidencia la presencia de un compuesto que podría corresponder a un compuesto de tipo flavonoides (el cual se debe confirmar por otras técnicas y métodos) que se encuentra presente de la misma manera en las plantas de *C. funckianus* presentes en Fusagasugá.

Por último las muestras CB₇, CB₈, CB₉ y CB₁₀ que están presentes en la zona del Park Way ubicado en la localidad de Teusaquillo, presentan el pico mayoritario a los 12:90 minutos de retención sin embargo, las mUA varían significativamente en cada una de ellas, es decir, que la muestra que presenta el mayor mUA es la CB₁₀ con 263.763 mientras que la muestra con el menor contenido es la CB₉ con 147662 mUA. Es importante mencionar que aunque variaron las concentraciones de este compuesto se puede observar correlaciones similares con las demás muestras evaluadas como se muestra en el cromatograma. Se identifica también que aunque la recolección en las muestras se realizó en lugares diferentes no presentaron un cambio significativo en su composición química.

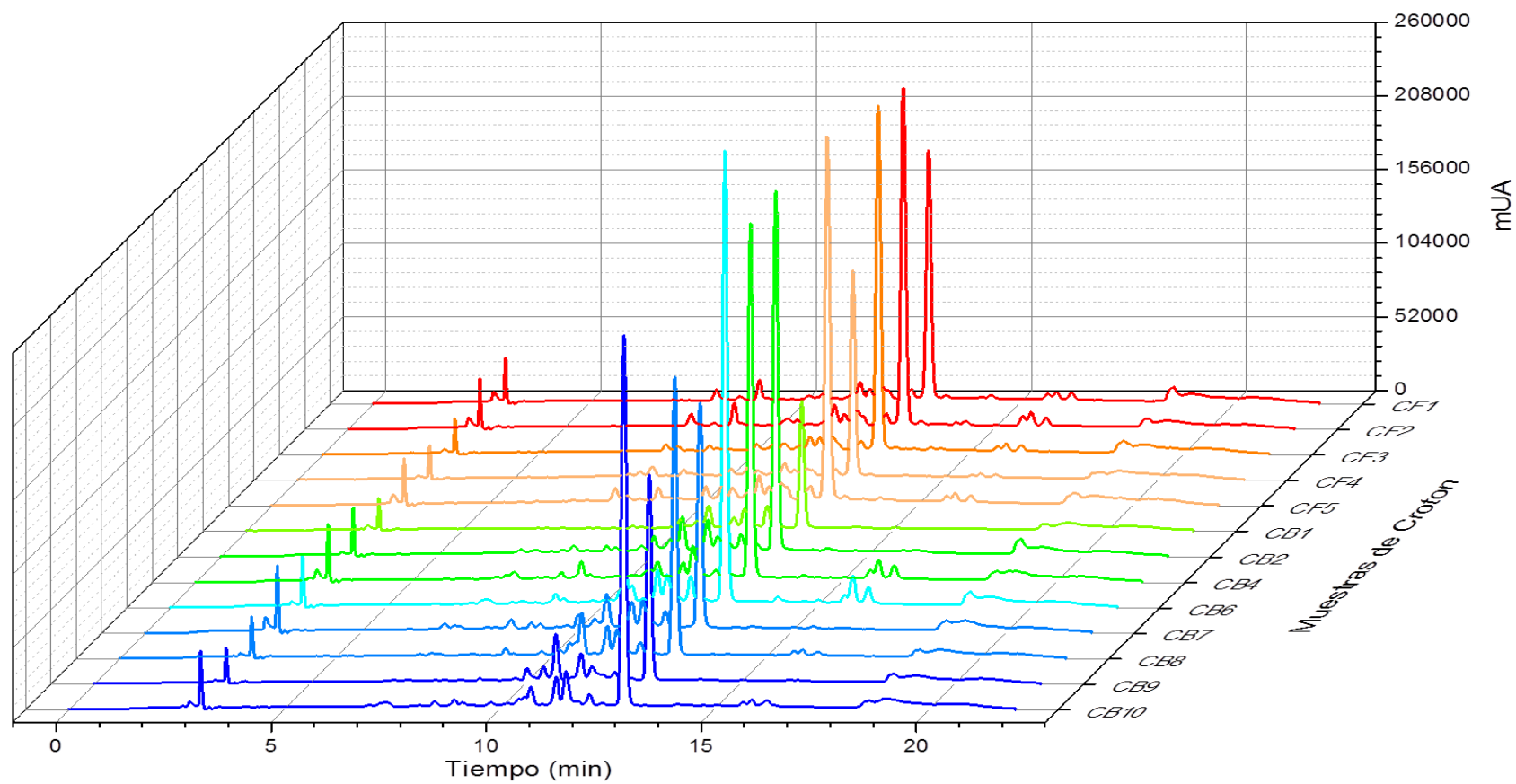


Fig. 33: Cromatograma obtenido por el método HPLC para 13 extractos de *Croton* obtenido mediante el software ORIGIN 5.0

7.6 Análisis de componentes principales (ACP).

El ACP permitió organizar todos los datos obtenidos de las múltiples pruebas que se realizaron con los extractos de *Croton*, de acuerdo con su variabilidad en dos factores o componentes principales, y de esta forma, visualizar cuales de las muestras poseía las mejores características en cuanto a cada una de las variables analizadas.

En la fig. 34, se ilustra el diagrama de correlación para el análisis de componentes principales de las variables contenido total de fenoles, contenido de flavonoides y la evaluación de la capacidad antioxidante por el método de decoloración del radical DPPH. En este caso, se agruparon las muestras en 5 grupos específicos, el grupo 1 contiene las interrelaciones de las muestras de *C. bogotanus* (CB₇ y CB₉) las cuales corresponden a plantas con un contenido polifenólico cercano a los 100 mgEAG/gEx y que fueron agrupadas en el grupo a según la prueba *Tukey*.

En el grupo 2 se agrupan 3 de las muestras de la especie *C. bogotanus* (CB₁, CB₄ y CB₁₀) comprendidas en los cuadrantes I y IV con valores cercanos entre -1 y 1 de los dos componentes. Se agruparon las muestras correspondientes a la zona Park Way en Bogotá, con similitudes en las variables de fenoles y flavonoides totales para el caso de la muestra CB₁ categorizada con las letras bc según la prueba *Tukey*. Para las muestras CB₄ y CB₁₀ presentan cercanías en cuanto al contenido de fenoles (entre 100 y 106 mgEAG/gEx) agrupadas con las letras ab y el contenido de flavonoides (entre 10 y 12 mgEQ/gEx) dentro del grupo a.

El grupo 3 se encuentra distribuido en el III cuadrante con valores cercanos al -2 en el primer componente y -1 en el segundo componente que corresponden a las muestras *C. funckianus* (CF₂ y CF₄) y *C. bogotanus* (CB₂ y CB₈) colectadas en diferentes puntos de ubicación. Las razones por las cuales se agruparon estas muestras en un mismo grupo se deben a que presentan una similaridad respecto a las variable de flavonoides y la capacidad antioxidante con un contenido entre 10 y 20 mgEQ/gEx y agrupadas dentro del grupo a según la prueba *Tukey*, mientras que presentan una capacidad antioxidante cercana a un IC₅₀ de 15.0.

Finalmente el grupo que presenta una mayor correlación entre los datos obtenidos fue el V con una agrupación de 4 muestras en el II cuadrante, 3 de ellas correspondientes a las colectadas en el bosque de Villa Rita ubicado en el municipio de Fusagasugá (CF₁, CF₃ y CF₅) de la especie *C. funckianus* y la muestra CB₆ de la especie *C. bogotanus* que pertenece a la ciudad de Bogotá. Estas muestras se caracterizan por poseer un rango intermedio del contenido de flavonoides de todas las muestras evaluadas ya que estas se encuentran dentro del rango de los 38.5 ± 1.8340 mg EQ/g Ex y los 51.2 ± 0.26 mg EQ/g Ex, el IC₅₀ se caracterizó al igual por estar entre los contenidos intermedios y el contenido de fenoles totales de las 3 muestras de *C. funckianus* tuvieron valores promedio de 200 a 250 mg EQ/g Ex, valores medios encontrados posteriores a la medición representados en la fig. 15.

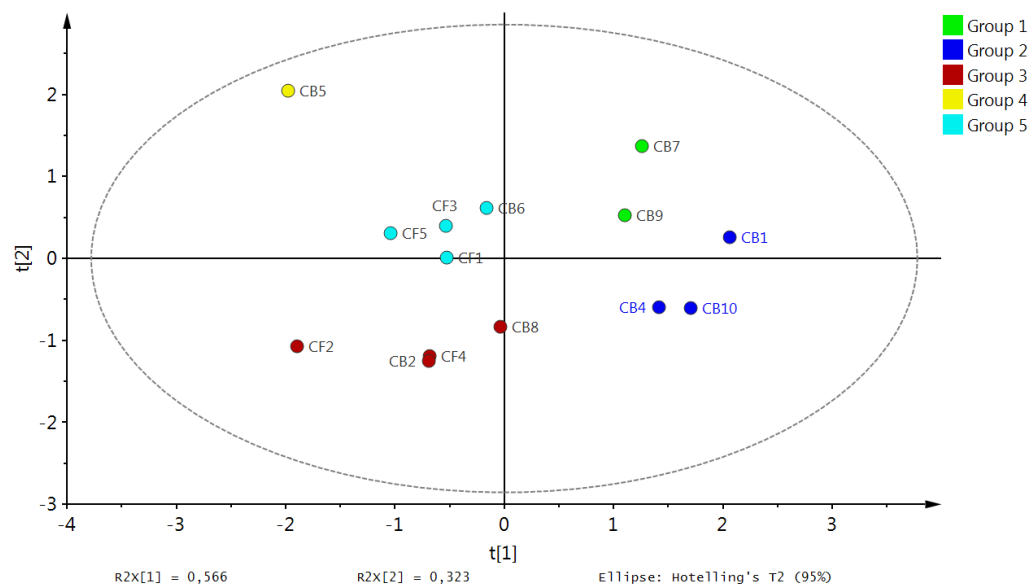


Fig. 34. Análisis de componentes principales del contenido total de Fenoles, Contenido de flavonoides y la actividad antioxidante por DPPH.

Separada se encuentra la muestra CB₅ que se encuentra en el eje positivo del segundo componente que aunque se encontró dentro del rango promedio alto de los datos hallados no mostró ningún grado de correlación con las demás muestras evaluadas.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.		
Grupo	Muestras	Descripción
1	CB ₇ , CB ₉	Plantas con un contenido polifenólico cercano a los 100 mgEAG/gEx y que fueron agrupadas en el grupo a según la prueba <i>Tukey</i> .
2	CB ₁ , CB ₄ , CB ₁₀	Similitudes en las variables de fenoles y flavonoides totales para el caso de la muestra CB ₁ categorizada con las letras bc según la prueba <i>Tukey</i> . Para las muestras CB ₄ y CB ₁₀ presentan cercanías en cuanto al contenido de fenoles (entre 100 y 106 mgEAG/gEx) agrupadas con las letras ab y el contenido de flavonoides (entre 10 y 12 mgEQ/gEx) dentro del grupo a.
3	CF ₂ , CF ₄ , CB ₂ , CB ₈	Similaridad respecto a las variable de flavonoides y la capacidad antioxidante con un contenido entre 10 y 20 mgEQ/gEx y agrupadas dentro del grupo a según la prueba <i>Tukey</i> , mientras que presentan una capacidad antioxidante cercana a un IC ₅₀ de 15.0.
4	CB ₅	Poseen un rango intermedio del contenido de flavonoides de todas las muestras evaluadas ya que estas se encuentran dentro del rango de los 38.5±1.8340 mg EQ/g Ex y los 51.2±0.26 mg EQ/g Ex.
5	CF ₁ , CF ₃ . CF ₅ , CB ₆	No mostró ningún grado de correlación con las demás muestras evaluadas.

Tabla 10: Resultados del Análisis de Componentes Principales para las 14 muestras pertenecientes a las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus*.

7.7 Discusión de la unidad didáctica.

Teniendo en cuenta que la química se define como el área del conocimiento que estudia la composición de las sustancias y los cambios y transformaciones que sufren estas (Castillo; 2008. p. 35), esta disciplina además que posibilita conocer la estructura y organización de materiales de distinta naturaleza en términos moleculares se relacionan con las múltiples y diferentes áreas de la biología, que para nuestro estudio es fundamental conocer cómo se correlaciona con la diversidad florística.

Hoy se conoce con certeza que el área de estudios de la química permite abordar el análisis y la resolución de problemas en diferentes aspectos biológicos incluyendo

su aplicación a diferentes unidades sistémicas como las plantas, que definitivamente la pueden vincular con grandes aspectos del quehacer del maestro en el contexto educativo. En este orden de ideas, se puede afirmar que la fitoquímica entendida como un campo de conocimiento que estudia la composición química de las plantas, es un área interdisciplinaria del conocimiento de las ciencias biológicas, es un bloque de construcción del conocimiento, necesario para la formación integral que requiere el licenciado en biología, y así podrá desarrollarse en el manejo de los productos naturales derivados de las plantas en función de las interacciones que entretengan con el ambiente.

Durante el quehacer del maestro es importante que este sujeto social se piense la manera en cómo puede abordar con el estudiantado el conocimiento que posee, es por eso que una de las estrategias que posibilita esta red de comunicación es la elaboración de unidades didácticas en tanto que, este instrumento posibilita identificar las particularidades de los contextos educativos no importando el nivel de escolarización para abordar conceptos específicos desde la enseñanza de la biología tomando como punto de partida la fitoquímica. Es así, que el diseño y construcción de la UD concerniente a la enseñanza de la botánica abordando el área de la fitoquímica surgió a partir de la actual formación de licenciados en biología desde áreas como la química, además, del cuestionamiento de mejorar actitudes y propiciar habilidades conceptuales y procedimentales en los procesos de aprendizaje de la botánica. Finalmente, la de generar un acercamiento hacia las plantas como organismos fundamentales en los ecosistemas y que sus procesos responden a las condiciones ecológicas que les ha impuesto el ambiente durante millones de años de evolución.

En este sentido, con el diseño y realización de la UD "*Aproximación al estudio de la diversidad vegetal: una mirada a través de la fitoquímica*" partió desde el A.F.P, hasta la aplicación de técnicas convencionales para el conocimiento e identificación del contenido polifenólico y flavonoides presentes en las especies del género *Croton*, con el propósito de generar estrategias de enseñanza para la comprensión de la fitoquímica aplicado a estudiantes del PCLB.

Esta unidad es un instrumento que posibilita replantear los contenidos conceptuales de la química y la biología relacionándolos con la fitoquímica, ya que éstos presentan frecuentemente sin evidencias experimentales y de sus aplicaciones en la cotidianidad del estudiante, de igual manera, no se contempla el carácter humanístico de la química y sus implicaciones sociales. Es por esto, y teniendo en cuenta que la fitoquímica ha abierto un gran campo de estudio en análisis cualitativo y cuantitativo de los principios activos que poseen las plantas en todo su cormo desde la década de los 80, se pretende estudiar los metabolitos secundarios presentes en hojas de las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus*.

Una particularidad que presenta la UD es su relación con la enseñanza de las plantas a través del desarrollo de prácticas de laboratorio. Las actividades de

laboratorio que se presentan en la UD se enfatizan en el aprendizaje práctico y el desarrollo de destrezas procedimentales y conceptuales propias para el desarrollo de un pensamiento crítico que son esenciales para mejorar la formación de futuros profesores de ciencias. El método de aprendizaje de la fitoquímica desde las prácticas de laboratorio tendrá la condición de posibilidad de hacer que las prácticas propias de cada tema sean más representativas y acerquen al maestro hacer parte del desarrollo de investigaciones disciplinares en el estudio de las plantas, por otro lado, lograr que el maestro se piense como científico (Martínez; 2014).

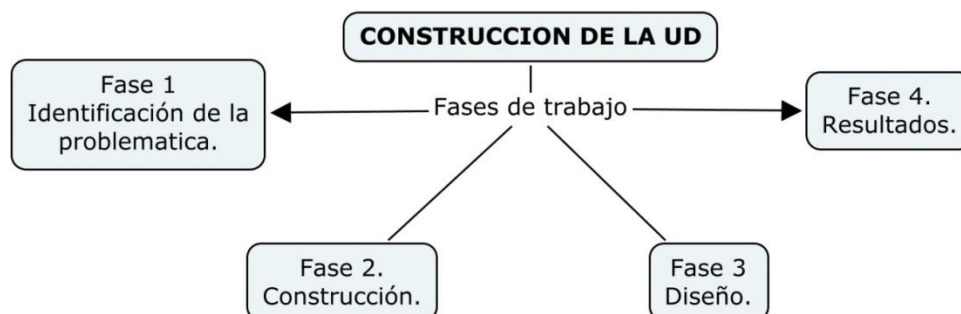


Fig.35 Fases de elaboración de la Unidad didáctica.

La fig. 35 muestra de manera esquemática las fases de elaboración de la unidad didáctica *Un acercamiento a la diversidad vegetal: una mirada desde la fitoquímica* es el resultado de la fase de identificación de la problemática en el cual se realizaron diferentes revisiones bibliográficas y de las diferentes adaptaciones que se le realizaron a los protocolos empleados en el estudio fitoquímico de los extractos etanólicos de *C. funckianus* y *C. bogotanus*.

La UD, consta de contenidos los cuales responden a los intereses al qué enseñar, desde lo conceptual y procedimental, que tienen como fin desarrollar las capacidades las cuales se organizan de acuerdo al nivel de complejidad del tema a enseñar y los intereses para los que la empleen. Por consiguiente, para el diseño de la UD se propusieron los siguientes tópicos.

7.7.1 Fase 1. Identificación de la problemática.

Este trabajo se originó debido a la preocupación existente respecto a la comprensión científica de los procesos de construcción del conocimiento químico-biológico, más específicamente en relación con la ausencia en la enseñanza y el aprendizaje de aspectos metabólicos secundarios que emergen de las plantas y la necesidad de generar nuevas ideas y estrategias pedagógicas orientadas hacia la enseñanza de la botánica problematizándola a partir de la fitoquímica en el contexto del departamento de la biología de la Universidad Pedagógica Nacional o su aplicabilidad en la educación básica media o secundaria.

A propósito de esta situación, en este trabajo se propuso el diseño de una UD que posibilite generar estrategias para el abordaje en el aula de clase y en el laboratorio la complejidad química que poseen las plantas, en este orden de ideas, se pretendió abordar desde el ámbito de la didáctica de las ciencias, herramientas útiles y eficaces que permitan estructurar más eficazmente algunas situaciones del aprendizaje de la biología, es especial de conceptos asociados a la fitoquímica. Es importante mencionar que las ciencias biológicas y químicas son conocimientos que algunas veces son complicados de entender para los estudiantes, se presenta de una manera abstracta, rica en modelos y con un lenguaje completamente diferente, para esto, algunos autores recomiendan ir muy despacio en los niveles de enseñanza, acudir a la repetición de conceptos, hacer experimentos, plantear problemas con diversos enfoques y ser recursivo con ejercicios que le sirvan a los estudiantes para repasar, afianzar y entender conocimientos (Rentería; 2013).

7.7.2 Fase 2. Construcción de la Unidad Didáctica.

La unidad didáctica es el medio por el cual se posibilita una mejora de la calidad del quehacer del maestro en el aula, sin embargo, en ningún momento se puede subestimar la responsabilidad que tiene este sujeto como orientador del proceso de enseñanza y aprendizaje. Para cumplir con los objetivos planteados en la UD se necesita que los estudiantes reciban la adecuada orientación, además de garantizar resultados satisfactorios a lo largo de su aplicación posterior, ya que la principal característica de la unidad es la de dar instrucción basada en la indagación. En consecuencia con lo anterior, se considera que una de las mejores maneras para que el estudiante aprenda lo referente a la fitoquímica es que el mismo maestro se integre como un agente activo y no actúe como el experto del tema.

Como se mencionó en la metodología, la UD está enmarcada bajo unos objetivos de enseñanza los cuales son los siguientes:

- Usar ciertos tipos de disolventes con propiedades químicas para aislar compuestos orgánicos a partir de productos naturales.
- Clasificar estructuras químicas de los diferentes compuestos de origen vegetal con alguna actividad biológica.
- Describir algunos metabolitos secundarios de importancia medicinal distribuidos en la naturaleza.
- Indagar y analizar métodos de identificación de principios activos de algunas especies vegetales.

- En general, determinar las propiedades físicas y químicas de algunos principios activos que se obtengan en el laboratorio, con el respaldo de tablas y literatura citada en cada unidad. Será de especial importancia sustancias como los, flavonoides, taninos, terpenos y algunos otros que son compuestos representativos a lo largo de la unidad didáctica.

Cada uno de estos objetivos se encuentra acompañado por una serie de prácticas de laboratorio que son ilustrativas para el estudiantado. La propuesta de trabajos prácticos de laboratorio cuenta con su respectiva explicación detallada, los ejercicios o tareas a realizar durante las diferentes sesiones que ocupe el abordaje de la unidad, a través de los cuales se alcanzarán los propósitos definidos.

En el siguiente apartado, se explicita el conjunto de actividades que integran cada uno de los dos módulos de la unidad didáctica, es necesario señalar que los propósitos específicos para cada una de los módulos son totalmente diferentes respondiendo a las necesidades y a las particularidades del proceso de enseñanza y aprendizaje de la botánica y la fitoquímica.

7.7.3 Fase 3. Diseño de la Unidad Didáctica.

En este apartado se abordará los contenidos conceptuales de cada módulo que constituye el diseño de la UD para la enseñanza de la fitoquímica a estudiantes de del PCLB de la Universidad Pedagógica Nacional o su aplicabilidad en el escenario de la educación media (Secundaria).

7.7.3.1 Unidad 1. Constituyentes secundarios de las plantas.

En esta sección se pretendió abordar la importancia de las plantas para la especie humana, sin embargo, aunque se menciona el proceso fundamental de la fotosíntesis como un elemento clave para el mantenimiento del planeta Tierra, se hace un abordaje inicial al tema de metabolitos secundarios puesto que, es el tema en el que se centrará la unidad didáctica, se menciona el tema desde las esferas biológicas y como elementos constituyentes para la búsqueda de principios activos de carácter farmacológico. Por otro lado, se aborda el tema de la taxonomía química, ya que en la actualidad existen otras maneras de clasificar a los organismos independientemente de sus caracteres morfológicos, anatómicos o genéticos, que para el caso de las plantas, empieza a establecerse una clasificación basada en los componentes químicos presentes y recibe el nombre de quimiotaxonomía, además, de hacer mención de la taxonomía molecular la cual se basa en los constituyentes secundarios generalmente los que tienen bajo peso molecular.

Desde el modelo constructivista, se parte desde las ideas previas basado en un test de entrada como un elemento referencial para indicar el nivel que poseen los sujetos involucrados en elementos conceptuales fundamentales para el entendimiento de la fitoquímica como lo son la química orgánica (desde el manejo de grupos funcionales y nomenclatura) y la bioquímica (con las rutas de biosíntesis e identificación de rutas metabólicas que emergen de los sistemas vivientes). El trabajo práctico de laboratorio consiste en el estudio fitoquímico preliminar de la especie *C. funckianus* con el fin, no solo de confirmar los resultados emergentes de la parte disciplinar del presente trabajo de investigación, sino también, la de aproximar al estudiantado al estudio químico de las plantas desde el manejo de equipos y reactivos pertinentes para el desarrollo de las marchas fitoquímicas, posibilitando en ellos la adquisición de destrezas científicas a partir desde el saber, el saber hacer y el saber valorar, el trabajo en equipo sin dejar de lado, la búsqueda de referencias bibliográficas que son elementos pertinentes para el desenvolvimiento eficaz del tema abordado trayendo consigo el debate y apropiación de conocimientos.

7.7.3.2 Unidad 2. Flavonoides y compuestos afines.

Cabe señalar que en la unidad didáctica, se parte también desde los flavonoides y los compuestos fenólicos ya que es uno de los grupos con más interacciones biológicas que se ven en las plantas. Al igual que en la unidad anterior, se parte desde un test de ideas previas para saber que conocimientos tienen los estudiantes acerca de estos compuestos que poseen infinidad de relaciones con la planta y el medio en el que habitan, además de ser los primeros señaladores de estos organismos cuando se ven enfrentados ante la presencia de un agente estresante y que por ende altera su funcionamiento celular, molecular y bioquímico (Melgarejo; 2012).

Se diseña un contenido de la unidad a partir de una síntesis conceptual explicitando que son los flavonoides, sus propiedades químicas y estructurales, además de los principales grupos presentes en este metabolito secundario. La actividad de laboratorio se encuentra enfocada desde la determinación cualitativa y cuantitativa del contenido de flavonoides y fenoles presentes en los extractos etanólicos que los estudiantes que apliquen la UD tendrán la posibilidad de hacer.

La unidad 2 correspondiente a los flavonoides tiene la particularidad de responder a un modelo interdisciplinar de las ciencias ya que en ella, se encuentra elementos tanto explícitos como implícitos acerca del aprendizaje de las ciencias naturales tomando como ejes fundamentales conocimientos biológicos, químicos y estadísticos. Como lo planteo San Martín; 2002, se pretendió hacer uso de la modelización del uso de fenómenos, este planteamiento considera la enseñanza como el conjunto de acciones que promueve el profesorado para fortalecer el

proceso de modelización que realizan los estudiantes con la finalidad de dar sentido a los hechos del mundo, un sentido que ha de tender a ser coherente con el conocimiento científico actual.

La enseñanza y aprendizaje por investigación trata de unir las situaciones de enseñanza y aprendizaje con el modo como se construye el conocimiento científico, que tiene exigencias metodológicas y epistemológicas a las que es preciso prestar atención. Una de ellas fue la revisión, reorientación y diseño de las prácticas de laboratorio para que dejen de ser una mera ilustración de los conocimientos transmitidos y pasen a constituir situaciones semejantes a las actividades de formación profesional. Las prácticas de laboratorio que se plantean a lo largo de la unidad didáctica como lo menciona Carriazo *et al*; 2005, siguen siendo útiles y necesarias, sin embargo debe hacerse uso racional y estratégico de estas. Para ello debe tenerse claro para que se realizan, cual es la finalidad de su realización, además de un conocimiento profundo sobre los fenómenos en estudio que permita orientar las actividades de aprendizaje de los estudiantes.

Finalmente, a partir del proceso del diseño de la UD se concluye que es importante la perspectiva sistémica, en la que cada relación intrínseca y extrínseca que se establece entre los organismos vegetales con su medio biótico y abiótico, es fundamental para mantener la emergencia del fenómeno de lo vivo. Por ende, el reconocimiento de lo humano y del ser humano se aparta de la concepción antropocéntrica, la cual afirma de que el hombre es el centro del universo y por ende, todo debe confluir en él. En consecuencia, desde la postura de los autores citados y referenciados para esta reflexión pedagógica en torno a la construcción de herramientas didácticas, es la de reconocernos como seres vivos sistémicos, por otro lado, el quehacer del maestro desde sus prácticas educativas y personales son elementos que atraviesan su cuerpo los cuales posibilitan el reconocimiento, respeto y diálogo con la diversidad biológica y las demás comunidades académicas enfocadas desde la investigación disciplinar en ciencias y la investigación en enseñanza de las ciencia.

El presente trabajo permite evidenciar que para la estructuración de materiales educativos es necesario realizar un estudio riguroso y sistemático de tópicos de interés socio-científico, con el propósito de darle validez a los materiales educativos que se usan en la enseñanza de las ciencias biológicas y en particular para la enseñanza de la temática de interés.

8. CONCLUSIONES.

- ✓ El análisis fitoquímico preliminar permitió demostrar la presencia de metabolitos secundarios tipo alcaloide y flavonoide principalmente.
- ✓ La prueba con el reactivo de Folin-Ciocalteu en presencia de Na_2CO_3 reveló que los 14 extractos etanólicos derivados de las muestras de *Croton* poseen contenido polifenólico debido a la presencia de compuestos aromáticos que poseen un grupo hidroxilo $-\text{OH}$ unidos a un anillo aromático en su estructura; los cuales fueron detectados a 765 nm.
- ✓ Por otro lado la reacción con FeCl_3 en presencia de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ de igual manera, permitió comprobar la presencia de flavonoides en los 14 extractos etanólicos debido a la formación de cromóforos basados en el complejo flavonoide-aluminio, orto-dihidroxilados de color amarillo detectados a una longitud de onda de 420 nm.
- ✓ El método de decoloración del radical DPPH demostró que las 14 muestras poseen capacidad antioxidante detectado por el uso de la técnica espectrofotométrica además se su cuantificación mediante el cálculo del IC_{50} sin embargo, cabe resaltar que las presentaron una mejor capacidad fueron las muestras CF_2 , CF_5 y CB_8 .
- ✓ El análisis de varianza ANOVA y la prueba *Tukey* con un $p > 0.05$ demostró que todas las muestras poseen diferencias estadísticas significativas y por ende se clasificaron en grupos diferentes respectivamente no importando si pertenecían a una misma especie o si fueron recolectadas en la misma ubicación.
- ✓ El análisis por CLAE-DAD reveló que los 14 extractos etanólicos sometidos a evaluación presentaron un mismo comportamiento en el cromatograma además de, evidenciar un pico mayoritario cercano a los 11 minutos de corrida que es altamente probable que corresponda a un determinado compuesto de tipo flavonoide.
- ✓ La elaboración de la UD permitió el ejercicio de identificar particularidades de la enseñanza de la biología, por otro lado, deja abierta la posibilidad a la crítica constructiva que propenda por el mejoramiento del que hacer del maestro, de igual manera el desarrollo de la propuesta busca generar un pensamiento crítico, científico, constructivo y reflexivo en los estudiantes que la apliquen, y así estimular la sistematización de experiencias de aula que sirva de sustento a discusiones en redes y en comunidades pedagógicas que fortalezcan la enseñanza aprendizaje de las ciencias.

9. RECOMENDACIONES.

- ✓ Aplicar la unidad didáctica maestros en formación de licenciatura en biología de la Universidad Pedagógica Nacional, con el fin de dar una validez más concluyente, además de, revisar aspectos a mejorar en el proceso y elaboración de unidades didácticas enfocadas hacia la enseñanza de las ciencias naturales.
- ✓ Realizar un estudio ecofisiológico de las plantas de *Croton bogotanus* presentes en la ciudad de Bogotá para analizar el impacto que tiene los fitoplasmas en el desequilibrio de los componentes fisiológicos de la planta.
- ✓ Realizar la identificación de compuestos tipo flavonoide por CLAE-EM de los extractos obtenidos.

10. PERSPECTIVA.

A partir del estudio y discusiones presentados en esta tesis de pregrado, las perspectivas de trabajos a futuro se orientan en dos direcciones.

En un primer plano, estarían los trabajos a confirmar los aspectos de caracterización química mostrados. En concreto, se podría terminar de hacer el respectivo análisis fitoquímico preliminar no solo para los metabolitos restantes presentes en hojas, sino también, caracterizar el tallo, raíz, frutos de las especies *C. funckianus* y *C. bogotanus* con el fin de confirmar y divulgar la riqueza y abundancia de metabolitos que biosintetiza derivados de su metabolismo primario.

También sería interesante realizar pruebas de validación para los contenidos de polifenoles y flavonoides totales presentes en las especies evaluadas, además de, poner en práctica otros métodos que posibiliten la evaluación de la capacidad antioxidante como por ejemplo ABTS o FRAP con el objeto de realizar puntos de comparación.

Desde el ámbito educativo sería relevante seguir elaborando material educativo con énfasis en la enseñanza y aprendizaje de la botánica tomando como eje de partida la didáctica de las ciencias ya que le posibilita al estudiante tener una perspectiva más sistémica de lo que implica el estudio de la diversidad vegetal desde los componentes biológico, químico y estadístico. Por otro lado, la unidad didáctica posibilita la conexión con el currículo, tiene por objeto facilitar al maestro/a la ordenación y planificación de su acción docente, mediante la consulta al Currículo. Pretende seleccionar y estructurar aquellos objetivos y contenidos que están conectados con la unidad didáctica que se pretende desarrollar.

11. BIBLIOGRAFIA.

- Aguilera, Z., Segura, E., Trujillo, L. 2013. La defensa biológica presente en los procesos de formación de participación en el aula. Revista Bio-grafía, escritos sobre la biología y su enseñanza. Edición extraordinaria, 974 – 985.
- Amaral, A., Barnes, R. 1998. A tetrahibroberberine alcaloid from *Croton hemiargyreus*. Revista Phytochemistry. 47 (7); 1445 – 1447.
- Apel, K., H, Hirt. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. Revista Plant Biology. (55): 373-399.
- Barba, J. Introducción al análisis de los productos vegetales (1ª ed.). (1993). Universidad Metropolitana de México. México D.F.
- Bautista, F., Cárdenas, J., Castiblanco, A. 2011 Caracterización de las diferentes maneras de concebir la experimentación en el aula entre profesores de sexto y séptimo grado del Instituto Pedagógico Nacional (Usaquén - Bogotá). Revista Bio-grafía: escritos sobre la biología y su enseñanza. 4 (7): 1-15.
- Berkoff, N., Focus on Flavonoids [online]. Visitado en Agosto de 2014). Disponible en <http://www.healthwell.com/hnbreakthroughs/sep98/flavonoids.cfm?path=hw>
- Bilbao, M. 1997. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad del Quindío, Armenia. Colombia.
- Bors, W., Seller, W., Michael, C., Saran, M. 1999. Flavonoids as antioxidants determination of radical scavenging efficiencies. Revista Method Enzymol. 186 (2): 343-355.
- Boyer, J., Liu, Rh,. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. Nutrition Journal. 3 (5): 1– 15.
- Brand – Williams W., Cuvelier, M., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Revista Lebesm, Wiss. (22): 25 – 30.
- Bulla, M., Castellón, W., Guzmán, A. (2012) Fitoquímica de cinco especies del genero *Baccharis* endémicas del altiplano Cundiboyacense. Facultad de Ciencias y Educación, Departamento de Química. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá. Colombia.
- Cabrera, Y.A. 2006. Efecto de *Phytophthora capsici* sobre el metabolismo del glutatión en suspensiones celulares de chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.

- Camilloni, A. 2007. El saber didáctico. Editorial Paidós. Buenos Aires, Argentina. Págs: 23-38.
- Campos, A., Vargas, L. 2008. Diseño de una unidad didáctica con énfasis en metabolitos secundarios determinados cualitativamente, alcaloides y flavonoides de la especie *Ficus andicola*. Tesis para optar el título de Licenciadas en Química. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Pedagógica Nacional. Bogotá.
- Carriazo, J., Saavedra, M. 2004. La didáctica de la química. Una disciplina emergente. Revista Tecno, Episteme y Didaxis. 15 (1): 73-84.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., Rueda, D. 2009 Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana*). Revista Colombia Forestal. Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. (12) 161- 70.
- Castillo, H. 2008. Aprendizaje de conceptos químicos desde el análisis fitoquímico del Madroño aplicando enseñanza para la comprensión. Tev. IIEC. 2 (3): 35-40.
- Chiappe, A. 2013. Estudio fitoquímico de las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus* (Euphorbiaceae). Trabajo de grado para optar el título de Magister en Ciencias – Química. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Croizant, L. 1943. Euphorbiaceae cactaceaeque novae vel criticae colombianae I. Revista Caldasia. 2 (7): 123 – 135.
- Croizant, L. 1944. Euphorbiaceae cactaceaeque novae vel criticae colombianae III. Caldasia. 6 (2): 425 – 434.
- Croizant, L. 1940. Thirty-five new species of American *Croton*. Journal of the Arnold Arboretum. (21); 78 – 107.
- Cronquist, A. 1981. Lista de clases, subclases, órdenes y familias de las angiospermas de acuerdo con el sistema de clasificación de Cronquist. Universidad de Columbia. USA.
- Cruz. I., Elizande. L. 2004 El pensamiento del profesor. Repercusiones en la evaluación de la docencia. En: Sobre las prácticas docentes, modelos educativos y evaluación. Recuperado el día 09 de agosto de 2014. Tomado de: <http://www.azc.uam.mx/socialesyhumanidades/03/reportes/eco/lec/vlec019.pdf>

Cruz, A. 2003. Propuesta Didáctica: Usos de Estrategias de Aprendizaje Cooperativo Para la Enseñanza de la Biología en Estudiantes de Educación Media Superior de la Universidad Autónoma de Nuevo León. (U.A.N.L.). Tesis. México. Recuperado el 15 de Abril del 2013 de <http://eprints.uanl.mx/2395/1/1020149429.PDF>

Delaux, P., Nanda, A., Mathe, C., Sejalon-Delmas, N., Dunand, C. 2012. Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Revista Perspectives in plant ecology, evolution and systematic*. 14 (1): 49-59.

Díaz, F., Hernandez, G. 2002. Estrategias docentes para un aprendizaje significativo en una interpretación constructivista. Mc Graw-Hill. Ciudad de México. México.

Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación en fitoquímica. Departamento de química orgánica. Instituto Tecnológico y Estudios superiores de Monterrey. Limusa.

Favali, M.A., Musetti, R., Benvenuti, S., Bianchi, A. Y Pressacco, L. 2004. *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. *Revista Protoplasma* 223 (1): 45–51.

Fernández, J., Elortegui, N., Rodríguez, Y., Moreno, T. 1999 ¿Cómo hacer unidades didácticas innovadoras? Díada, España.

García, M., Quintero, R., López-Munguía A. 2000. Biotecnología alimentaria. Ed. Limusa, México. Pp. 493-494, 510.

Gülçin, Ý., Oktay, M., Kireççi, E., Küfreviođlu, Öý. 2003 Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. *Food Chemistry*. (83): 371 – 382

Hernández, G. 2008. Los constructivismos y sus implicaciones para la educación. *Universidad Nacional Autónoma de México*; (30) 122.

Jimoh, F., Adedapo, A., Afolayan, A. 2011. A comparison of the nutritive value, antioxidant and antibacterial activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. *Revista Nat. Prod.* 5(1): 29 – 42.

Krol, W., Sheller, S., Czuba, Z., Matsumo, T., Zydowiz, G., Shni, J. 1996. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *Revista Ethnopharmacol.* 55 (1): 19-25.

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Manzini-Filho, J., Fett, R. 2005 Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 25(4):726-732. En. Castañeda, C., Ramos, L., Ibañez, V. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Nuevo Horizonte.* 8 (1): 56 – 72.

Ladino, N. 2011. Documento base Línea de Investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica. Facultad de Ciencia y Tecnología. Departamento de Biología. Universidad Pedagógica Nacional. Documento Interno.

Low, P.S., J, Merida. 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plantarum* 93 (3): 533-542.

Martínez, B. 2014. Conceptos Claves, laboratorios de investigación y bases de datos: estrategias para la enseñanza de la bioquímica en el siglo XXI. *Revista Química viva.* 13 (1): 5-17.

Melgarejo, L.M. 2010. Experimentos en fisiología vegetal. Laboratorio de bioquímica y fisiología vegetal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Mendez, A., Molina, A., Aristizabal, S., Yamaguchi, L., Katto M., Muñoz, A. 2014. Análisis por HPLC/DAD/ESI/MS/TOF y estimación de las capacidades antioxidantes y citotóxicas de los extractos etanólicos de hojas de *Croton niveus* jacq., *Piper marginatum* jacq. e *Hyptis suaveolens* (L.) *Revista Productos Naturales.* 4 (1): 59.

Ministerio De Educación Nacional. Ley General de Educación 115 del 08 de febrero de 1994. Consultado en Abril de 2014. Tomado de: http://www.mineducacion.gov.co/1621/articles-85906_archivo_pdf.pdf

Miranda, C. 2003. Antioxidant activities of flavonoids(online). Department of Environmental and molecular toxicology Oregon State University. (Visitado en agosto, 201). Disponible en: <http://lpi.oregonstate.edu/fw00/flavonoid.html>.

Miranda M. 2007. El estrés oxidativo en plantas. Unidad de bioquímica y biológica Molecular en plantas. Centro de investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán México. Pp. 3-13.

Mosquera, C., Mora, P., García, M. 2012. Conceptos fundamentales de química y su relación con el desarrollo profesional del profesorado. Fondo de publicaciones de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá. Colombia.

Murillo, J. 1999. Composición y distribución del genero *Croton* (Euphorbiaceae) en Colombia con cuatro especies nuevas. *Revista Caldasia*. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. 21 (2): 141 – 166.

Murillo, J. 2000. Una nueva especie colombiana de *Croton*. *Mutisia*. (21); 64 - 66.

Ochoa, C., Ayala, A. 2004. Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad: Revista de Divulgación del desarrollo Científico y Tecnológico*. 6 (2): 93 – 104.

Perilla, L. 2013. Determinación de la capacidad de trasmisión de fitoplasmas en dos morfoespecies de la familia Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de Bogotá D.C. Tesis para optar el título de Maestría en Ciencias-Bioquímica. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia –Sede Bogotá-.

Pieters, L. 1992. The biologically active compounds of sangre de drago. *Tradicional South American droug*, Universiteit Antwerpen. Departament Farmaceutische Wettenschappen.

Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of Berry anthocyanianins. *Disertación Académica*. Helsinki. Universidad de Helsinki. Departamento de Química Aplicada y Microbiología.

Rentería, M. 2013. Construcción de una unidad didáctica orientada a la enseñanza y aprendizaje del concepto enlace químico utilizando un grupo de moléculas de interés ambiental y validado con estudiantes del grado decimo de la Institución Educativa Mariscal Robledo de la ciudad de Medellín. Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Magister en Enseñanza de las Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Colombia- Sede Medellín.

Risco, E., Vila, R., Henriquesa, A., Cañigueral, S. 2005. Bases bioquímicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de drago. *Revista Fitoterapia*. 5 (2): 101 – 114.

Riveros, A., Gomez, D. 2007. Análisis fitoquímico del *Niphogeton ternata*, como mecanismo de aprendizaje de conceptos de las ciencias naturales. *Revista Scientia et Technica*. 13. (33) 419-421.

Rizner, A., Hadolin, M., Knez, Z., Baumann, D. 2000. Comparisons of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Revista Food Chemistry*. 71 (2): 229-333.

Sanabria, A. 1983. Notas sobre el análisis fitoquímico preliminar de plantas para el laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

San Martí, N. 2002. Didáctica de las ciencias en la educación secundaria obligatoria. Madrid: Síntesis Educación.

Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mex. De Fitopatología. 21 (3) 335-363.

Shenoy, C., Kumar, K., Patil, S., Patil, M. 2009. Preliminary phytochemical investigation and wound healing activity of *Allium cepa* linn (Liliaceae). International journal of pharmaceutical sciences. 2 (2): 167 – 175.

Shimadzu. 2013. Analisis of flavonoids in *Gingko biloba*. Application News in Hight Performance Liquid Chromatography. No. L405. Recuperado el día 20 de septiembre de 2014. Tomado de: <http://www2.shimadzu.com/applications/LC/L405.pdf>

Sierra, C. 2011. Reflexiones en torno al proyecto de semestre eje curricular: Interacción. Facultad de Ciencia y Tecnología, Departamento de Biología. Universidad Pedagógica Nacional. Documento Interno.

Torel, J., Cillard, J., Cillard, P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry. 25 (2): 383-385.

Universidad Pedagógica Nacional. 2010. Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología. Documento interno.

Universidad Pedagógica Nacional. 2010. Proyecto Político Pedagógico. (3); 3-15.

Valencia, C. 1995. Fundamentos de fitoquímica. Universidad Autónoma Nacional de México. México D.F.

Vegas, S., Moreno, B., Quevedo, R. 2011. Cassipourol: Un diterpenoide monocíclico con actividad larvica en *Croton funckianus*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y Aromáticas. 10(3): 228 – 232.

Vegas, S. 2010. Estudio químico de los compuestos bioactivos de las hojas senescentes de la especie *Croton funckianus*. Tesis para optar el título de Magister en Ciencias – Química. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.

Velásquez, Y. 2013. Evaluación del contenido de antocianinas y polifenóles y actividad antioxidante de extractos obtenidos de granos de algunas variedades de maíz colorado (*Zea mays*) de la región Cundiboyacense. Trabajo de grado para optar el título de Licenciada en Química. Facultad de Ciencias y Educación. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá D.C.

Vinson, J., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J. 2005. Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *J Am Coll Nutr.* 24 (1): pp. 44–50.

Webster, G. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon.* (42): 793 – 823.

12. ANEXOS.

Anexo 1. Análisis de la capacidad antioxidante.

CROTON FUNCKIANUS CF1 JULIO								
Ao	1.025							
Muestra 1	2.52	mg/mL	2520	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.3	0.79934055	32.5853659	30.4390244	24.5853659	0.691	0.713	0.773
15	18.9	1.2764618	57.5609756	63.6097561	60.3902439	0.435	0.373	0.406
25	31.5	1.49831055	68.5853659	73.5609756	67.902439	0.322	0.271	0.329
35	44.1	1.64443859	80.7804878	79.7073171	79.2195122	0.197	0.208	0.213
50	63	1.79934055	83.5121951	83.5121951	99.902439	0.169	0.169	0.001

CROTON FUNCKIANUS CF2 JULIO								
Ao	1.061							
Muestra 1	2.51	mg/mL	2510	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.275	0.79761373	25.730443	30.2544769	32.2337418	0.788	0.74	0.719
15	18.825	1.27473498	71.9132893	67.2950047	80.3016023	0.298	0.347	0.209
25	31.375	1.49658373	76.2488219	84.260132	86.0508954	0.252	0.167	0.148
35	43.925	1.64271177	87.3704053	88.8784166	86.6163996	0.134	0.118	0.142
50	62.75	1.79761373	87.464656	84.5428841	90.4806786	0.133	0.164	0.101

CROTON FUNCKIANUS CF3 JULIO								
Ao	1.061							
Muestra 1	2.6	mg/mL	2600	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.5	0.81291336	5.65504241	10.6503299	15.4571159	1.001	0.948	0.897
15	19.5	1.29003461	30.4429783	28.934967	33.6475024	0.738	0.754	0.704
25	32.5	1.51188336	48.539114	42.6013195	47.596607	0.546	0.609	0.556
35	45.5	1.6580114	55.3251649	63.336475	65.6927427	0.474	0.389	0.364

50	65	1.81291336	79.736098	81.2441093	81.33836	0.215	0.199	0.198
----	----	------------	-----------	------------	----------	-------	-------	-------

CROTON FUNCKIANUS CF4 JULIO								
Ao	1.025							
Muestra 1	2.5	mg/mL	2500	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.25	0.79588002	33.3658537	25.5609756	27.5121951	0.683	0.763	0.743
15	18.75	1.27300127	53.9512195	59.6097561	62.9268293	0.472	0.414	0.38
25	31.25	1.49485002	68.4878049	68.8780488	69.5609756	0.323	0.319	0.312
35	43.75	1.64097806	69.7560976	72	73.4634146	0.31	0.287	0.272
50	62.5	1.79588002	82.7317073	83.5121951	89.4634146	0.177	0.169	0.108

CROTON FUNCKIANUS CF5 JULIO								
Ao	1.025							
Muestra 1	2.55	mg/mL	2550	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.375	0.80448019	34.7317073	34.9268293	34.7317073	0.669	0.667	0.669
15	19.125	1.28160144	69.6585366	74.1463415	73.0731707	0.311	0.265	0.276
25	31.875	1.50345019	81.8536585	74.0487805	80.4878049	0.186	0.266	0.2
35	44.625	1.64957823	86.9268293	88	85.6585366	0.134	0.123	0.147
50	63.75	1.80448019	88.6829268	91.3170732	99.4146341	0.116	0.089	0.006

CROTON BOGOTANUS CB1 JULIO								
Ao	1.061							
Muestra 1	2.51	mg/mL	2510	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.275	0.79761373	8.38831291	6.40904807	8.95381715	0.972	0.993	0.966

15	18.825	1.27473498	22.4316682	21.866164	18.9443921	0.823	0.829	0.86
25	31.375	1.49658373	28.4637135	24.6936852	28.8407163	0.759	0.799	0.755
35	43.925	1.64271177	34.401508	31.0084826	29.1234684	0.696	0.732	0.752
50	62.75	1.79761373	38.5485391	33.8360038	37.606032	0.652	0.702	0.662

CROTON BOGOTANUS (CB2) JULIO								
Ao	1.061							
Muestra 1	2.59	mg/mL	2590	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log []	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.475	0.81123977	16.399623	15.1743638	12.3468426	0.887	0.9	0.93
15	19.425	1.28836103	29.0292177	27.8982092	33.1762488	0.753	0.765	0.709
25	32.375	1.51020978	47.596607	57.1159284	53.8171536	0.556	0.455	0.49
35	45.325	1.65633781	70.0282752	63.2422243	66.4467484	0.318	0.39	0.356
50	64.75	1.81123977	80.6786051	80.6786051	82.6578699	0.205	0.205	0.184

CROTON BOGOTANUS CB4 JULIO								
Ao	1.061							
Muestra 1	2.58	mg/mL	2580	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log []	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.45	0.80955971	4.61828464	11.1215834	9.14231857	1.012	0.943	0.964
15	19.35	1.28668097	26.0131951	24.5994345	28.7464656	0.785	0.8	0.756
25	32.25	1.50852972	34.4957587	33.1762488	30.2544769	0.695	0.709	0.74
35	45.15	1.65465775	39.9622997	42.0358153	35.9095193	0.637	0.615	0.68
50	64.5	1.80955971	46.3713478	49.2931197	48.4448633	0.569	0.538	0.547

CROTON BOGOTANUS CB5 JULIO								
Ao	1.025							
Muestra 1	2.51	mg/mL	2510	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log []	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.275	0.79761373	48.195122	41.5609756	52.4878049	0.531	0.599	0.487
15	18.825	1.27473498	89.5609756	90.1463415	82.4390244	0.107	0.101	0.18
25	31.375	1.49658373	90.4390244	86.7317073	84.3902439	0.098	0.136	0.16

35	43.925	1.64271177	90.0487805	47.5121951	88.7804878	0.102	0.538	0.115
50	62.75	1.79761373	84.3902439	90.0487805	90.2439024	0.16	0.102	0.1

CROTON BOGOTANUS CB6 JULIO								
Ao	1.02							
Muestra 1	2.59	mg/mL	2590	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.475	0.81123977	25.6862745	27.745098	27.1568627	0.758	0.737	0.743
15	19.425	1.28836103	43.7254902	46.372549	46.6666667	0.574	0.547	0.544
25	32.375	1.51020978	53.5294118	61.9607843	59.8039216	0.474	0.388	0.41
35	45.325	1.65633781	75.0980392	75.6862745	73.2352941	0.254	0.248	0.273
50	64.75	1.81123977	80	79.6078431	83.9215686	0.204	0.208	0.164

CROTON BOGOTANUS CB7 JULIO								
Ao	1.02							
Muestra 1	2.58	mg/mL	2580	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.45	0.80955971	10.2941176	12.1568627	8.7254902	0.915	0.896	0.931
15	19.35	1.28668097	17.9411765	19.1176471	18.4313725	0.837	0.825	0.832
25	32.25	1.50852972	24.8039216	28.3333333	29.0196078	0.767	0.731	0.724
35	45.15	1.65465775	33.5294118	35.2941176	35.5882353	0.678	0.66	0.657
50	64.5	1.80955971	45.5882353	45.1960784	44.2156863	0.555	0.559	0.569


CROTON BOGOTANUS CB8 JULIO								
Ao	1.025							
Muestra 1	2.56	mg/mL	2560	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.4	0.80617997	47.902439	27.5121951	49.7560976	0.534	0.743	0.515
15	19.2	1.28330123	77.0731707	80.195122	84.6829268	0.235	0.203	0.157
25	32	1.50514998	84.097561	84.097561	79.6097561	0.163	0.163	0.209
35	44.8	1.65127801	79.1219512	81.2682927	85.8536585	0.214	0.192	0.145

50	64	1.80617997	82.9268293	81.2682927	88.9756098	0.175	0.192	0.113
----	----	------------	------------	------------	------------	-------	-------	-------


CROTON BOGOTANUS CB9 JULIO								
Ao	1.02							
Muestra 1	2.5	mg/mL	2500	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.25	0.79588002	20.1960784	21.9607843	22.4509804	0.814	0.796	0.791
15	18.75	1.27300127	28.7254902	24.3137255	30.9803922	0.727	0.772	0.704
25	31.25	1.49485002	38.0392157	36.1764706	38.3333333	0.632	0.651	0.629
35	43.75	1.64097806	43.3333333	43.9215686	47.8431373	0.578	0.572	0.532
50	62.5	1.79588002	54.7058824	54.5098039	49.8039216	0.462	0.464	0.512

CROTON BOGOTANUS CB10 JULIO								
Ao	1.061							
Muestra 1	2.51	mg/mL	2510	µg/mL				
V(µL)	[] µg/mL	Log[]	% inhibicion	% inhibicion	% inhibicion	A1	A2	A3
5	6.275	0.79761373	0.28275212	2.82752121	8.29406221	1.058	1.031	0.973
15	18.825	1.27473498	16.9651272	11.5928369	20.6409048	0.881	0.938	0.842
25	31.375	1.49658373	24.5994345	25.4476909	24.2224317	0.8	0.791	0.804
35	43.925	1.64271177	23.2799246	31.3854854	32.3279925	0.814	0.728	0.718
50	62.75	1.79761373	42.0358153	42.0358153	40.9990575	0.615	0.615	0.626


Anexo 2: Poster Propiedades químicas de los flavonoides y su posible uso alternativo como bioplaguicidas: Revisión bibliográfica. Congreso Colombiano de Química Agrícola.



UNIVERSIDAD MILITAR
NUEVA GRANADA



1^{er} Simposio Colombiano
de Química Agrícola 2014
4th Colombian Symposium of Agricultural Chemistry
"Futuro y Enfoques Actuales"
Información: <http://www.1saq2014.unimilitar.edu.co>
e-mail: saq2014@unimilitar.edu.co



COLOMBIAN SYMPOSIUM ON
AGRICULTURAL CHEMISTRY
2014
UNIVERSITY APPROPRIATE
AND SUSTAINABLE
UMNG
April 27th - 29th, 2014

PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS FLAVONOIDES Y POSIBLE USO ALTERNATIVO COMO BIOPLAGUICIDAS: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Fabio Andrés CASTIBLANCO ROJAS¹, Carlos Andrés COY BARRERA.²

¹ Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Pedagógica Nacional, Bogotá, Colombia, AA 75144. dbf_fcastiblanco564@pedagogica.edu.co
² Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada., Bogotá, Colombia. AA 49300. carlos.coy@unimilitar.edu.co

INTRODUCCION

Teniendo en cuenta que los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal, diferentes estudios han revelado que su producción aparte de ser una respuesta fisiológica de la planta a las altas intensidades de luz ultravioleta, demuestran que también poseen propiedad anticancerígena (Martínez et al., 2002), anticancerígenas (Gil, Gómez & Trejo; 2008) y cardioprotectoras (Robards et al., 1998), sin embargo, no existen en la actualidad muchos estudios específicos y con cierto grado de profundidad que demuestren acciones de este tipo de compuestos químicos cuya posible utilización sea principalmente la de agentes insecticidas, que sean amigables con el ambiente y que busquen el mejoramiento continuo de la agricultura. En la presente, revisión se abordan diferentes investigaciones que se han llevado a cabo a partir de extractos vegetales como elementos potencializadores para el tratamiento de cultivos que se ven afectados por diferentes tipos de plagas a partir de una exhaustiva búsqueda de bibliografía que nos hable sobre el tema planteado anteriormente.

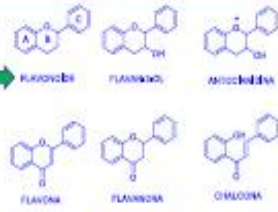
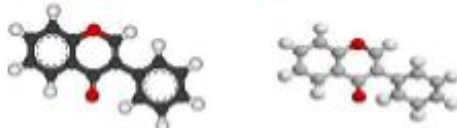


Fig. 1. Estructura química de las clases de flavonoides más usadas.


Polypodiaceae y Araceae; Apiceae. Como resultado se obtuvo que las especies *Plectidum aquilinum*, *Equisetum myriochaetum* y *Senecio selignus* mostraron porcentajes de mortalidad de 27, 25 y 10% respectivamente sobre las larvas del gusano de la col.

Ávila et al. 2014, determinaron la actividad insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) de los compuestos aislados de la parte aérea de *Piper septuplinervium* y las inflorescencias de *Piper subulmiforme* pertenecientes a la familia Piperaceae. Los resultados de este estudio evidencian que estas especies vegetales son principalmente compuestas de tipo flavonoide y polifenoles capaces de interrumpir procesos bioquímicos normales de la célula, produciendo la muerte de estas y por ende la muerte de las larvas de *S. frugiperda*.



RESULTADOS

Investigaciones desarrolladas dentro del contexto colombiano han sido reportadas en las bases de datos. Páez et al. (2007) realizaron bioensayos con los extractos etanólicos de las especies *Annona muricata*, *Mimosa americana*, *Melastomaceae*, *Ribes communis* sobre las ninfas y huevos de *R. prolixus* y *R. pallidus* (Hemiptera) vectores de la enfermedad de Chagas con el fin de determinar la toxicidad, repelencia y actividad ovicida. Como resultado se obtuvo que los extractos etanólicos obtenidos de los frutos de la especie *R. communis* presentó toxicidad sobre las dos especies animales tratadas debido a la presencia de metabolitos secundarios tipo ricitina y tricoálbinos ricitina los cuales presentan una toxicidad muy alta para humanos como para mamíferos e insectos.



Ramírez et al. 2001, con el fin de proteger los cultivos del repollo (*Brassica oleracea* Var Capitata) que son afectados por el gusano de la col (*Leptophlebia arisa*; Lepidoptera) evaluó los extractos de 15 plantas silvestres de la región del estado de Chiapas (México) pertenecientes a los géneros (*Equisetum*, *Equisetaceae*, *Sida*, *Lamiaceae*, *Tigelia*, *Senecio*, *Baccharis*, *Chrysanthemum*, *Pinappappus*, *Asclepiaceae*, *Verbena*, *Lantana*, *Verbenaceae*, *Plectidum*, *Polypodiaceae* y *Araceae*; Apiceae. Como resultado se obtuvo que las especies *Plectidum aquilinum*, *Equisetum myriochaetum* y *Senecio selignus* mostraron porcentajes de mortalidad de 27, 25 y 10% respectivamente sobre las larvas del gusano de la col.

CONCLUSIONES

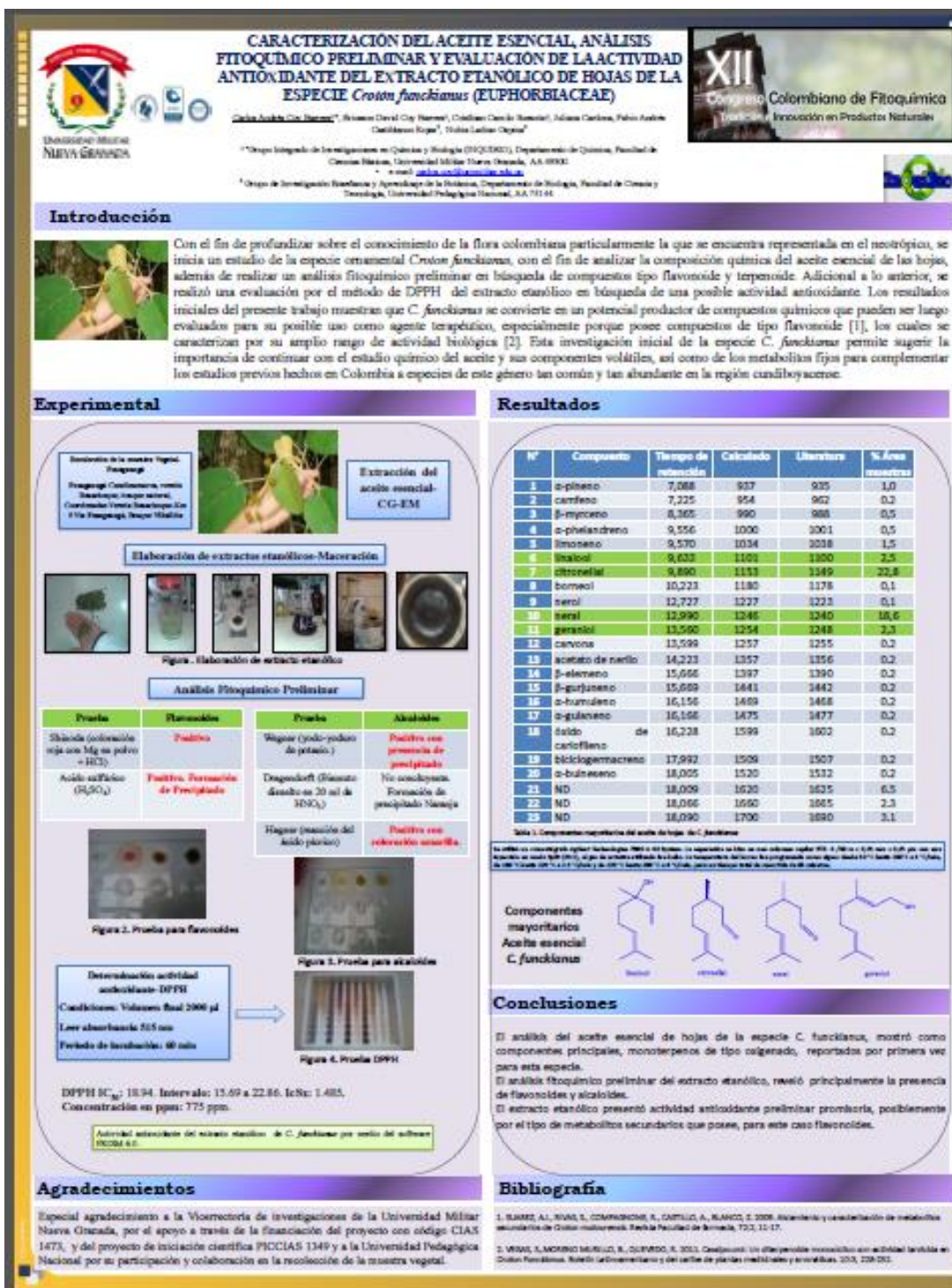
Como se evidencia anteriormente en las referencias citadas a colación, las plantas referenciadas son una alta fuente de compuestos secundarios de tipo flavonoide y polifenoles capaces de interrumpir los procesos celulares, bioquímicos y de crecimiento y desarrollo de las plagas que afectan a los cultivos como lo son los insectos. De tal forma, tanto los compuestos puros como los extractos de las especies vegetales son y según un objeto de estudio porque pueden ser candidatos para estudios más avanzados en donde se evalúan los efectos sobre el ciclo de vida de otros insectos, los efectos producidos escalando sobre plantas en condiciones controladas y de invernadero.

Por otra parte se exploran los diferentes metabolitos secundarios como lo son los flavonoides reducen la necesidad de utilizar productos químicos los cuales son muy nocivos para los suelos. Muy a menudo tendemos a olvidar que antes de la creación de los insecticidas químicos, las plantas usan sus propios mecanismos químicos para protegerse contra las plagas. Estos insecticidas orgánicos son menos dañinos para las plantas y los animales que lo rodean, elementos que deben ser explorados por las diferentes comunidades sociales en pro de un desarrollo sustentable.

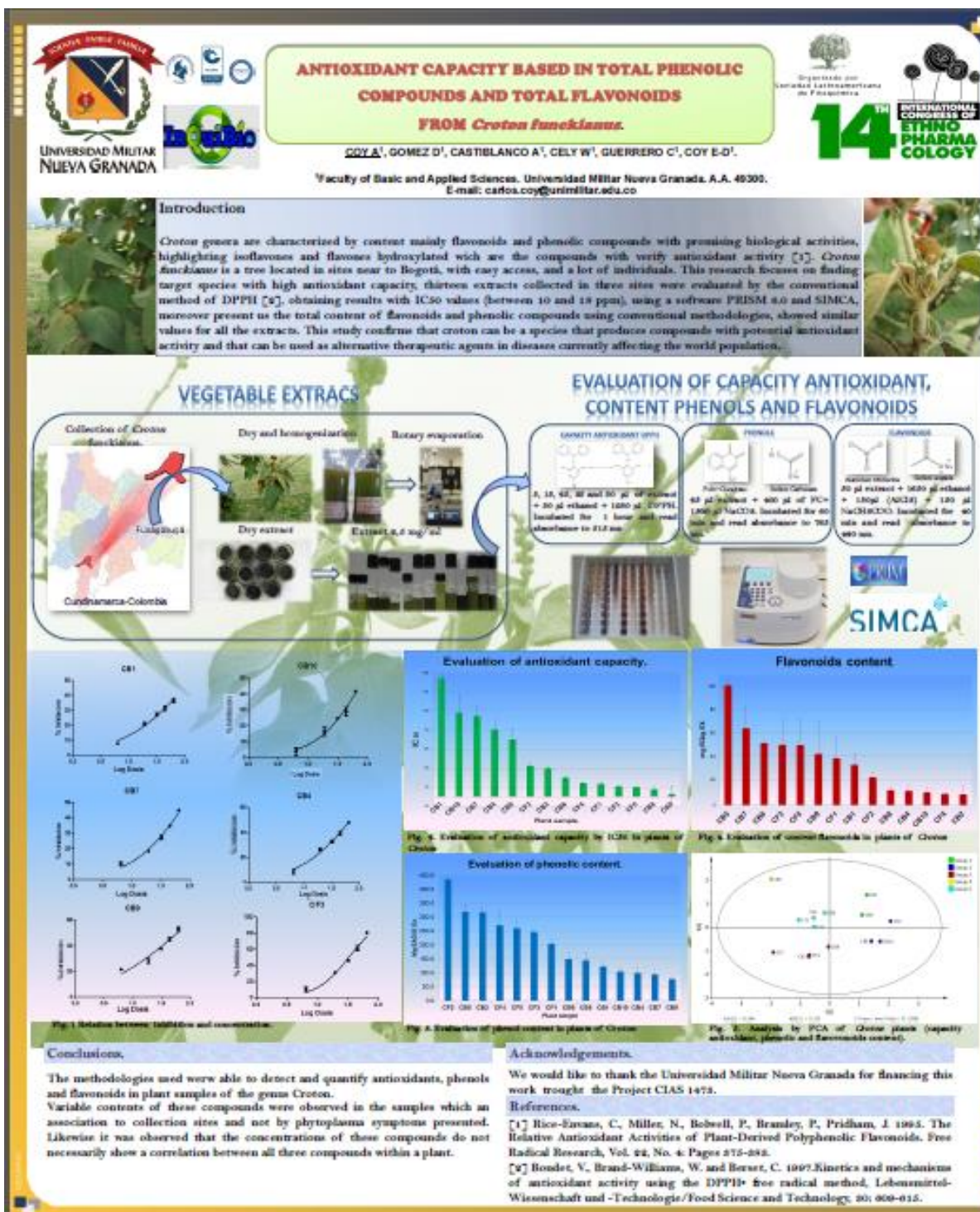
REFERENCIAS

- Ávila, M. Cruz, I. & Otero, J. 2014. Actividad insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) de los compuestos aislados de la parte aérea de *Piper septuplinervium* (56): C. D. O. y de las inflorescencias de *Piper subulmiforme* (76) & (77): Piperaceae. *Revista Científica*, Vol. 30, No. 3, pp. 440-445. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Ramírez, R. García, M. Soto, M. Collado, T. & Ibañez, G. 2011. Flavonoides y actividad anticancerígena de *Callis* secundarios (C1). *Investigación Científica*, México, Vol. 34, No. 1, Pp. 151-157. Chetumal.
- Gil, J. Gómez, M. & Trejo, J. 2008. Citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados. *Rev. Asoc. Colombiana de Ciencias* [Col.], 34: 143-151. Fecha de consulta: 25 de marzo de 2014. Disponible en: http://www.icasa.unal.edu.co/revistas/revista/revista34/revista34_34_143-151.pdf
- Martínez, R. González, J. Cuatrecasas, J. & Turró, M. 2005. Revisión: Los flavonoides: Propiedades y acciones anticancerígenas. *Revista Iberoamericana de Nutrición*, Vol. 33, No. 8, Pp. 271-276. Departamento de Psicología, Universidad de León, España.
- Páez, G. García, C. & Cotes, J. 2007. Actividad insecticida de los extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallidus* (Hemiptera: Rhodnius). *Acta de Investigación y Salud Ambiental*, Vol. 33, No. 1, Pp. 125 - 131. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Páez, G. García, C. & Cotes, J. 2007. Actividad insecticida de los extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *Revista CES Salud*, Vol. 21, No. 1, pp. 47-54.
- Ramírez, L., García, L., Rodríguez, C., Morales, H. & Castro, A. 2001. Evaluación de efecto insecticida sobre los extractos de plantas sobre *Leptophlebia arisa* especie invasora introducida de plagas. No. 80, pp. 50-55. San José, Costa Rica.


Anexo 3: Poster Caracterización del aceite esencial, análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Croton funkianus* XII Congreso Colombiano de Fitoquímica.



Anexo 4: Poster I: Evaluation of antioxidant capacity based in total phenolic compounds and total flavonoids from *Croton funcckianus*. XIV International Congress of Ethnofarmacology.



Anexo 5: Poster II: Chemical variability of *Croton funckianus* based in phytoplasm infection and collection sites. XIV International Congress of Ethnofarmacology.




UNIVERSIDAD MILITAR
NUEVA GRANADA

Chemical variability of the *Croton funckianus* based in phytoplasm infection and collection sites

COY A¹, GÓMEZ D¹, CASTIBLANCO A¹, CELY W¹, GUERRERO C¹, COY E-D¹.

¹Basic and Applied Sciences Faculty, Universidad Militar Nueva Granada, A.A. 48300.
E-mail: carlos.coy@unimilitar.edu.co



14TH INTERNATIONAL CONGRESS OF ETHNOPHARMACOLOGY

Introduction

The genus *Croton* (Euphorbiaceae), reports several uses in traditional medicine and has been studied in recent years due to the variety of biosynthesized chemical compounds, highlighting the presence of labdane (type of diterpene), cyclitols, triterpenoids, steroids, flavonoids and phenolic substances, their main feature is a wide range of biological activities [1], justifying the importance of their study in terms of bioprospecting [2]. Furthermore, trees of the genus *Croton* located in Bogotá, Colombia, presented symptoms associated with the presence of phytoplasmas that dramatically affect their morphology and alter the biochemical composition of plants by stimulating the synthesis of secondary metabolites, as part of defense responses or as a result of infection [3]. The present study showed the preliminary phytochemical analysis, and results from fourteen ethanolic extracts (from healthy and host plants collected in two sites near to Bogotá), using the HPLC technique in order to study the possible changes in the production of secondary metabolites according to profiles obtained.

Experimental

COLLECTION




Figure 1. Sites collection




Figure 2. *C. funckianus* site 1

PHYTOCHEMICAL PRELIMINARY ANALYSIS




Figure 2. *C. funckianus* site 2

Extraction	Concentration
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid
OH	apoptomeric / Flavonoid

Table 1. Symptomatic and asymptomatic species

RESULTS

FLAVONOIDS (+++)
DITERPENES (+++)
ALKALOIDS (+++)

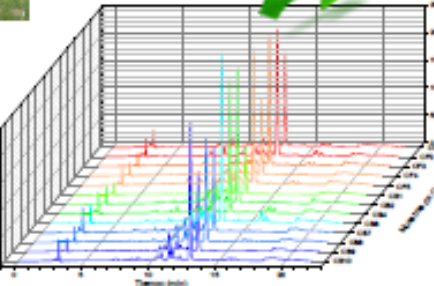


Figure 4. Metabolic profiling by HPLC-DAD of *C. funckianus*

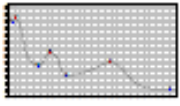


Figure 5. UV spectra of major peak

Conclusion

According to recent studies the genus *Croton*, reveal the presence of phytoplasmas transmitted by 16SrI group of Hemiptera Cicadellidae family. *Croton* is an ornamental tree located in Bogotá and nearby towns. The present study shows a similar metabolic profiling (thirteen samples, collected in two different parts), establishing a preliminary results respect to bioproduction of secondary metabolites. The major peak probably corresponds to flavonoid skeleton, and clearly seen that all the samples biosynthesized this compound. Moreover there are not obvious correlations between healthy plants and symptomatic plants. At first sight there are small changes but recommended further studies of phenological type, looking for possible explanations to own pathology of this genus.

Acknowledgements

To Universidad Militar Nueva Granada, project 1473 by financial support, to UPN (Universidad Pedagógica Nacional), prof. Nubia Lidia Ospina by botanic advice.

References

[1] Rice-Evans, C., Miller, N., Scwell, P., Bramley, P., and Pritham, I. 1995. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Radical Research*, Vol. 22, No. 4: Pages 375-383.

[2] Bondar, V., Brad-Williams, W. and Benet, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH+ free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology*, 30: 609-615.

Anexo 6: Resumen del artículo de tesis: Estudio químico preliminar y evaluación de la capacidad antioxidante basado en el contenido polifenólico y flavonoides totales de las especies *Croton funckianus* y *Croton bogotanus* (Euphorbiaceae) colectadas en dos sitios diferentes.

ESTUDIO QUIMICO PRELIMINAR Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE BASADO EN EL CONTENIDO POLIFENÓLICO Y FLAVONOIDES TOTALES DE LAS ESPECIES *Croton funckianus* Y *Croton bogotanus* (EUPHORBIACEAE) COLECTADAS EN DOS SITIOS DIFERENTES.

PRELIMINARY CHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY BASED IN PHENOLIC COMPOUNDS AND TOTAL FLAVONOIDS OF SPECIES *Croton funckianus* AND *Croton bogotanus* (EUPHORBIACEAE) COLLECTED IN TWO DIFFERENTS SITES.

Fabio Andrés CASTIBLANCO-ROJAS¹, Licenciado en Biología; Nubia LADINO- OSPINA¹ MSc.; Carlos Andrés COY-BARRERA² PhD.; Ericsson David COY- BARRERA² PhD. Diana Constanza GÓMEZ-GUTIÉRREZ²MSc.

¹ Grupo de investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica, Departamento de Biología, Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Pedagógica Nacional de Colombia. AA. 75144 Email: dbi_fcastiblanco564@pedagogica.edu.co.

² Grupo Integrado de Investigaciones en Química y Biología (INQUIBIO), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Militar Nueva Granada. AA 49300. Email: carlos.coy@unimiltar.edu.co.

Autor de correspondencia: Fabio Andrés Castiblanco Rojas, dbi_fcastiblanco564@pedagogica.edu.co.

Resumen.

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar (AFP) sobre un extracto etanólico proveniente de hojas de la especie *C. funckianus* con el fin de evaluar su composición en cuanto al contenido y presencia de metabolitos secundarios. Adicionalmente, se evaluó la capacidad antioxidante de 14 extractos etanólicos por el método de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilohidrazilo (DPPH), el contenido polifenólico mediante el método de Folin-Ciocalteu y el contenido de flavonoides totales mediante la reacción con tricloruro de aluminio (AlCl₃). Los resultados del AFP mostraron la presencia de compuestos tipo flavonoide, alcaloide y taninos los cuales se caracterizan porque poseen un amplio rango de actividades biológicas. Se observó que la muestra *C. funckianus* (CF₂) obtuvo el mayor contenido de polifenoles con un valor de 436.2±2.92 mg AG/g Ex, mientras que, *C. bogotanus* (CB₅) presentó un alto contenido de flavonoides con 100.7±0.45 mg EQ/ g Ex. *C. funckianus* (CF₂) presentó de igual manera la mejor capacidad antioxidante de acuerdo al índice de inhibición media (IC₅₀) cuyo resultado fue de 10.78±1.56. Los resultados del presente trabajo son útiles como una primera aproximación del conocimiento químico en la medida que los compuestos evaluados son un primer indicador de las condiciones fisiológicas que presentan estas especies vegetales cuando se encuentran expuestas frente a un determinado tipo de estrés.

Palabras clave: Euphorbiaceae, bioprospección, metabolito secundario.



APROXIMACION AL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD VEGETAL: UNA MIRADA DESDE LA FITOQUIMICA.



Con colaboración del grupo de investigación en Química y Biología de la Universidad Militar Nueva Granada. (INQUIBIO - UMNG)

Línea de Investigación Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica de la Universidad Pedagógica Nacional. (EAB – UPN)

Primera versión e impresión: Noviembre – Diciembre de 2014.

Fabio Andrés Castiblanco Rojas.
Licenciado en Biología.
Universidad Pedagógica Nacional.
Bogotá D.C. Colombia.

INTRODUCCIÓN.

Desde hace varias décadas es importante resaltar la importancia y el estudio de la biodiversidad de la flora colombiana para aprovecharla en beneficio del mejoramiento de la calidad de vida y del hombre (Bulla; *et al* 2012). El reino vegetal en sus distintas formas ha sido un factor crucial en los fenómenos biológicos, sociales y económicos determinantes en la evolución no solo de la naturaleza sino también de la humanidad. A la identificación de algunas plantas útiles y otras no tanto, se siguió la exploración y cultivo de esta manera surge así la agricultura. La observación de las semejanzas y las diferencias entre las plantas y entre éstas y otras formas de la vida terrestre, dan origen a la biología y la botánica, las cuales con sus lógicas y métodos de investigación y sistematización hacen posible junto con la química la emergencia de la fitoquímica (Barba; 1997).

En este orden de ideas es importante resaltar que la **fitoquímica**, es un área que proporciona de manera integral el conocimiento de algunos de los muchos productos químicos naturales que pueden ser extraídos, separados, purificados y determinados fisicoquímicamente en las plantas. Éstos se encuentran inmersos dentro de la complejidad de las células vegetales no solo como entidades químicas, sino también como productos de una serie de procesos que intervienen en su biogénesis, como sustancias activas que desempeñan una función en los procesos bioquímicos de las células o bien como elementos que pueden provocar alteraciones fisiológicas en los animales incluyendo el humano. La individualidad bioquímica, característica de cada taxón o grupo pequeño de sistemas vivos, determina la formación de elementos denominados metabolitos secundarios, sustancias de separación difícil, por la facilidad con la que forman complejos moleculares y por las pequeñas cantidades que se encuentran en cada ser vivo.

La presente unidad didáctica ofrece la opción de tener una gama de diferentes prácticas descriptivas e ilustrativas alrededor de algunos de los compuestos químicos que se encuentran en gran variadas proporciones dentro de las plantas, por otro lado, hay que considerar que durante el curso semestral se dispone de un determinado número de prácticas de laboratorio generando tanto en los maestros y estudiantes involucrados procesos relacionados con la enseñanza y el aprendizaje de la fitoquímica como un elemento orientador y posibilitador hacia la comprensión de la diversidad vegetal que se encuentra en el territorio nacional. Al ser empleada la unidad didáctica en el curso a fin a este tema el estudiante estaría en la capacidad de:

- Usar ciertos tipos de disolventes con propiedades para aislar compuestos a partir de productos naturales.
- Clasificar estructuras químicas de los diferentes compuestos de origen vegetal con alguna actividad biológica.
- Describir algunos metabolitos secundarios de importancia medicinal distribuidos en la naturaleza.

- Indagar y analizar métodos de identificación de principios activos de algunas especies vegetales.
- En general, determinar las propiedades físicas y químicas de algunos principios activos que se obtengan en el laboratorio, con el respaldo de tablas y literatura citada en cada unidad. Será de especial importancia sustancias como los aceites esenciales, flavonoides, taninos, terpenos y diterpenos y algunos otros que son compuestos representativos a lo largo de la unidad didáctica.

Con el fin de propiciar procesos de enseñanza y aprendizaje en torno a la fitoquímica, cada práctica incluye un formato para solicitar el tipo de material necesario. La principal utilidad de las prácticas que se incluyen en la presente unidad didáctica, radica en que cada una de ellas posibilita una demostración visual que seguramente sería más difícil captar desde el tablero y de una manera exclusivamente teórica.

JUSTIFICACION.

Perfil del grupo a quien va dirigida la Unidad: Maestros en formación entre los 19 y 24 años que se encuentran cursando cursos electivos de la Línea de Investigación: Enseñanza y Aprendizaje de la Botánica o el componente del ciclo de fundamentación: Química orgánica del pensum de Licenciatura en Biología de la Universidad Pedagógica Nacional. El grupo a quien está dirigida la Unidad didáctica, son estudiantes que hacen parte de la sociedad como entes formadores, por ello se hace necesario construir un proceso integral de su área. Es por este motivo que la U.D concebida como una herramienta metodológica haga parte de su formación individual. Instrumento utilizado por profesores en ejercicio para completar su formación y de acuerdo a ello y a su disponibilidad en las instituciones educativas se realizara la contextualización para su aplicación.

ELEMENTOS CLAVES DE LA UNIDAD DIDACTICA.

Como sabemos, las plantas originan una gran cantidad de sustancias, producto de su metabolismo primario, sustancias llamadas Metabolitos secundarios.

Dentro de un contexto biológico, están sustancias interactúan en los procesos de defensa de las plantas, lo que a su vez en la sociedad ha desencadenado una serie de usos y aplicaciones en campos como el médico o el agrónomo,

Un elemento clave para la construcción de nuevos significados en torno a las relaciones que emergen de la biología y la química es el conocimiento de las moléculas implicadas en las actividades de las plantas, además de la determinación de su estructura y su funcionamiento.

OBJETIVO GENERAL DE LA UNIDAD DIDACTICA.

Aproximar al estudiante del Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología de la Universidad Pedagógica Nacional, hacia el conocimiento de la estructura, función y biosíntesis de los flavonoides como moléculas químicas de las plantas a partir de conceptos adquiridos y enseñados previamente con el fin de relacionarlos con el entorno natural y social.

CONEXIÓN CON EL CURRÍCULO.

Grupos funcionales de la química orgánica y unidades básicas de las macromoléculas. Relación con el entorno natural e industrial.

CONTENIDO CONCEPTUAL PRESENTE EN LA U.D.

- General secuencias de relación entre lo que ya se conoce (química orgánica) confortándolo con lo nuevo a aprender (fitoquímica), para posibilitar el proceso de aprendizaje.

- Obtener una perspectiva general los conceptos que se encuentran asociados con la fitoquímica.
- Aproximar al estudiante hacia un grupo en particular de compuestos o metabolitos secundarios (flavonoides), que se encuentran presentes en las plantas y que a su vez desencadenan una serie de respuestas e interacciones con el entorno natural.
- Concientizar a los estudiantes involucrados en la unidad acerca de los buenos hábitos en el trabajo de laboratorio para cuidar la salud y el ambiente.
- Fomentar un acercamiento y actitudes de apropiación en especial con las plantas como unidades sistémicas presentes en los diferentes ecosistemas.
- Apreciar la importancia que tienen los flavonoides en la salud humana, para dar solución a problemas que afecten su calidad de vida.
- Promover una actitud frente al no consumismo excesivo de sustancias de origen vegetal que pueden alterar su salud.

CONTENIDOS QUE SE ABORDARAN EN LA U.D

Saber conocer (Conceptual).	Saber Hacer (Procedimental).	Saber Valorar (Actitudinal).
Conceptos de Afianzamiento.	Utiliza modelos, dibujos, esquemas y mapas para relacionar los diversos procesos metabólicos que se dan en las plantas.	Razona y propone hipótesis de forma innovadora a diversos planteamientos.
Compuestos orgánicos alifáticos.	Identifica a los flavonoides de acuerdo a su funcionalidad, ya sea en el cuerpo, en alimentos o a nivel industrial.	Reconocer la importancia de relacionar la química con los diversos sistemas vivientes.
Compuestos orgánicos cíclicos.	Aplica conocimientos adquiridos en las diferentes acciones propuestas y en la solución de situaciones problema de manera crítica de acuerdo al tema.	Da solución a problemas de la vida cotidiana involucrando los contenidos presentes en la U.D.
Compuestos aromáticos y no aromáticos.	Plantea hipótesis sencillas para dar respuesta desde una perspectiva científica	Manifiesta interés en el desarrollo de cada una de las actividades aportando valiosas opiniones al tema, enlazando preconceptos con conceptos nuevos.
Compuestos heterocíclicos y homocíclicos.		
Compuestos Monocíclico y Políciclico.		
Conceptos de enseñanza.		

Metabolitos de origen vegetal.	a un problema del entorno.	Asume con criterio el efecto de algunas sustancias, producto de las plantas sobre el cuerpo humano.
Flavonoides.	Manipula de manera adecuada los reactivos y residuos del producto en las prácticas experimentales que se desarrollen.	Reconoce el tema de los flavonoides para mejorar la calidad de vida.
Estructura.		
Función.		
Clasificación.		
Usos.	Desarrolla y fortalece por medio de prácticas experimentales el segmento conceptual de la fitoquímica propuesto.	

Conocimientos previos requeridos para el desarrollo del tema.

- Nociones preliminares del átomo del carbono.
- Tipos de cadenas carbonadas y nomenclatura.
- Grupos funcionales.
- Nomenclatura química.
- Tipo de reacciones orgánicas.
- Generalidades de las macromoléculas.

La unidad didáctica es una propuesta pedagógica que responde a los lineamientos curriculares y a los estándares básicos en competencias exigidos por el Ministerio de Educación Nacional (MEN) Esta Unidad Didáctica te posibilitará potenciar tus capacidades de manera que puedas manejar tus conocimientos propios del área de ciencias naturales, aproximarte al conocimiento científico y desarrollar tus compromisos sociales y personales.

Lo que se pretende es que TU aprendizaje sea más dinámico.

¿Qué encontraras en el texto?

- Estos hipervínculos.

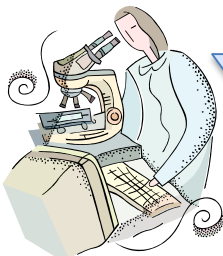
Cuando los veas debes saber que casa uno de ellos te indica que, además de lo que hay en cada página vas a encontrar:



Mayor información para ampliar tus conocimientos sobre temas específicos. Además en algunos casos se sugieren actividades.



Una presentación o un video que te ayudara a comprender los temas desarrollados



Consulta sobre la sección de laboratorios. Se obtendrá la información necesaria para la presentación de tu informe.

Una evaluación que te permitirá verificar tus capacidades y el aprendizaje de los contenidos de la unidad.



Un método para que desarrolles destrezas en la comprensión de los contenidos propios de las Ciencias Naturales.

Comprender para Aprender.

Recupera Información

Interpreta

Reflexiona y Valora

Plantea y Actúa

¿Cómo se encuentra organizada la Unidad didáctica?

La unidad didáctica está compuesta por 2 unidades y los contenidos están organizados de acuerdo con los dos componentes de las ciencias naturales.

- Páginas iniciales.

Al comienzo de cada unidad encontrarás una página de apertura con los temas que vas a trabajar, una lectura relacionada con los contenidos y algunas preguntas sobre ella.

Para pensar...
 Texto breve de divulgación científica que se relaciona con el tema de la unidad y recoge algunos de los aspectos más importantes que vas a estudiar.

Para responder...
 Las preguntas de esta sección te permitirán fortalecer tu capacidad de interpretar textos relacionados con las ciencias naturales.

- Páginas del contenido.

En las páginas del contenido se desarrollan las ideas fundamentales del tema, de acuerdo con los lineamientos curriculares y con los estándares para la enseñanza de las ciencias naturales.

Te indica el tipo de estándar que vas a trabajar en la Unidad.

Componente.



En las páginas del contenido también encontraras estos iconos.



Miniexperimento. Pequeñas practicas de laboratorio para afianzar los conocimientos de las ciencias.



Tu salud. Conocimientos científicos que puestos en practica mejoran tu calidad de vida.



Por la salud de nuestro planeta. Conocimientos científicos que al ser puestos en practica contribuyen al mejoramiento del ambiente.



Misterio científico. Curiosidad científicas verdaderas o erroneas sobre fenomenos naturales.

- Secciones especiales.

En la Unidad didáctica también encontrarás algunas secciones especiales que se pueden identificar así.

Laboratorio de ciencias naturales.

A través de estas prácticas podrás comprobar algunos fenómenos científicos y aplicar conceptos trabajados, para aproximarte al conocimiento científico.

LABORATORIO DE CIENCIAS NATURALES

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA NACIONAL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LINEA DE INVESTIGACIÓN ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTÁNICA

PRÁCTICA DE LABORATORIO No. 2
ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE FENÓLES Y FLAVONOIDES EN EXTRACTOS ETANOLICOS DE *C. fumigatus*.

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en las plantas cuyos estructuras se derivan del núcleo aromático flavano o 2-fenilbenzopirano. También son compuestos de la serie C₆ - C₃ - C₆ por lo que su esqueleto de carbonos consiste en dos grupos C₆ que son anillos de benceno sustituidos por una cadena alifática de tres carbonos.

Los flavonoides están frecuentemente en las plantas en forma de glucósidos. Se conocen aproximadamente 750 de estos compuestos, de los que el más simple es la flavona, que se encuentra en la superficie de hojas y tallos de muchas especies de frutales en forma de polvo blanco. Los flavonoides se dividen en varias clases, de acuerdo con el nivel de oxidación del anillo central de pirano. Las dos clases más importantes son los flavonoles o 3-hidroflavonoles (como la quercetina), y las empaquetadas (como la quercitina). Al ir del anillo más reducido al más oxidado, se tienen las siguientes clases de flavonoides.

Materiales para Análisis Fitoquímico Preliminar para Flavonoides:

3 Beaker de 400 ml	Etanol 1000 ml
6 Beaker de 50 y 100 ml	Etanol; agua (L:V) 200 ml
1 Mortero con Pistilo	Eter de Petróleo (20 ml)
3 Troceta de 100 ml	HCl 5 ml
1 Gradilla	Mg en polvo 0.1 g.
14 Tubos de ensayo	
3 góndoles	
2 Pipetas de 1-5 ml	
1 Embudo para tubo de ensayo	
1 Termómetro	
1 Esobilla	
1 Embudo de decantación de 250 ml	
1 Embudo de filtración	
1 plancha de calentamiento	

Materiales para prueba de fenoles y flavonoides.

30 Celdas de espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico.	Etanol 1000 ml
Micropipetas de 10 - 100 - 1000 µl	Tinción de Aluminio 500 ml

TABLA DE CONTENIDO.

CRITERIOS PARA LAS ACTIVIDADES DE ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR.			
Ítems	Tiempo	Modo de Trabajo	Recursos.
INTRODUCCION AL ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR.			
Guía de trabajo No 1.			
Parte I. Prueba de entrada donde se conocerá los conceptos previos basados en química orgánica.	20 Minutos.	Individual.	Fotocopias.
Parte II. (Clase) Constituyentes secundarios de las plantas. Presentación a los estudiantes por parte del docente, el tema de metabolitos secundarios, espacio para resolver dudas y encaminar el procesos de enseñanza y aprendizaje de la fitoquímica.	100 Minutos.	Colaborativo (estudiantes y Maestro).	Presentación en Power Point y Video Beam.
Parte III. (Extraclase) Recolecta de Material vegetal. Se conforman grupos de laboratorio donde su primera tarea es la recolección del material vegetal, hojas de la especie sangregado (<i>Croton funckianus</i>) para las respectivas prácticas de laboratorio.	Extraclase. Importante secado a temperatura ambiente del material.	Grupos de Laboratorio 4 personas máximo.	Prensa para colecta de material.
PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS PARA PRUEBAS FITOQUIMICAS PRELIMINARES			
Guía de Trabajo No 2.			
Parte I. (Laboratorio). Preparación de los extractos etanólicos secos por parte de los estudiantes. Cada grupo deberá traer el material de trabajo correspondiente, explícito en la guía de trabajo No 1.	120 Minutos	Grupo de laboratorio máximo 4 personas más maestro acompañante	Explicación por parte del maestro más material de trabajo.

Parte II (Extraclase) Trabajo Los estudiantes deberán estar familiarizados con las marchas fitoquímicas y las reacciones con los diferentes metabolitos en presencia del reactivo.	Preinforme de Laboratorio.	Grupo máximo de 4 personas.	Presentación en Físico para revisión
---	----------------------------	-----------------------------	--------------------------------------

COMPRESION DE LAS MARCHAS FITOQUIMICAS Y REACCIONES DE LOS METABOLITOS FRENTE AL REACTIVO.

Guía de trabajo No 3.

Parte I. (Clase) Se reforzara el tema de constituyentes secundarios, además de una explicación acerca de las marchas fitoquímicas que serán llevadas a cabo para el reconocimiento de los metabolitos secundarios.	60 Minutos.	Colaborativo (estudiantes y Maestro).	Presentación en Power Point y Video Beam.
Parte II. (Preparación de los extractos secos) Si la disponibilidad de equipos lo posibilita, se obtendrán los extractos secos para el análisis en la práctica de laboratorio	60 Minutos.	Colaborativo (estudiantes y Maestro).	Rotaevaporador, extractos etanólicos.

PRACTICA DE LABORATORIO No 1: ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE *C. funckianus*.

Práctica de laboratorio No 1.

Determinación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de la especie <i>C. funckianus</i> .	120 Minutos	Grupo de Laboratorio	Entrega del respectivo informe de laboratorio
---	-------------	----------------------	---

CRITERIOS PARA LAS ACTIVIDADES DE FLAVONOIDES.

PRUEBA DE ENTRADA

Guía de Trabajo No 4.

Parte I (Clase): Prueba de ideas previas preinstruccionales sobre flavonoides orientada a	20 Minutos	Individual	Fotocopias
---	------------	------------	------------

pensar que características conocen de los flavonoides.

Parte II (Clase): Identificación de semejanzas estructurales sobre varios flavonoides encaminado a identificar la estructura básica de los mismos logrando comparaciones y reconocimiento de particularidades de cada grupo.

100 Minutos

Maestro y estudiante

Fotocopias

Guía de trabajo No 5.

Parte I. (Clase) Presentación a los estudiantes por parte del docente el tema de flavonoides. Espacio para resolver dudas. Encaminada a dirigir el proceso de enseñanza y aprendizaje de este grupo de metabolitos secundarios.

50 Minutos

Maestro

Video Beam y presentación en Power Point.

Parte II. Clasificación estructural de los flavonoides afianzar conceptos relacionados.

30 Minutos.

Individual.

Tablero.

Parte III. (Extraclase) Caracterizar un flavonoide de acuerdo a los parámetros establecidos y preparar una presentación lúdica. Conocer funcionalidad y utilidad de los flavonoides.

Guía de trabajo No 6.

Parte I. Presentación de la parte III de la guía de trabajo No 5.

120 Minutos.

Grupos de a 3 integrantes

Proporcionado por el estudiante.

Parte II. Situación problema: ¿El consumo de flavonoides

afecta la salud humana?
¿Hacen parte de nuestra dieta? Diseñe un folleto al fin de responder de forma coherente la situación problema enunciada, desarrollando competencias educativas básicas.

Parejas

Proporcionado por el estudiante.

PRACTICA DE LABORATORIO No 2: CUANTIFICACION Y EVALUACION DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES EN EXTRACTOS ETANOLICOS DE *C. funckianus*.

Práctica de laboratorio para la determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides presentes en la especie *Croton funckianus*. El informe final será la entrega en forma de artículo científico explicando los resultados y análisis encontrados en la práctica misma.

El trabajo práctico de laboratorio se llevara a cabo en máximo tres sesiones de clase, en donde a partir del extracto seco que fue recolectado en la práctica de análisis fitoquímico preliminar, será empleado para elaborar los extractos etanólicos con el solvente con grado analítico de pureza.

Para ello, en la guía de la práctica de laboratorio se encontrarán los siguientes protocolos para el desarrollo de: Elaboración del extracto etanólico, Marcha fitoquímica para la detección de flavonoides a nivel cualitativo (prueba de Shinoda), Elaboración de la curva de calibración con patrón de Quercetina, Prueba para la determinación de flavonoides con $AlCl_3$, Análisis cuantitativo.

Será llevado a cabo por grupos de laboratorio de 4 personas con el material y reactivos correspondientes.

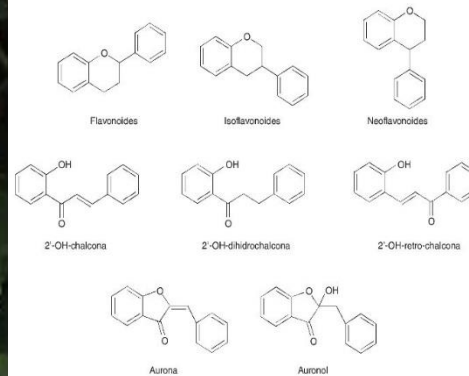
PRUEBA DE SALIDA

Prueba postinstruccional sobre flavonoides orientada a analizar el proceso de enseñanza y aprendizaje por parte del estudiante

120 Minutos.

Individual.

Fotocopias.



CONSTITUYENTES SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS

UNIDAD 1

TEMAS DE LA UNIDAD:

Fitoquímica.

Taxonomía Química.

De las plantas se puede extraer material vegetal que pueden ser exudados, tales como: gomas, resinas, mieles y otros productos que brotan en gran cantidad al realizarle incisiones o cortes a la planta viva. El caucho uno de ellos de gran importancia en la industria química y automotriz. Por destilación se pueden extraer aceites esenciales. Estos aceites son productos grasos compuestos por un número muy grande de compuestos químicos aromáticos muy volátiles de estructura y composición muy compleja. La mayoría son terpenos de bajo peso molecular.

Para responder: ¿Qué impacto traería para los ecosistemas y para la salud humana la extracción y utilización de compuestos químicos vegetales respectivamente?



UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTANICA.

GUIA DE TRABAJO No 1.

TEST DE ENTRADA SOBRE CONCEPTOS EN QUIMICA ORGANICA, BIOQUIMICA Y FITOQUIMICA.

Nombre: _____ Fecha: _____

En cada una de las situaciones, de los diferentes distractores elija la opción que le sea pertinente y señale la respuesta adecuada.

1. En la química orgánica, al igual que en la química inorgánica se clasifican los compuestos dependiendo de su naturaleza. Los compuestos 2,2-dimetil-4-fenil-3-butanona, 1-isopropoxi-2-metoxiciclohexano y el acetato de fenilo respectivamente hacen parte del grupo de:

- a) Cetona-Alcohol-Estere.
- b) Fenol-Estere-Amida.
- c) Cetona-Eter-Estere.
- d) Eter-Alcano-Fenol.

2. Cuál de los siguientes compuestos es un compuesto aromático.

a)	
b)	

c)	
d)	

De La preguntas 3 a la 6 responde:

- a) Si solo I, II y III son correctas.
- b) Si solo I y IV son correctas.
- c) Si solo II y IV son correctas.
- d) Si solo IV es correcta.

3. Los carbohidratos polisacáridos son polímeros constituidos por unidades de moléculas denominadas monosacáridos de lo cual se afirma que.

- I) Los ejemplos de azúcares simples son la fructosa y la galactosa.
- II) Los carbohidratos en las plantas son almacenados en formas como el almidón.
- III) Los que tienen forma de polisacáridos contribuyen a la construcción de la estructura celular.

- IV) Tienen la función de ser antígenos.

La respuesta es: _____

4. Los péptidos son cadenas lineales de aminoácidos unidos por enlaces químicos covalentes que se caracterizan por:

- I) Tener un peso molecular inferior a la proteína.
 II) Se caracterizan por ser simples o conjugados.
 III) Estar involucrados en la transducción de señales.
 IV) Se unen por el grupo NH_2 de un aminoácido y el grupo COOH de otro aminoácido.

La respuesta es: _____

5. Las unidades monoméricas que conforman las proteínas son los aminoácidos los cuales:

- I) No son fatales para la planta si carecen de ellos.
 II) Aumentan la permeabilidad celular de las plantas.
 III) Cumplen funciones de defensa en las plantas.
 IV) Disparan la floración y evitan el aborto floral.

La respuesta es: _____

6. En los ácidos nucleicos las unidades monoméricas que los conforma son los nucleótidos que se caracterizan por:

- I) Ser moléculas orgánicas por la unión covalente de sus moléculas.

- II) Las bases nitrogenadas son derivadas de compuestos heterocíclicos aromáticos

- III) Son moléculas con energía acumulada en sus enlaces.

- IV) Tiene un azúcar en forma de pentosa en su estructura.

La respuesta es: _____

7. Las plantas producen una diversidad de compuestos responsables de la coloración y aromas de frutos y semillas, como también, otros están vinculados con interacciones ecológicas como en la atracción de polinizadores. Estas sustancias son objeto de estudio de la fitoquímica, las cuales se denominan.

- a) Metabolitos primarios.
 b) Metabolitos secundarios o productos naturales vegetales.
 c) Fotosintatos.
 d) Macromoléculas.

8. Dentro del metabolismo de las plantas se sintetizan grupos de compuestos estudiados por la fitoquímica. ¿Cuáles de las siguientes sustancias son objeto de estudio de esta área?

- a) Terpenos, Carbohidratos, Alcaloides y Proteínas.
 b) Aminoácidos, Flavonoides, Antocianinas y Terpenos.
 c) Alcaloides, Flavonoides, Cumarinas y Saponinas.

d) Cumarinas, Antocianinas,
Ácidos grasos y Terpenos.

9. Los compuestos que estudia la fitoquímica son derivados de tres vías principales que se originan en el metabolismo principal de los organismos vegetales. Estas rutas son.

a) Piruvato, Ácido Shikímico y Ciclo de Krebs.

b) Ácido Shikímico, Ácido malónico y Ácido melavónico.

c) Ácido acético, AcetilCoA y Ácido Masónico.

d) Ácido malónico, Ácido acético y Glicerol.

PARTE II.

Por parte del maestro encargado, abordará el tema de constituyentes secundarios de las plantas tomando como eje de partida en contenido conceptual que se elaboró para dicho fin que se encuentra en la sección posterior a esta actividad de trabajo. Este espacio estará abierto a la discusión y resolución de preguntas por parte de los involucrados en el proceso de enseñanza y aprendizaje (Maestro y Estudiante).

PARTE III Extraclase.

Colecta del material vegetal de la especie *Croton funckianus* (Euphorbiaceae) que se encuentra distribuida en la ciudad de Bogotá. El protocolo será el siguiente:

La obtención de extractos empieza por la recolección del material que es llevado al laboratorio de química o biología. El material se dispone en bandejas plásticas separando por órgano el material vegetal. Se deja secar a temperatura ambiente, cuidando que no se infeste de microorganismos.

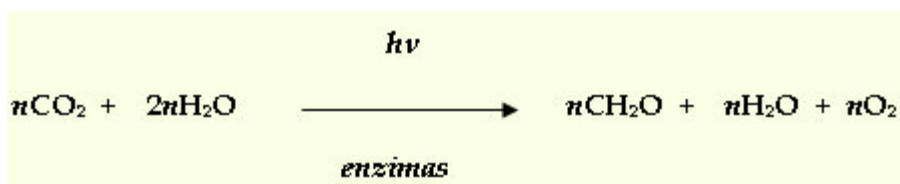


CONSTITUYENTES SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS.

Elementos orientadores de: Ciria Valencia Ortiz. Ciudad de México. México; 2000.

Las plantas son esenciales en la vida del hombre y de los animales debido a que convierten energía solar en compuestos de carbono que a su vez producen otros tipos de compuestos alimenticios importantes; a partir de moléculas de agua, dióxido de carbono (CO₂), y energía solar, elaboran hidratos de carbono, lípidos y proteínas considerados como metabolitos primarios. Las plantas no solo producen estas sustancias, estas también producen otros miles de compuestos a los que se les llaman metabolitos secundarios, muchos de los cuales los utiliza el hombre para diversos propósitos. La reacción fotosintética es presentada en la siguiente ecuación (fig. 01).

Fig. 01: Ecuación de la fotosíntesis. Melgarejo et al; 2012.



Esta ecuación es general, y específicamente los productos pueden ser diferentes oligosacáridos o polisacáridos (la reducción del dióxido de carbono a lípidos, no implica otras reacciones químicas). Los metabolitos secundarios que las plantas producen se conocen como constituyentes químicos, y los metabolitos responsables de los efectos terapéuticos se conocen como constituyentes o principios activos, que son diferentes a los constituyentes inertes que también se encuentran en las plantas; entre estos últimos están la celulosa, lignina, suberina además el almidón, albúmina y algunas materias colorantes que no tienen actividad farmacológica definida. La presencia de sustancias inertes puede modificar e incluso eliminar la absorción o la potencialidad de los constituyentes activos. Para anular esos efectos en drogas crudas o en preparaciones galénicas (trayectoria que va desde la droga o materia prima a la sustancia medicamentosa o medicamento así como de la transformación de esa sustancia medicamentosa en forma farmacéutica (Valencia; 2000) los principios activos para su uso terapéutico se extraen, purifican y se cristalizan.

Aunque el nombre de metabolito secundario se usa para denominar los productos finales del metabolismo, muchos no tienen importancia para la planta que los producen y no son productos finales ya que posteriormente pueden presentar cambios.

Es importante resaltar que los productos farmacológicamente activos son aquellos a los que se les atribuye actividad terapéutica; puede ser una sustancia aislada o una mezcla de principios. En este último caso, la separación de ellos no se considera ni práctica ni ventajosa. Los constituyentes aislados pueden ser alcaloides, glucósidos, enzimas, fitohormonas, vitaminas etc., y las mezclas incluyen aceites fijos lípidos, ceras, aceites

volátiles resinas, oleorresinas, gomorresinas, bálsamos etc. Estas mezclas no solo tienen un uso terapéutico sino también como materias primas en las industrias farmacéuticas, de cosméticos, perfumería y lubricantes.

Taxonomía química.



Hoja de *Ginkgo biloba*. Tomada de: <http://www.biomanantial.com/>

Uno de los primeros taxonomistas fue Linnaeus (1707-1778) quien consideró que las diferentes especies de plantas eran constantes y describió cerca de 8000 especies; su número ha aumentado y ahora se estima que hay más de 25000 especies diferentes de angiospermas (Crisci; 2006).

Hasta la fecha se han propuesto muchos sistemas de clasificación, los más modernos intentan utilizar la mayor parte de caracteres presentes en las plantas y los resultados de las investigaciones en otros campos científicos, como por ejemplo su anatomía, citología, genética, palinología, paleontología geográfica, geología y química. La clasificación basada en la composición química de las plantas, agrupa a estas de acuerdo a los componentes químicos presentes y recibe el nombre de **quimiotaxonomía**.

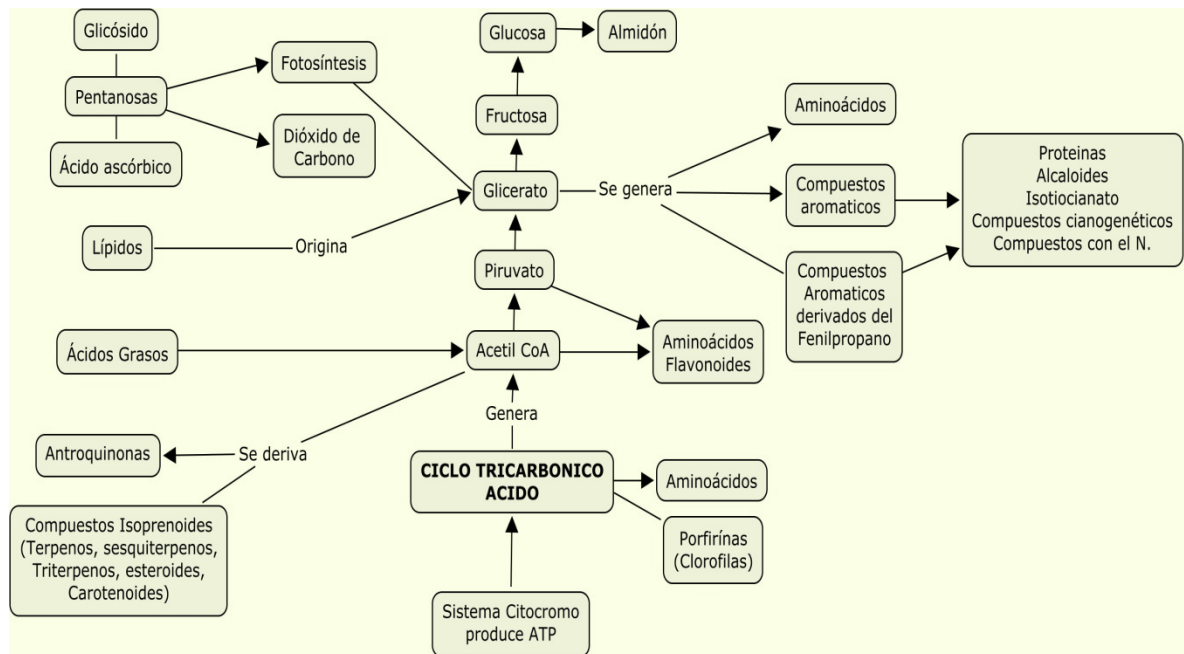


Fig. 02: Origen de algunos metabolitos secundarios en relación con los pasos metabólicos básicos. (Valencia; 2000)

La taxonomía molecular de las plantas se basa en los constituyentes secundarios, generalmente los de bajo peso molecular que se encuentran en las plantas y compuestos importantes biosintéticos de alto peso molecular como proteínas y DNA, por

lo que se puede decir que la taxonomía molecular se basa en la fitoquímica, ya que esta se ocupa de aislar, elucidar las estructuras y la conformación de los constituyentes que se encuentran en las plantas sin tomar en cuenta su posición sistemática. La fitoquímica ha sido y va a seguir siendo de gran importancia para el desarrollo de la química orgánica de productos naturales (Valencia; 2000).

La potencialidad de la química es la taxonomía vegetal, fue útil para los taxonomistas anteriores a Darwin, como De Chandole (1778-1841) ya que incorporaron muchos caracteres químicos como el olor, color, sabor etc., de las flores en sus descripciones taxonómicas en todos los niveles: las venenosas, algunas plantas que acumulan almidón, otras lípidos o proteínas. Las algas se clasifican de acuerdo a su pigmentación en algas cafés, rojas, verdes etc. Cuando se obtuvo la constitución química de los compuestos responsables de tales propiedades, se consideró que muchos constituyentes vegetales podrían estar relacionados y por lo tanto, ser útiles en su clasificación química, y así muchas plantas fueron clasificadas juntas porque tenían compuestos químicos idénticos o parecidos, esta fue una de las razones por las cuales emergió la taxonomía molecular. Recientemente se han hecho investigaciones para demostrar que las plantas relacionadas por la clasificación botánica producen compuestos similares. Estos estudios quimiotaxonómicos pueden ser de valor farmacéutico porque siempre existe la posibilidad de aislar materiales activos.

Las plantas tienen una composición química compleja y están sujetas a variaciones considerables; en cambio, las moléculas están definidas en términos de la fisicoquímica y esto se debe al mérito de los estudios quimiotaxonómicos (Valencia; 2000).

Los diferentes órganos de la planta contienen diversos constituyentes químicos, y la comparación de la química de las hojas de una especie, con las raíces y las semillas de otra especie, puede guiar a conclusiones diferentes. A menudo las partes estudiadas de la planta se mencionan en la literatura, lo que le resta el valor taxonómico a la información.



UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTANICA.

GUIA DE TRABAJO No 2.

PREPARACION DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA OBTENCION DE EXTRACTOS ETANÓLICOS.

Parte I: Procesamiento del Material.

Con el protocolo descrito anteriormente se procederá a la elaboración de los extractos etanólicos. El protocolo para dicha actividad será la siguiente (Laboratorio de Bioorgánica; 2014. UMNG):

- ✓ La obtención de extractos empieza por la recolección del material que es llevado al laboratorio de química o biología.
- ✓ El material se dispone en bandejas plásticas separando por órgano el material vegetal.
- ✓ Se deje secar a temperatura ambiente, cuidando que no se infeste de microorganismos.
- ✓ Luego el material es triturado utilizando un homogenizador con el fin de disminuir el tamaño de la partícula y mejorar la posterior extracción con etanol al 96%.
- ✓ La metodología utilizada es la maceración etanólica en frío con agitación, en donde se permite la extracción del disolvente en el material vegetal por 48 horas.

Imágenes tomadas por: Andrés Castiblanco; 2014. Laboratorio de Bioorgánica, Universidad Militar Nueva Granada.



Materiales empleados: Material vegetal seco, Frascos de vidrio de tamaño considerado, homogenizador o licuadora, Balanza analítica, Bolsas Ziploc, Etanol, libreta de apuntes, bata de laboratorio, cinta para rotular, Sharpie.

Parte II (Extraclase): Aproximación al análisis fitoquímico preliminar.

Para la familiarización por parte de los estudiantes acerca de unos de los métodos universales para el estudio de la fitoquímica es que realicen una búsqueda inicial en torno a los que es el método, la importancia y el reconocimiento de los diferentes reactivos, equipos. Para lograr a cabo este objetivo tendrán la labor de realizar un Pre-informe de laboratorio en donde se especifique los puntos anteriormente descritos, además de la elaboración de marchas analíticas que especifica el paso a paso de cada una de las pruebas a realizar en la sesión de laboratorio.



UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTANICA.

GUIA DE TRABAJO No 3.
EL ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR.

Elementos orientadores de Olga Lock de Ugaz. 1994.

Son compuestos orgánicos sintetizados por los organismos que no tienen un rol directo en el crecimiento o en la reproducción del mismo. Poseen características muy variadas, así como una extrema complejidad química. La ausencia de algún metabolito secundario no impide la supervivencia, si bien en algunas ocasiones se verá afectado por ella (Lock de Ugaz; 1994).

Características:

- 1) No son esenciales para el crecimiento.
- 2) Generalmente se producen como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre sí.
- 3) La producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea.
- 4) Cada uno de estos productos es producido por un grupo muy reducido de organismos (Brook, G. F.; J. Butel y S. A. Morse; 2005).

Metabolitos Secundarios en la Plantas: Los metabolitos secundarios en las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre a planta con su ambiente. Los constituyentes químicos se pueden agrupar en base a sus orígenes biosintéticos, se agrupan en cuatro clases principales.

Terpenos: Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (Sanabria; 1983).

De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen:

- Monoterpenos: Terpenos de 10 C contienen dos unidades C5.
- Sesquiterpenos: Tienen tres unidades de isopreno y 15 C.
- Diterpenos: Tienen cuatro unidades C5 y 20 C.

- Triterpenos: Tienen 30 C.
- Tetraterpenos: Tienen 40 C.
- Politerpenos: Contienen más de 8 unidades de isopreno.

Compuestos Fenólicos: Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol (Sanabria; 1983).

Cumarinas: Amplia familia de lactonas, algunas tienen funciones como agentes antimicrobianos, inhibidores de germinación y algunas muestran fototoxicidad frente a insectos (Sanabria; 1983).

Flavonoides: Poseen las características de ser polifenólicos y ser solubles en agua. Su esqueleto carbonado tiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos mediante un puente de tres carbonos (Barba; 1997).

Lignina: Polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos lo que hace muy difícil su extracción sin degradarla (Barba; 1997).

Taninos: compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. Existen dos categorías: taninos condensados, polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas, y taninos hidrolizables, polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente (Barba; 1997).

Glicósidos: hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (Domínguez; 1985).

Saponinas: Son triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura (Domínguez; 1985).

Glicósidos cianogénicos: Compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN) (Sanabria; 1983).

Alcaloides: Familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (Domínguez; 1985).

Importancia De Los Metabolitos Secundarios:

La distribución de los metabolitos secundarios en el reino vegetal es limitada y para determinados compuestos queda restringida a ciertas especies, por lo tanto es improbable que desarrollen un papel fundamental en el metabolismo primario. Sin embargo, existen excepciones, entre estas están las clorofilas y los reguladores del crecimiento (hormonas vegetales), de los que sus funciones bioquímicas y fisiológicas han sido ampliamente reconocidas; además, recientemente se estableció que los flavonoides son factores que inducen la germinación del polen y la elongación del tubo polínico. Adicionalmente los metabolitos secundarios son responsables de otras funciones importantes como (Dominguez; 1985., Sanabria; 1983., Bulla *et al.*, 2012):

- Pigmentos de las flores que atraen a los insectos polinizadores.
- Compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos (sustancias alelopáticas).
- Protegen a la planta de infecciones (fitoalexinas).
- Defensa contra predadores y patógenos
- Algunos compuestos secundarios tienen importancia fisiológica (los esteroides, constituyentes de las biomembranas, la lignina, polímero natural).
- Funcionan como reguladores del crecimiento (fitohormonas) y almacén de nitrógeno

Industrialmente se emplea en:

- El mercado mundial de plantas medicinales.
- Como agentes quimio-terapéuticos.
- Antibióticos utilizados en patología de plantas.
- Antibióticos usados para aumentar el crecimiento de los animales en veterinaria.
- Antibióticos usados como herramientas en bioquímica en biología molecular.

Análisis Fitoquímico:

Su objetivo es determinar metabolismos secundarios presentes en plantas aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, separación, purificación y determinación estructural.

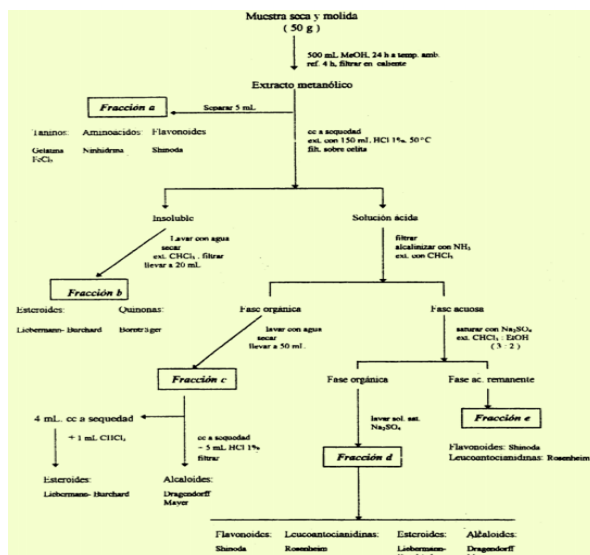


Imagen y protocolo tomado de: Sanabria; 1983.

Parte II. Protocolo para la preparación de los extractos etanólicos secos. (Laboratorio de Bioorganica; 2014. UMNG)

- La metodología utilizada es la maceración etanólica en frío con agitación, en donde se permite la extracción del disolvente en el material vegetal por 48 horas.
- Se procede a filtrar y a disminuir el volumen del disolvente por medio de destilación al vacío utilizando un rotaevaporador.
- Los extractos obtenidos son almacenados en frascos de compota, de introducen en un horno de secado a 40°C, después de secos son almacenados en un lugar fresco y seco lejos de los rayos de la luz que pueden llegar a generar descomposición de metabolitos presentes.



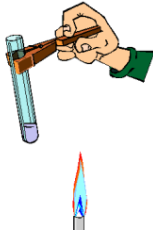
Imágenes tomadas por Andrés Castiblanco.



UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
 DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
 LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTANICA.

PRACTICA DE LABORATORIO No 1.
 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR (AFP).

Introducción.



Cuando la química de los productos naturales se enfoca a los sistemas vivientes, es porque estos productos ya han pasado por algún tipo de análisis, tanto de clasificación como de morfología y algunos estudios etnobotánicos. Si los estudios se canalizan a la química de plantas, trátense de diminutas bacterias, micro y macromycetos (hongos), algas o bien fanerógamas y sus metabolitos, tanto primarios como secundarios, se les considera estudios propios de la fitoquímica. Como ciencia, la fitoquímica estudia la multitud de compuestos químicos que se encuentran en la complejidad de las células vegetales, pero no solo como entidades químicas, sino como productos de una serie de procesos que intervienen en si biogénesis, es decir, estudia el análisis químico aún no agotado y la relación entre la estructura y la acción fisiológica, como lo hace también la bioquímica (Bilbao; 1997).

Objetivo: Presentar un panorama general del análisis cualitativo de las sustancias químicas que se obtienen a partir de las plantas.

Materiales y procedimiento:

- | | |
|---------------------------------|-------------------------|
| 1 codo unión M/M 24/40 | Agua |
| 1 cristizador mediano | Ácido Acético |
| 1 embudo Buchner mediano | Ácido clorhídrico |
| 1 gradilla | Ácido cianhídrico |
| 1 matraz Kitazato de 1 l | Ácido Pírico |
| 1 matraz de 50 ml | Ácido sulfúrico |
| 1 parrilla | Cloroformo |
| 10 pipetas Pasteur | Etanol |
| 2 pipetas de 10 ml | Hidróxido de Sodio |
| 3 pipetas de 5ml | α-naftol |
| Papel indicador | Nitroprusinato de sodio |
| Papel filtro No 1 | Picrato de Sodio |
| 1 refrigerante recto 24/40 | Piridina |
| 1 trampa de vacío | |
| 10 tubos de ensayo | |
| 2 vasos de 250 ml | |
| 1 vaso de precipitado de 100 ml | |

De 50 a 100 g de muestra o material biológico (pueden ser hojas de cualquier planta determinada o algún otro vegetal, corteza, semilla etc.) seco y molido de preferencia. Se extrae por reflujo con alcohol desnaturalizado, aplicado durante una hora. El extracto etanólico obtenido después de filtrar, se concentra por destilación directa en baño María. El residuo semisólido se usa para los siguientes ensayos (Domínguez; 1985).

- a) **Alcaloides:** Una proporción del residuo se disuelve en ácido clorhídrico diluido, se agita y se filtra hasta que el filtrado sea completamente transparente. El filtrado se ensaya con los reactivos para alcaloides: Mayer, Dragendorft, Wagner, Hager y ácido silicotúngstico. Nota: una gota del reactivo es suficiente para cada prueba, comparar contra una estándar (Barba; 1997).
- b) **Saponinas:** Disolver en un tubo de ensayo una porción del residuo etanólico con agua caliente, agitar vigorosamente por algunos minutos. La formación de espuma estable por unos minutos con apariencia de panal de abejas se considera positiva. Otra porción del residuo se ensaya con el reactivo de Rosenthaler: si se añade al extracto una gota del reactivo y una gota de ácido sulfúrico concentrado, las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta (Barba; 1997).
- c) **Triterpenos:** Disolver una porción del residuo con 1 ml de cloroformo, agregar 1 ml de anhídrido acético y dejar resbalar por las paredes del tubo de ensayo. Anadir 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado: la aparición de colores rojo, rosa violeta, verde, purpura o azul en la interfase se considera positiva (Barba; 1997).
- d) **Taninos:** Disolver con agua una porción del residuo, filtrar y tomar alícuotas de 1 ml para las pruebas con agua de bromo, cloruro férrico y con un reactivo de gelatina (Barba; 1997).
- e) **Flavonoides:** Una porción del residuo alcohólico se diluye con etanol y se divide en dos tubos. Una tira de papel filtro se impregna con el extracto diluido y se deja secar a temperatura ambiente, posteriormente se someterá a la acción de vapores de amoníaco (hacerlo en la campana), la aparición de colores amarillo ocre se considera positiva para flavonoides. A un tubo con el extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y se le agregan unas gotas de ácido clorhídrico concentrado (Reactivo de Shinoda). La aparición de colores que van desde el amarillo al rojo azulado, pasando por el anaranjado, se considera positiva. Al otro tubo se le agregan unas gotas de hidróxido de sodio diluido, la aparición de colores amarillo o naranja se considera indicativa para la presencia de flavonoides (Barba; 1997).
- f) **Azúcares:** Diluir una porción del extracto etanólico (aproximadamente 50 ml) con agua y filtrar. Probar con los siguientes reactivos (Barba; 1997):

- Reactivo de Benedict: Tomar 1 ml de la solución problema y agregar 1 ml del reactivo de Benedict. Añadir 2 ml de agua y calentar la mezcla en baño María, acompañándola con un blanco. Anotar el tiempo de reducción o cambio de color.
- Reactivo de Fehling: Tomar una alícuota de 10 ml del extracto diluido y añadir 5 ml de la solución "A" y 5 ml de la solución "B" calentar en baño María haciendo también un blanco. Anotar el tiempo de reducción.
- Reactivo de Molish: Se subliman 5 ml de α -naftol, posteriormente, por las paredes del tubo, se agrega sin agitar 1 ml de ácido sulfúrico. La aparición de un anillo colorido en la interfase de los medios líquidos se considera positiva.

Resultados.

Nombre de la muestra: _____

Cuadro de resultados con los reactivos utilizados para cada uno de los ensayos.

Reactivos usados	ENSAYOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									

Recolección de plantas (muestra biológica).

Vegetal () Otro ()

Fecha de recolección: _____

Municipio o localidad a la cual pertenece: _____

Zona ecológica: _____

Características del suelo: _____

Describa si se conoce el material colectado:

Si () No ()

Nombre común: _____

Nombre científico: _____

Género: _____

Familia: _____

Describa si se colecta toda la planta o parte de ella:

Si es un vegetal desconocido describa sus características _____

Describa si se conserva, se guarda, se deshidrata etc.: _____

Nombre de la persona que llevo a cabo la colección del material biológico:

Número de etiqueta que le corresponde a la muestra: _____

Observaciones adicionales: _____

**SOLICITUD DE SERVICIO DE LABORATORIO.
FITOQUIMICA.**

Área: _____ Practica No _____ Fecha: _____
Título de la práctica: _____
Nombre del estudiante: _____
Nombre del profesor encargado: _____
Nombre del laboratorista: _____

MATERIAL Y EQUIPO	REACTIVOS

Observaciones: _____

Firma del estudiante: _____

Se anexa una forma como la siguiente para complementar la solicitud del material. De esta manera se podrá organizar previamente lo necesario para llevar a cabo las prácticas que se escojan durante el semestre.

Anexo Práctica No: _____

MATERIAL Y EQUIPO	REACTIVOS

BARBA J. (1997) Introducción al análisis de los productos vegetales. Universidad Metropolitana de México.

BILBAO, M. 1997. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad del Quindío, Armenia. Colombia.

BULLA M, CASTRILLON W, GUZMAN A. (2012) Fitoquímica de cinco especies del genero *Baccharis* endémicas del altiplano Cundiboyacense. Facultad de Ciencias y Educación, Departamento de Química. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá.

CRISCI, J.V. (2006) Espejos de nuestra época. Biodiversidad, sistemática y educación. *Gayana Bot.* 63 (1): 106-114.

DOMINGUEZ, X (1985) Experimentos en química organica. Ed. Liimusa. Pp. 41-45. Ciudad de Mexico.

LOCK DE UGAZ O (1994) Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 1-19.

MELGAREJO, L.M., (2010) Experimentos en fisiología vegetal. Laboratorio de bioquímica y fisiología vegetal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

SANABRIA A. (1983) Notas sobre el análisis fitoquímico preliminar de plantas para el laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

VALENCIA C. (2000) Fundamentos de fitoquímica. Universidad Autónoma Nacional de México.



FLAVONOIDES Y CONSTITUYENTES POLIFENOLICOS

UNIDAD 2

TEMAS DE LA UNIDAD:

Flavonoides

Fenoles.

Metabolitos secundarios.

Importancia Biológica.

Existen diferentes estudios serios en diferentes revistas científicas de prestigio que evidencian las bondades de los flavonoides estudiados en relación con la salud. Sin embargo, los 6000 flavonoides identificados tienen diferentes estructuras y por tanto, diferentes efectos y capacidad activa. Aun no se sabe mucho sobre la forma y la capacidad orgánica del ser humano para poder asimilar y utilizar los flavonoides y a pesar de ello ya hay suplementos a la venta.

Para responder: ¿Qué impacto traería para el sistema viviente tener una dieta rica en compuestos de origen vegetal como los flavonoides?



UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTANICA.

GUIA DE TRABAJO No 4.

PARTE I.
TEST DE ENTRADA SOBRE CONCEPTOS DE FLAVONOIDES.

Nombre: _____ Fecha: _____

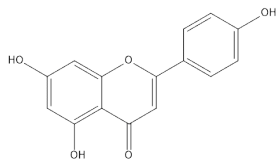
Los flavonoides son un grupo complejo de metabolitos secundarios y son objeto de estudio de la fitoquímica. En este orden de ideas, es un grupo en el cual se encuentran las agliconas, glucósidos y flavonoides sulfatados, esta clasificación general se le atribuye a los compuestos a los que se encuentra unidos.

1. Cuál de los siguientes alimentos NO contiene flavonoides.

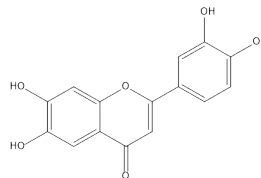


Las siguientes estructuras son ejemplos de pigmentos vegetales denominados agliconas por que se encuentran de forma libre.

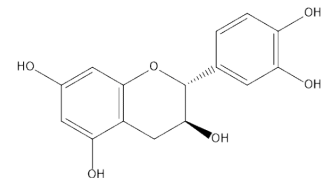
1.



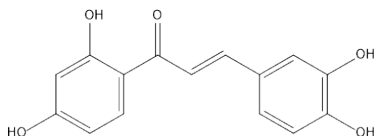
2.



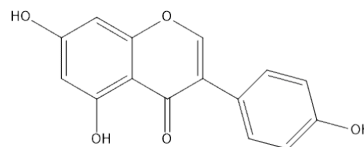
3.



4.



5.



6.

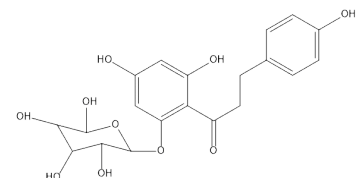
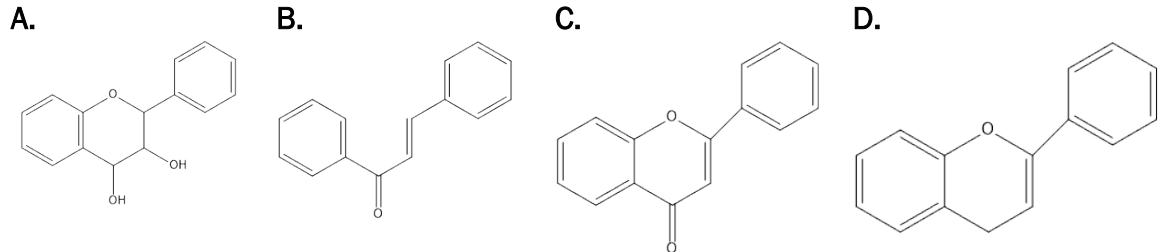


Ilustración 1: Tipos de flavonoides.

2. De acuerdo a lo anterior, el núcleo fundamental que conforma a los flavonoides es:



En los pigmentos naturales se encuentran aproximadamente 10 clases de flavonoides de los cuales hacen parte: Flavonas, Flavononas, Auronas, Chalconas, Flavanonoles, Flavonoles, Leucoantocianidinas, Catequinas, Isoflavonas y Neoflavonas.

3. Teniendo en cuenta que la ilustración 1, se puede inferir que:

- El compuesto 6 es una catequina.
 - Los compuestos 1 y 2 son flavonas.
 - La estructura 3 corresponde a una chalcona.
 - La estructura 2 y 4 son isoflavonas.
4. Muchas veces la presencia de los flavonoides son una respuesta adaptativa de la planta frente a diferentes condiciones de estrés abiótico, según usted, que tipo de estrés desencadenaría la aumento en la biosíntesis de los flavonoides.
- Proteger a los órganos foliares de la intensa radiación ultravioleta.
 - Ser componentes desagradables al gusto de otros herbívoros.
 - Función ecológica en la atracción de polinizadores.
 - Todas las anteriores.
- 5) Los flavonoides aparecieron por primera vez en los ancestros de las embriofitas, que comprenden un grupo monofilético de todas las plantas terrestres (musgos, helechos, angiospermas y gimnospermas), según usted cual fue o fueron la (s) posible (s) causa (s) claves para la transición a la vida terrestre desde el alga verde ancestral.

- 6)



UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTANICA.

GUIA DE TRABAJO No 5.

FLAVONOIDES Y COMPUESTOS AFINES.

Elementos orientadores de: Ciria Valencia Ortiz. Ciudad de México. México; 2000.

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en las plantas cuyas estructuras se derivan del núcleo aromático flavano o 2-fenilbenzopirano. También son compuestos de la serie $C_6 - C_3 - C_6$ por lo que su esqueleto de carbonos consiste en dos grupos C_6 que son anillos de benceno sustituidos por una cadena alifática de tres carbonos (Valencia; 2000).

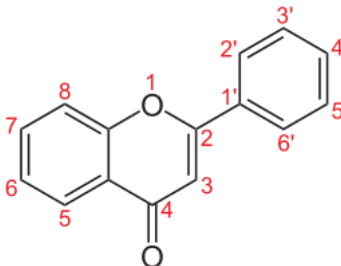


Fig. 01: Esqueleto básico de un flavonoide. Tomado de Domínguez; 1985.

Los flavonoides están frecuentemente en las plantas en forma de glicósidos. Se conocen aproximadamente 750 de estos compuestos, de los que el más simple es la flavona, que se encuentra en la superficie de hojas y tallos de muchas especies de *Primula* en forma de polvo blanco. Los flavonoides se dividen en varias clases, de acuerdo con el nivel de oxidación del anillo central de pirano. Las dos clases más importantes son los flavonoles o 3-hidroxi flavonas (como la quercetina), y las antocianidinas (como la cianidina). Al ir del anillo más reducido al más oxidado, se tienen las siguientes clases de flavonoides (Fig. 02) (Valencia; 2000).

Los flavonoides a diferencia de los alcaloides, son un grupo relativamente uniforme en sus estructuras, aunque a veces hay derivados más complejos como las flavonas sustituidas por alcaloides o terpenoides.

Biosíntesis.

Los flavonoides están relacionados biosintéticamente con los aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina, vía los correspondientes ácidos cinámicos. Por experimentos con átomos marcados, se ha establecido que el anillo B se forma a partir del ácido Shikímico. El anillo A se forma por la unión cabeza-cola de tres moléculas de acetato. La cadena alifática de tres carbonos probablemente se añade al anillo B para reducir el compuesto $C_6 - C_3$ antes de que se forme el anillo A. Se presume que todos los

anillos aromáticos que tienen grupos hidroxilo en la posición orto, tienen como precursor al anillo Shikímico, mientras que los anillos aromáticos con grupos hidroxilo meta, vienen del acetato. Tales compuestos $C_6 - C_3$ como la fenilalanina, el ácido cinámico y el ácido ferúlico son los que forman la porción C_6 (B) - C_3 de los flavonoides. La acumulación de derivados del ácido p-cumárico justo antes de la formación de las antocianinas, sugiere que este ácido también es un precursor de dichos pigmentos. Se ha observado que el ácido Shikímico puede formar flavonoides sin la participación de aminoácidos o ácidos cinámicos (Swain *et al.*, 1962).

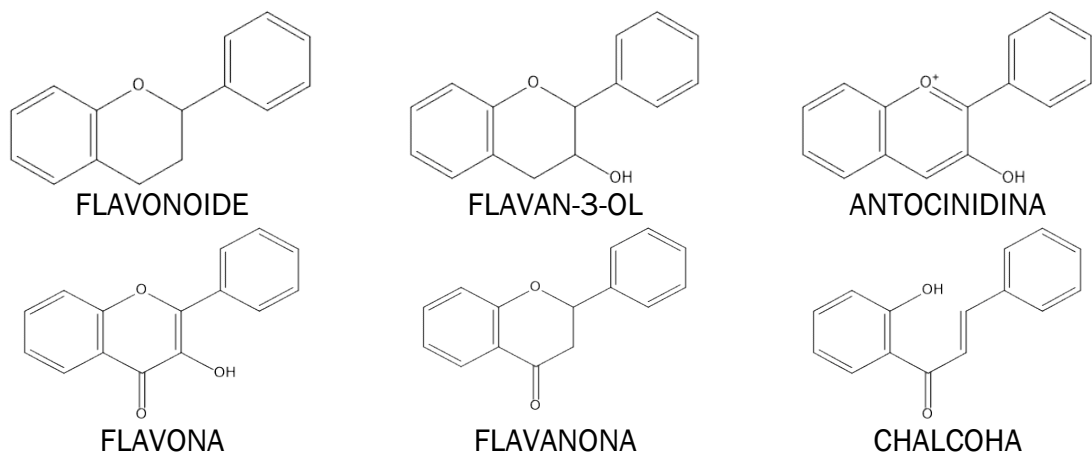


Fig. 2: Flavonoides más usuales. Tomado de Valencia; 2000)

Probablemente el primer compuesto serie $C_6 - C_3 - C_6$ formado, fue una flavona. La interconversión chalcona-flavona quizás se produce enzimáticamente in vivo, pero debido a la rápida interconversión de chalconas y flavonas, no se ha podido determinar si las chalconas son intermediarios entre las flavononas y otras clases de flavonoides. La dehidrogenación directa de una flavona puede dar la correspondiente flavona; las chalconas parecen ser precursores directos de las auronas, y sea directa o indirectamente pueden serlo también de otros flavonoides. Se ha observado que en una especie dada, los diferentes flavonoides tienen el mismo patrón de dehidrogenación en el anillo, diferenciándose en el C_3 que puede estar metilado o glicosilado. Tal observación sugiere, que hay un intermediario C_{15} común que se convierte en los diferentes flavonoides después que se ha establecido el patrón de hidroxilación en el anillo.

Propiedades de los flavonoides.

Los flavonoides, por ser fenólicos, pueden cambiar de color cuando se tratan con bases o con amoníaco, propiedad que sirve para caracterizarlos sobre los cromatogramas o en solución. Contienen sistemas aromáticos conjugados, por lo que muestran bandas de absorción ultravioleta en el espectro. En las plantas están generalmente en forma de glicósidos; un aglicón flavonoide puede encontrarse en una misma planta en varias combinaciones glicosídicas, por esta razón, cuando se investigan los flavonoides de una

planta, es mejor buscar los aglicones presentes en el extracto hidrolizado, que en el extracto original porque en este puede haber varios glicósidos con un aglicón común (Ortiz; 1995).

La principal función de los flavonoides que se encuentran como pigmentos en las flores y en los frutos, como se ha establecido desde la época de Darwin, es la de atraer insectos y animales con propósito de polinización y dispersión de semillas (Ortiz; 1995).

Debido a sus muchos grupos hidroxilos, los flavonoides se unen fácilmente a la superficie de las enzimas, por lo que sus potentes inhibidores de algunos sistemas enzimáticos, por ello, la presencia de flavonoides en los extractos de plantas, a menudo se hace que el aislamiento de las enzimas sea muy difícil. La posibilidad de que los flavonoides actúen como reguladores del crecimiento en las plantas es debido a su efecto sobre el sistema enzimático ácido indolacético ([IAA]- Indol acético oxidasa), ha sido investigada principalmente por Galston (1969). Estos estudios se han llevado a cabo en plantas de chícharo, en donde las hojas, tallos y otros órganos, contienen cantidades relativamente grandes de quercetina y kaempferol estimulan la IAA oxidasa; son enzimas cofactores y por lo tanto aumentan la destrucción de IAA, al disminuir la velocidad de crecimiento. En cambio la quercetina debido a su núcleo de catecol fácilmente oxidable, tiene una acción leve sobre la IAA y es preferencialmente oxidada por la enzima, cuya acción sobre la IAA se inhibe. Estudios in vitro han demostrado que el crecimiento en las plantas de chícharo bajo diversas condiciones fisiológicas (concentraciones relativas de kaempferol a quercetina) están relacionadas con la actividad de crecimiento (Ortiz; 1995).

Se cree que algunos de los flavonoides tienen una función protectora y le confieren a las plantas que los contienen resistencia contra enfermedades como el caso del isoflavonoide pisintina de *Pisum sativum*, que se indica que es el una fitoalexina de las legumbres. La presencia de los flavonoides también tiene importancia por su distribución taxonómica, pueden ser marcadores químicos en los estudios biosintéticos en las plantas superiores (Ortiz; 1995).

Variación estructural.

Aunque se han aislado cerca de 150 aglicones flavonoides diferentes de las plantas, solamente 11 de ellos son los más comunes. En su estructura se observa que su patrón de hidroxilación básica es similar, y que solo difieren en los grupos hidroxilos unidos al anillo B. Uno de los grupos más importantes derivados del flavano está constituido por los antocianos o antocianinas, glicósidos que forman parte de los pigmentos rojos y azules de las flores y los frutos; sus aglicones, las antocianidinas, se dividen en tres grupos, la pelargonidina, cianidina y delfinidina representados en las ilustraciones 3, 4 y 5.

Cada una de estas antocianidinas da origen a diversos glicósidos, según la clase y el número de polisacáridos que se combinan con ellos y según la posición que estos ocupen en la molécula. En el caso de las antocianidinas, el número de hidroxilos del anillo B está relacionado con el color, así, la pelargonidina que tiene un solo hidroxilo, es de color escarlata, la cianidina que con los dos hidroxilos, es carmesí y la delfinidina, con tres hidroxilos, es lila o malva. Estas tres antocianidinas junto con los tres derivados metiléteres, la peonidina, petunidina y malvadina, están muy distribuidos en las plantas, y son abundantes en las flores y en los frutos (Ortiz; 1995).

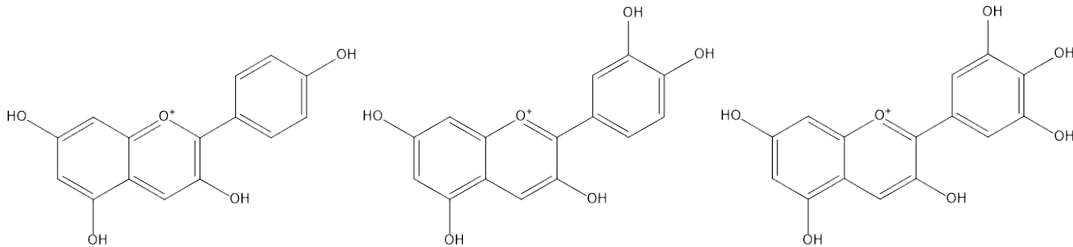


Fig 3: Pelargonidina

Fig 4: Cianidina

Fig 5: Delfinidina

Una propiedad característica de los antocianos y antocianidinas es que pueden formar sales gracias a la basicidad de un átomo de oxígeno tetravalente (sales de oxonio). Los flavonoides correspondientes a los tres tipos principales de antocianidinas son el Kaempferol, la quercetina y la miricetina, y a menudo se encuentran en las plantas junto con las antocianidinas. Estos flavonoides generalmente son incoloros al pH de las células vivas, y no contribuyen significativamente al color que presentan las flores, encontrándose también con mucha frecuencia en las hojas. En el estudio efectuado con las hojas de 1000 especies diferentes de plantas, se halló que el 48% de ellas contenían kaempferol, 56% quercetina y 10% miricetina (Swain; 1962) Figs. 06, 07 y 08.

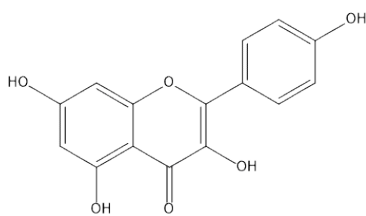


Fig. 6: Kaempferol

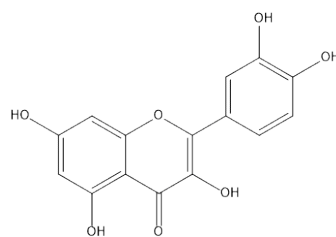


Fig. 7: Quercetina

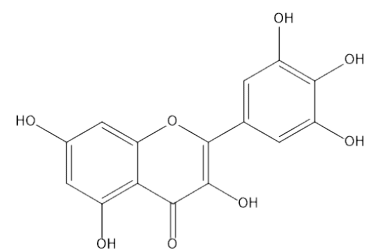


Fig. 8: Miricetina

Las soluciones alcalinas de los flavonoles, a diferencia de las flavonas se oxidan lentamente en el aire. La mayoría de los glucósidos y galactósidos flavónicos simples, se hidrolizan rápidamente por medio de la emulsina- β -glucosidasa, en cambio, las antocianinas como la cianidina-3-glucósido, requieren de la enzima específica antocianasa por su hidrolisis. Casi todos los flavonoides forman O-glicósidos, se conocen

pocos C-glicósidos; el mejor ejemplo es la apigenina-8-C-glucósido o vitexina que se aisló de la madera de *Vitex lucens* (Fig 08):



→
V. lucens de la cual
se aisló el glucósido
Vitexina

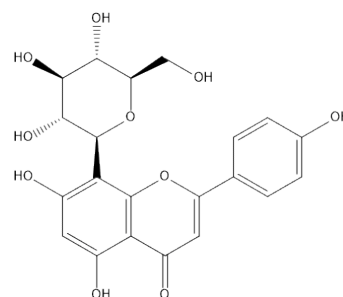
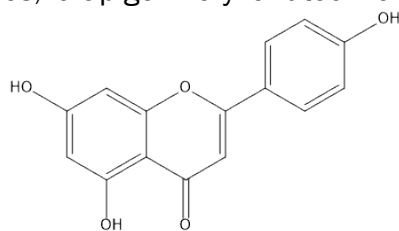


Imagen tomada de: <http://www.terrain.net.nz/friends-of-te-henui-group/table-1/puriri.html>. Estructura del glicosido Vitexina tomada de: Valencia; 1995.

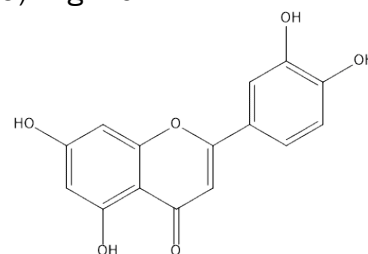
La nomenclatura de los glicósidos flavónicos es confusa, porque muchos de los nombres asignados son triviales, y tienen poca relación con sus estructuras algunos nombres que se derivan del aglicón, pero aun así, son inconsistentes. La quercetina-3-ramnósido es la quercetina, mientras que la quercetina-3-glucósido, que no es un isómero, se le llama isoquercetina en publicaciones recientes se suele indicar que la posición del azúcar para nombrar los nuevos glicósidos; sin embargo, algunos nombres triviales no han podido eliminarse, como por ejemplo el nombre de la rutina, que es el principio activo de las hojas de *Ruta graveolens* y que aún se utiliza en lugar de decir quercetina-3-rutinósido es el más conocido y quizás el glicósido flavónico más ampliamente distribuido (Valencia; 1995).

Flavonas.

Las flavonas se encuentran en plantas que pertenecen a las familias herbáceas como las Umbelíferaceae, Lamiaceae y Asteraceae a diferencia de los flavonoles que son más abundantes en las angiospermas leñosas. En las flavonas falta el grupo 3-hidroxipresente en los flavonoles y en las antocianidinas, y solamente hay dos estructuras comunes, la apigenina y la luteolina (Valencia; 1995). Fig. 10.



Apigenina.



Luteolina



Fig 10: De las familias Umbelíferas, Asteráceas y Lamiáceas se derivan las dos flavonas: Apigenina y Luteolina que son ampliamente comunes en estas mismas.

Chalconas y Auronas.

Las chalconas no son flavonoides en un sentido estricto, puesto que tienen una estructura de cadena abierta y hasta una numeración diferente de la de los otros flavonoides, se han clasificado entre los flavonoides en razón de que, por tratamiento con ácidos, se someten a una isomerización dando flavonas y también, porque se les considera que son los precursores inmediatos de los flavonoides (Valencia; 1995).

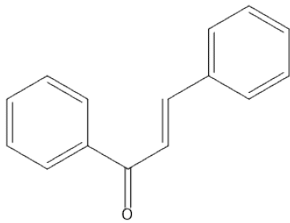


Fig. 11: Esqueleto principal de una chalcona.

Las chalconas y las auronas no son muy frecuentes en las plantas; la buteína, una chalcona común, se encuentra en un estado libre en la médula de la acacia como 4-glucosido en los pétalos de *Coreopsis gigantea* (Fig. 12). El patrón de oxidación contiene un hidroxilo que generalmente se encuentra en posición 2 y que corresponde al oxígeno del anillo del pirano en los otros flavonoides. La conversión de las chalconas a flavononas se lleva a cabo rápidamente en las soluciones ácidas y la reacción es reversible en medio alcalino.

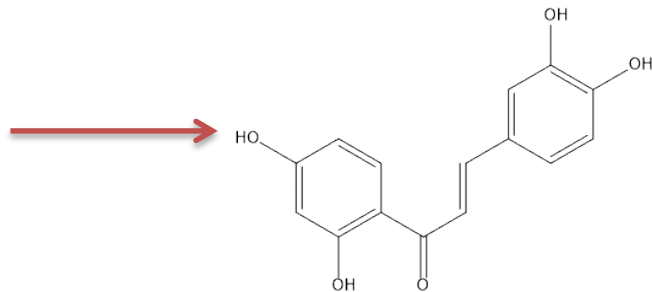


Fig. 12: *Coreopsis gigantea* de la cual se extrajo la buteína una chalcona. Imagen tomada de: <http://repository.tamu.edu/handle/1969.1/107565?show=full>. Estructura tomada de Ortiz; 1995.

Esta reacción puede notarse fácilmente porque las chalconas son mucho más coloridas que las flavononas, especialmente en soluciones básicas donde son de color naranja-rojo. En la hidrólisis ácida de glicósidos de chalconas, se obtiene un aglicón flavanónico como un artefacto (producto que se formó durante la reacción) en lugar de la chalcona. Uno de los compuestos más interesantes de este tipo es la floridzina, es el glucósido de la dihidrochalcona floretina que causa glucosuria en los animales. La floridzina también tiene un efecto sobre el crecimiento de las plantas, sobre todo en los manzanos, y su presencia está limitada a las plantas del género *Malus*. (Valencia; 1995). (Fig. 13)

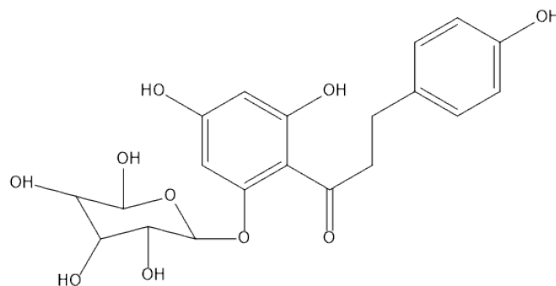


Fig.13 *Malus sp.* Especie rica en Floridzina, un flavonoide. Imagen tomada de <http://www.botanical-online.com/flormalusdomestica.htm> estructura de la floridzina tomada de: Valencia; 1995

Las auronas se forman por oxidación enzimática o aérea de las chalconas; su nombre proviene del griego *auros*, dorado. Tanto las chalconas como las auronas se encuentran casi en todas las flores amarillas y se detectan por medio de vapores alcalinos de los cigarrillos, porque se vuelven naranjas o rojas. El sistema de anillos que tienen las auronas se conoce como benzalcumaranona. Se conocen solamente cinco aglicones que poseen el patrón de hidroxilación de los otros flavonoides, como por ejemplo la sulfuretina que está en las flores amarillas de varias especies del género *Cosmos* y la leptosina que está en la planta del género *Coreopsis* (Valencia; 1995).

Flavonas y dihidroflavonoles.

Estas sustancias incoloras son productos de la reducción de las flavonas y los flavonoles, respectivamente, y como las chalconas, son posibles precursores de los flavonoides más oxidados. Las dos flavonas, el eriodictol y la naringenina, corresponden en estructura a la luteolina y apigenina, y es común hallarlas en las plantas (Ortiz; 1995).

Desde el punto de vista económico, la flavanona más importante es la naringina ya que es una sustancia tan amarga como la quinina y es el principio vital del sabor amargo de muchos frutos cítricos. Otros cambios en la estructura como la apertura del anillo y reducción, producen compuestos dulces como la dihidrochalcona neohesperidósido que es 2000 veces más dulce que la sacarosa. En cambio, los dihidroflavonoles no tienen interés por su sabor, a pesar de estar muy distribuidos en la naturaleza, como la

dihidroquercetina, que es un constituyente de la médula de muchos árboles particularmente de las gimnospermas y de las flores de *Petunia* (Ortiz; 1995).

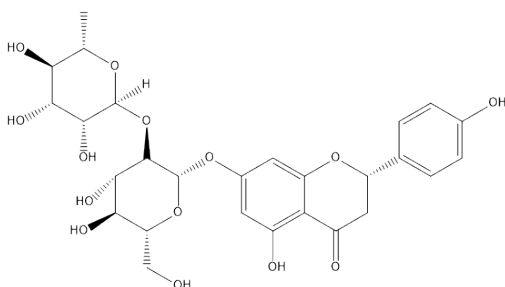


Fig. 14. Naringina un flavonoide ampliamente distribuido en los frutos cítricos Imagen tomada de <http://lapagina17.blogspot.com/2014/03/cinco-cuartos-de-naranja-joanne-harris.html>. Estructura de la naringina tomada de Valencia; 1995.

Aislamiento y determinación estructural.

La mayoría de los flavonoides son solubles en agua, se aíslan de los tejidos frescos por extracción con alcohol caliente, o de material seco con alcohol acuoso caliente; los pocos flavonoides que son liposolubles requieren un tratamiento especial.

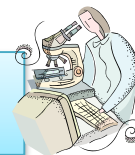
Después de los extractos alcohólicos se han lavado para quitarles clorofilas y gomas, se concentran y los flavonoides se separan por cristalización o cromatografía. Las antocianinas, probablemente presentes en las células como cationes, o asociadas con cationes de ácidos orgánicos, son inestables a pH neutro o alcalino, y se aíslan como cloruros mediante extracción con alcohol etílico o metanol o ácido clorhídrico (Valencia; 1995).

Una ventaja de los flavonoides es que pueden detectarse rápidamente en cromatogramas sin usar reactivos cromógenos. Muchos son coloridos (antocianinas, chalconas) y los que no lo son, pueden verse por medio de la luz ultravioleta que dan manchas moradas, cafés, verdes o amarillas. Además muchos cambian de color cuando se tratan con amoníaco, color que es reversible. Por ello, tal vez la técnica cromatográfica más usada para separarlos y purificarlos es la cromatografía en papel. La partición cromatográfica se lleva a cabo mediante solventes como butanol, ácido acético, agua (4:1:5 capa superior) mientras que la adsorción cromatográfica se hace en papel con disolventes acuosos (agua sola o con cantidades variables de ácido acético). También se emplea la cromatografía en capa fina, para lo cual el mejor adsorbente es la celulosa, ya que en ella se obtienen separaciones similares a las obtenidas en la cromatografía en papel (Valencia; 1995).

Otros adsorbentes que se emplean en la cromatografía en capa fina son la sílica gel, que se usa para flavonoides metilados e isoflavonas, y la poliamida, utilizada para los glicósidos flavónicos. La espectroscopia ultravioleta es útil sobre todo si se emplean sales inorgánicas; las flavonas, según sea el número de la posición de los hidroxilos y

otros sustituyentes, tienen cambios característicos con cloruro de aluminio, acetato de sodio, álcali y ácido bórico.

Me aproximo al conocimiento biológico desde la fitoquímica: ¿Dónde queda el papel de los flavonoides en las interacciones biológicas?



Relación entre la estructura y la función.

La razón por la que las plantas acumulan constituyentes flavonoides en altas concentraciones en sus hojas y flores no es bien conocida, pero debido a que estos compuestos no están involucrados en el metabolismo primario, es probable que su papel principal sea biológico, sobre todo en la relación con los insectos y animales que polinizan o se alimentan de las plantas (Valencia; 1995).

Debido a su color, algunos flavonoides proporcionan a la planta medio para atraer insectos, que como las mariposas y abejas, posibilitan la polinización; otros, los que tienen sabor amargo, le dan a la planta los medios para repeler a los animales, como pasa con los escarabajos que se alimentan de hojas. Desde el punto de vista de la evolución, las plantas pueden desarrollar la capacidad de sintetizar un determinado color para sus flores por diferentes rutas, así, la pigmentación amarilla puede ser un carotenoide o flavonoide y similarmente, el sabor amargo puede obtenerse de diversos constituyentes secundarios no relacionados como las cucurbitacinas derivadas de terpenos, alcaloides como la quitina o flavonas como la naringina. Tales factores explican la distribución aparentemente esporádica de algunos flavonoides como las flavanonas y la distribución uniforme de otros compuestos como las antocianinas (Valencia; 1995).

Las características estructurales de los flavonoides que se conocen y que tienen una función importante son:

- La presencia de un sistema resonante conjugado y extendido a menudo con un carbonilo cromóforo.
- Presencia de grupos hidroxilo aromáticos.
- Forma molecular.

La primera característica significa que muchos flavonoides son coloridos y, que también son pigmentos importantes de las plantas. La presencia de grupos hidroxilo aromáticos y el hecho de que los flavonoides puedan dividirse en dos grupos, depende si el anillo B está sustituido en un grupo 4' hidroxilo o 3' 4' -dihidroxi, lo que significa que los flavonoides son capaces de inhibir o estimular ciertos sistemas enzimáticos. La forma molecular es importante en particular tratándose de los isoflavonoides, porque su actividad fisiológica puede ser tomada en cuenta por su semejanza en estructura a las hormonas animales (Valencia; 1995).

Otras funciones:

Protección ante la radiación UV: Los flavonoides incoloros suelen acumularse en las capas más superficiales de las hojas de la planta y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos (Alberch *et al.* 1999).

Defensa ante el herbivorismo: Algunos flavonoides como los taninos, protegen a las plantas generando sabores desagradables para los herbívoros, principalmente amargos, o texturas que no pueden ser agradables a estos, que se ven estimulados a elegir otras plantas (Pelazon *et al.* 1999).

Regulación del transporte de la auxina: Las plantas que son mutantes, que no poseen la hormona chalcona sintasa, que forma parte de la vía biosintética de los flavonoides, muestran un crecimiento irregular debido a una deficiencia en el transporte de la auxina a través de la planta. Probablemente esa deficiencia se deba a la ausencia de ese flavonoide en la planta mutante (Graf *et al.*; 2012).

Atracción de animales polinizadores: Muchos flavonoides son componentes de los pigmentos de las flores y de las hojas y les confieren coloraciones atrayentes a insectos como se mencionó anteriormente, con lo que la función de muchos flavonoides sería la de atraer polinizadores hacia las flores, un caso muy destacado, es el de algunas bromeliáceas entre las que se encuentran las especies de los géneros *Tillandsia* y *Billbergia* que desarrollan sus flores sobre un tallo que se elonga sobre una base de hojas en roseta. El tallo elongado está formado por una serie de brácteas que presentan un color muy rojizo muy fuertes antes o durante la polinización y luego se hacen más verdes (Principios activos de plantas medicinales. On line).



Imagen tomada de [#mediaviewer/File:Tillandsia_aeranthos.jpg](http://es.wikipedia.org/wiki/Flavonoide)

Atracción de presas: Las plantas insectívoras de los géneros *Drosera* y *Dionaea* poseen antocianinas en sus flores y hojas, que cumplen la función de atracción de insectos que les posibilitará alimento (Valencia; 1995).

Inducción de la nodulación por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno: Se ha observado que el eriodictiol y la apigenina-7-o-glucosido exudados de la raíz del guisante *Pisum sativum* inducen la nodulación de la bacteria *Rhizobium leguminosarum*. Se ha visto también, que los isoflavonoides encontrados en el exudado de las hojas de soja, la daidzeína y la genisteína son inductores de los genes de la nodulación de varias cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (Valencia; 1995).

Protección contra hongos: La Pisantina es un isoflavonoide producido por el guisante en respuesta a la infección por hongos e induce a la expresión del gen PDA1 en estos. La Pisantina y el eriodictiol inducen a la germinación de las esporas de ciertos hongos (Valencia; 1995).



Fig 15. En la imagen derecha se observa la fijación del nitrógeno en las raíces de *Pisum sativum* por parte de la agrobacteria *Rhizobium leguminosarum*. En la imagen izquierda se observa la atracción de insectos por parte de *Dionaea muscipula*.

Relación Ciencia, Tecnología sociedad: Los flavonoides en el mejoramiento de la salud humana.



Los flavonoides consumidos por el hombre le protegen del daño de los oxidantes, como los rayos UV (cuya cantidad aumenta en verano); la polución ambiental (minerales tóxicos como el plomo y el mercurio); algunas sustancias químicas presentes en los alimentos (colorantes, conservantes, etc.) Como el organismo humano no tiene la capacidad de sintetizar estas sustancias químicas, las obtiene enteramente de los alimentos que ingiere.

No son considerados vitaminas (Hertog *et al.* 1995).

Al limitar la acción de los radicales libres (que son oxidantes), los flavonoides reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, evitan las tufaradas de calor en la menopausia (bochornos) y combaten otros síntomas (Hertog *et al.* 1995).

En general el sabor es amargo, llegando incluso a provocar sensaciones de astringencia si la concentración de taninos condensados es muy alta. El sabor puede variar dependiendo de las sustituciones presentadas en el esqueleto llegando incluso a usarse como edulcorantes cientos de veces más dulces que la glucosa.

Sus efectos en los humanos pueden clasificarse en:

Propiedades anticancerosas: muchos han demostrado ser tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas. Se ha probado contra el cáncer de hígado.

Propiedades cardiotónicas: tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina. Los flavonoides disminuyen el riesgo de enfermedades cardíacas.

Fragilidad capilar: mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Los flavonoides con mejores resultados en este campo son la hesperidina, la rutina y la quercetina.

Propiedades antitrombóticas: la capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.

Disminución del colesterol: poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos.

Protección del hígado: algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado. Fue probado en laboratorio que la silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis. Junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.

Protección del estómago: ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.

Antiinflamatorios y analgésicos: la hesperidina por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se ha utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides.

Antimicrobianos: isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.

Propiedades antioxidantes: En las plantas los flavonoides actúan como antioxidantes, especialmente las catequinas del té verde. Durante años se estudió su efecto en el hombre, y recientemente (5 de marzo del 2007) se ha concluido que tienen un efecto mínimo o nulo en el organismo humano como antioxidantes.

PARTE II CARACTERIZACION QUIMICA DE ALGUNOS FLAVONOIDES.

En el siguiente apartado el estudiante tiene que identificar la estructura de los 6 flavonoides presentes a partir del núcleo básico adicionándole el respectivo nombre.

Diagram illustrating the identification of six flavonoid structures based on the basic flavone skeleton (centered structure) and their respective substituents. The structures are arranged in a circular pattern around the central skeleton, with arrows indicating the relationship between the central structure and the derivatives.

The central structure is the basic flavone skeleton, numbered 1 through 8 and 1' through 6'.

The six structures to be identified are:

- Structure 1: Flavone with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a catechol group at position 2'.
- Structure 2: Flavone with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a p-coumaroyl group at position 2'.
- Structure 3: Flavone with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a p-coumaroyl group at position 2', with a glucose molecule attached to the 3' position.
- Structure 4: Flavone with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a p-coumaroyl group at position 2'.
- Structure 5: Flavone with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a p-coumaroyl group at position 2'.
- Structure 6: Flavone with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a p-coumaroyl group at position 2'.

PARTE III.

Escoja una de las estructuras químicas del diagrama anterior y caracterícela de acuerdo a los siguientes parámetros: Generalidades, funcionalidad, utilidad, ecológica, a nivel salud e industrial. Prepare una presentación no más de 15 minutos para socializar

**UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA BOTANICA.**

GUIA DE TRABAJO No 6.

PARTE I: ACTIVIDAD DE SOCIALIZACION.

Realizar una socialización ante el grupo para mostrar el desarrollo de la parte III de la guía de trabajo No 5.

PARTE II:

Construya un folleto de divulgación para el Departamento de Biología en el que responda a las siguientes preguntas: ¿El consumo de flavonoides afecta la salud humana? ¿Hacen parte de nuestra dieta? Justifique su respuesta. Responda la pregunta a partir de la siguiente lectura además de la búsqueda bibliográfica que usted crea pertinente

Lectura: SANTOS, C (2012) Implicaciones en la salud de los polifenóles en la dieta. V Congreso Internacional de Alimentación, Nutrición y Dietética. Universidad de Salamanca, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Miguel de Unamuno- Salamanca. España.

Link del artículo:

http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Santos.pdf

Ver en anexo la lectura.

LABORATORIO DE CIENCIAS NATURALES



**UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.
LINEA DE INVESTIGACION ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE DE LA
BOTANICA.**

PRACTICA DE LABORATORIO No 2.

**ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE FENOLES Y FLAVONOIDES EN EXTRACTOS
ETANOLICOS DE *C. funkianus*.**

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en las plantas cuyas estructuras se derivan del núcleo aromático flavano o 2-fenilbenzopirano. También son compuestos de la serie $C_6 - C_3 - C_6$ por lo que su esqueleto de carbonos consiste en dos grupos C_6 que son anillos de benceno sustituidos por una cadena alifática de tres carbonos.

Los flavonoides están frecuentemente en las plantas en forma de glicósidos. Se conocen aproximadamente 750 de estos compuestos, de los que el más simple es la flavona, que se encuentra en la superficie de hojas y tallos de muchas especies de *Primula* en forma de polvo blanco. Los flavonoides se dividen en varias clases, de acuerdo con el nivel de oxidación del anillo central de pirano. Las dos clases más importantes son los flavonoles o 3-hidroxi flavonas (como la quercetina), y las antocianidinas (como la cianidina). Al ir del anillo más reducido al más oxidado, se tienen las siguientes clases de flavonoides

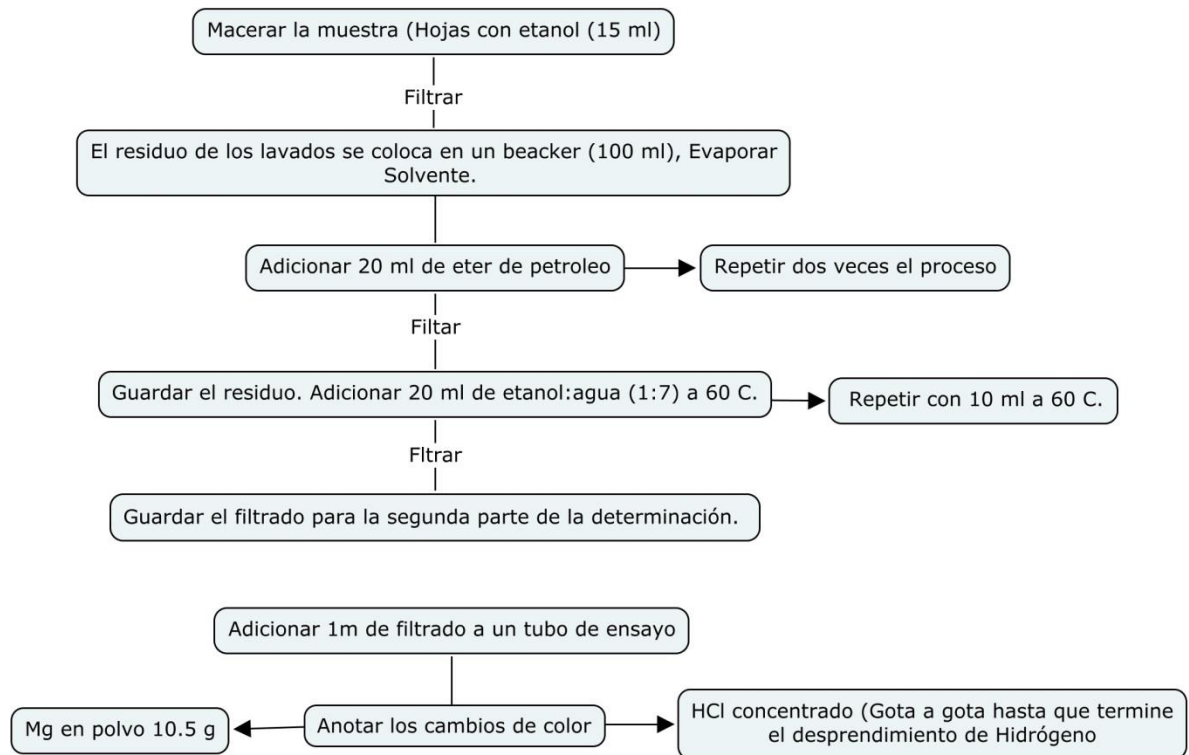
Materiales para Análisis Fitoquímico Preliminar para Flavonoides:

2 Becker de 400 ml	Etanol 1000 ml
6 Becker de 50 y 100 ml	Etanol; agua (1:7) 200 ml
1 Mortero con Pistilo	Éter de Petróleo (20 ml)
1 Probeta de 100 ml	HCL 5 ml
1 Gradilla	Mg en polvo 0.1 g.
12 tubos de ensayo	
3 goteros	
2 Pipetas de 1-5 ml	
1 pinzas para tubo de ensayo	
1 Termómetro	
1 Escobilla	
1 embudo de decantación de 250 ml	
1 embudo de filtración	
1 plancha de calentamiento	

Materiales para prueba de fenoles y flavonoides.

30 Celdas de espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico.	Etanol 1000 ml
Micropipetas de 10 – 100 – 1000 µl	Tricloruro de Aluminio 500 ml
Espectrofotómetro	Acetato de sodio 500ml
	Reactivo de Folin Ciocalteau 1000 ml
	Carbonato de Sodio al 7.35% 1000 ml

Parte 1: MARCHA FITOQUIMICA PARA FLAVONOIDES.



1. Explique ¿para que se hacen varios lavados con éter de petróleo y luego con una solución de etanol: agua (7:1) a 60°C?

Parte 2.

PROTOCOLO DE EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES TOTALES Y ANTOCIANINAS.

Elaboración de una Curva de Calibración para Flavonoides.

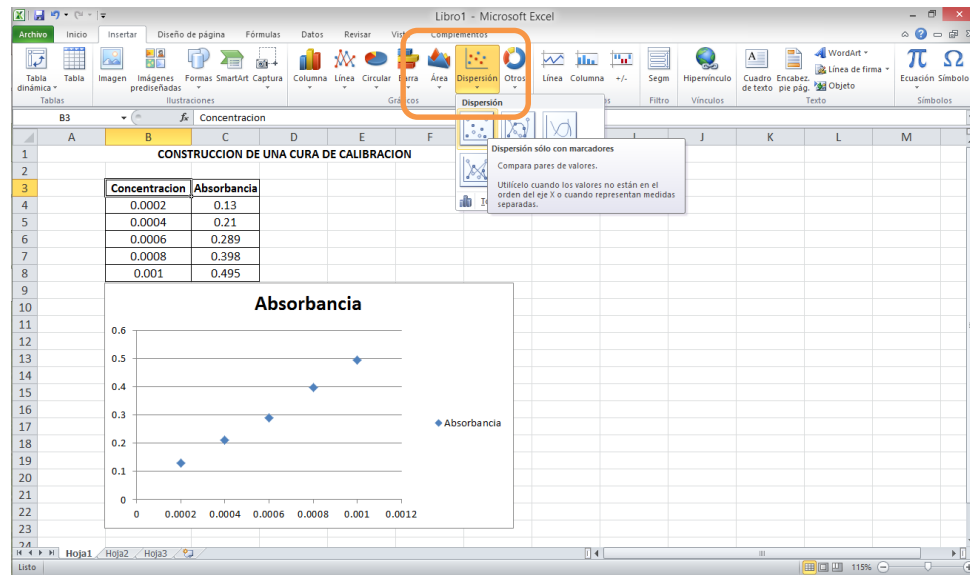
Pesar 2.7 mg de quercetina en un balón de aforo de 10 ml y llevar a volumen de 10 ml con etanol al 80% (Solución madre).

En 4 balones aforados de 10 ml colocar 700 μ l, 300 μ l, 175 μ l y 100 μ l de la solución madre, añadir 200 μ l de acetato de potasio 1M y 200 μ l de nitrato de aluminio al 10% a cada balón y aforar finalmente con etanol al 80%. HACER CADA SIEMBRA POR TRIPLICADO (Al final por cada concentración deben salir 9 celdas con su respectiva medición) Esto nos permite obtener cuatro soluciones de trabajo para la construcción de la curva con concentraciones de 18.9%, 9.45%, 4.725 y 2,7% de quercetina.

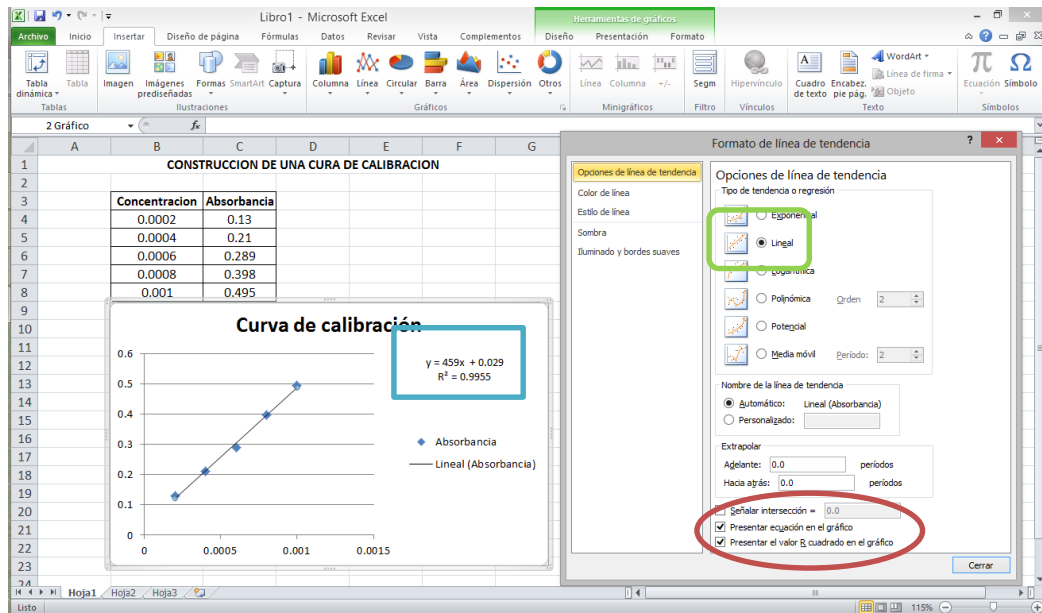
Cuando realizamos una curva de calibración se debe realizar la regresión lineal de los datos, para esto, primero se crea la tabla con los datos en Excel. Se anota los valores de las concentraciones que previamente se han calculado luego los valores de la absorbancia que nos entrega el espectrofotómetro al leer cada celda.

Concentracion	Absorbancia
0.0002	0.13
0.0004	0.21
0.0006	0.289
0.0008	0.398
0.001	0.495

Una vez ingresados los datos se procede a seleccionar la tabla y la construcción de la curva de calibración sin olvidar colocar el nombre al gráfico y a los ejes.(X: Concentración, Y: Absorbancia)



Finalmente, se posiciona el puntero sobre uno de los puntos del gráfico, clic derecho, agregar línea de tendencia lineal. Señalar (presentar la ecuación en el gráfico y Presentar el valor R cuadrado en el gráfico).



Como se puede evidenciar, ahora se tiene la ecuación de la línea recta que predice los valores de concentración a partir de los valores de absorbancia la pendiente m es igual a 459, el intercepto $[n] = 0.029$. R^2 corresponde al coeficiente de la regresión al cuadrado, este debe ser menos a 0.99.

La pendiente corresponde al coeficiente de extinción por el ancho que recorre la luz en la solución.

$m = \epsilon \cdot I$ donde ϵ es el coeficiente de extinción, en este caso la concentración e I es el ancho de la solución por la cual atraviesa la luz, en este caso 1cm.

Reacción con $AlCl_3$ para Flavonoides.

Una vez obtenida la disolución apropiada, tomar una alícuota (de cada disolución apropiada) de 50 μ l y colocarla en una celda de espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico. HACER ESTO POR TRIPLICADO.

Colocar 1650 μ l de etanol, 150 μ l de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) y 150 μ l de Acetato de sodio (0.1M).

Se agita hasta que toda la disolución quede azul o amarilla evitando la formación de precipitados y se deja en oscuridad durante 40 minutos. Leer absorbancia a 420 nm para flavonoides y 590 nm para antocianinas.

La absorbancia del producto de reacción del complejo con $AlCl_3$ debe caer en el rango de [0.8 y 0.008] unidades de absorbancia. Si no, se debe hacer otra vez la reacción, con una dilución de la disolución menor o mayor dependiendo del caso.

Extrapolar a una curva de calibración previamente estandarizada en función de la concentración del ácido quercetina (Flavonoides) y de Cianidin-3-glucosido (Antocianinas) como patrones respectivos.

PREPARACION DE REACTIVOS.

Disolución de $AlCl_3$ al 10%: Pesar 1g de $AlCl_3$ anhidro en un vaso de 10ml, agregar 5ml de etanol y agitar hasta disolver todo el cloruro de aluminio. Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 10ml y completar a volumen con etanol. Esta disolución se establece durante 1-2 semanas si se mantiene refrigerada.

Dilución de acetato de sodio 0.1M: Para 500ml de esta disolución, pesar 6.84g de acetato de sodio trihidratado, disolverlos en un vaso de 400ml con 150ml de agua destilada, transferirlos cualitativamente a un matraz de 500ml y completar a volumen

ALBRECHT H, JI YODER, DA PHILLIPS. 1999. "Flavonoids Promote Haustoria Formation in the Root Parasite *Triphysaria versicolor*" *Plant Physiology* 119: 585-591

BARBA J. (1997) Introducción al análisis de los productos vegetales. Universidad Metropolitana de México.

BILBAO, M. 1997. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad del Quindío, Armenia. Colombia.

DOMINGUEZ, X (1985) Experimentos en química orgánica. Ed. Liimusa. Pp. 41-45. Ciudad de México.

GRAF BA, MILBURY PE, BLUMBERG, JB: "Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence." *J Med Food* 8: 281-290

HERTOG ET AL. 1995. "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study". *Archives of Internal Medicine* Vol. 155 No. 4.

KIMURA Y., T. AOKI, S. AYAE. 2001. "Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids". *Plant Cell Physiol* 42: 1169-1173.

LOCK DE UGAZ O (1994) Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 1-19.

ORTIZ, C (1995) Introducción al análisis de los productos naturales. Universidad Metropolitana de México.

PALAZÓN, R.M. CUSIDÓ Y C. MORALES *Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino*, Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.

Principios activos de las plantas medicinales: los flavonoides Botanical Online.

SANABRIA A. (1983) Notas sobre el análisis fitoquímico preliminar de plantas para el laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

SWAIN T., ATE-SMITH, E.C., 1962. Comparative biochemistry. M. Florin, y H.S Manson. Eds. Vol. 3. Acedic Press. New York. USA.



VALENCIA C. (1995) Fundamentos de fitoquímica. Universidad Autónoma Nacional de México.