



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

FITOQUÍMICA DE LAS HOJAS DE *Blechum pyramidatum Lam Urb*

POR:

YAMILKA YANNETH SOLÍS MOJICA

Para Optar por el Título de Licenciada en Química

ASESORA:

DRA. LILIA CHÉRIGO

Panamá, República de Panamá

2021

JURADO EVALUADOR

Dra. Lilia Chérigo
Asesora
Departamento de Química Orgánica

Mgtr. Vielza Domínguez
Jurado
Departamento de Química Orgánica

Mgtr. Guillermo Domínguez
Jurado
Departamento de Química Orgánica

DEDICATORIA

Dedicada a Dios, a mi madre, hermanos, papá, a mi familia y amigos que siempre han estado a mi lado y me han acompañado.

Gracias por todo el apoyo, los cuales cuando me vieron perder el rumbo y la fuerza, me ayudaron y dieron palabras de aliento.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por darme todo.

A mi madre, por apoyarme y tenerme paciencia; inclusive cuando había perdido el rumbo y no sabía que más hacer.

También a mi mi papá, mis tías, primos y abuelos por el apoyo moral.

A la Doctora Lilia Chérigo y su esposo el Doctor Sergio Martínez; por el apoyo brindado.

A la Doctora Ana Santana por apoyarme y guiarme.

Y a todos los profesores y compañeros que siempre estuvieron ahí para mí.

INDICE

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 Familia Acanthaceae	2
1.1.1 Generalidades de la Familia Acanthaceae	2
1.1.2 Uso Etnomédico de la Familia Acantaceae	2
1.1.3 Fitoquímica de la Familia Acantaceae	3
1.2 Generalidades del Género Blechum	4
1.2.1 Generalidades del Género Blechum	4
1.2.2 Blechum pyramidatum	4
1.2.3 Descripción taxonómica de Blechum pyramidatum	6
1.2.4 Importancia medicinal de Blechum pyramidatum	7
1.2.5 Estudio fitoquímico de Blechum pyramidatum	8
1.2.5.1 Triacotanol o TRIA:	8
1.2.5.2 Ácido Palmítico	9
1.2.5.3 Estigmasterol	10
1.2.5.4 Ligulariaphytin	11
1.2.5.5 Estigmasterol-3-O-D-glucósido	12
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo General	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4. METODOLOGÍA	16
4.1 Recolección:	16
4.2 Extracción del material vegetal:	16
4.3 Separación y Análisis por Cromatografía en capa fina del extracto	16
4.3.1 Extracción líquido-líquido	16
4.3.2 Fraccionamiento Primario del extracto	17
4.3.3 Fraccionamiento Secundario	18
4.3.4 Purificación de los metabolitos secundarios	19

4.3.5	Caracterización de los metabolitos aislados	19
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1	Obtención del Extracto:	20
5.2	Fraccionamiento líquido-líquido:	20
5.3	Fraccionamiento Primario	20
5.4	Fraccionamiento Secundario	22
5.5	Purificación del metabolito secundario:	23
5.6	Esquema de Separación	24
5.7	Caracterización del metabolito Secundario	26
6.	CONCLUSIONES	45
7.	RECOMENDACIONES	46
8.	BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE TABLAS

Tabla	pág
Tabla 1 – valores de RMN de C13 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol	30
Tabla 1 – valores de RMN de C13 - DEP135 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol	33
Tabla 1 – valores de RMN de C13 – DEPT90 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol	35

INDICE DE IMÁGENES

Imágenes

1. Mapa de los lugares donde se extienden las plantas de la familia de las acantaceaes	2
2. Estructuras de la Apigenina y el ácido ursólico	3
3. <i>Blechum pyramidatum</i> hojas y flores	6
4. Estructura del Triacotanol	9
5. Ácido Palmítico	9
6. Estigmasterol	10
7. Ligulariaphytin	11
8. Estigmasterol-3-O-D-glucósido	12
9. Rotavapores al vacío	17
10. Solventes utilizados como fase móvil.	18
11. Cromatografía de capa fina o TLC	21
12. Cromatografía de Columna abierta	22
13. Cromatografía de capa fina o TLC, vistas con luz UV	23
14. Muestra, pesada y purificada de nuestro analito	24
15. Esquema de separación	24
16. Rango para diferentes grupos funcionales en ¹ HRMN.	27
17. Rango para carbono	27
18. Espectro de ¹³ C de la mezcla de β-sitosterol y Estigmasterol	28
19. Ampliación del Espectro de ¹³ C de la mezcla de β-sitosterol y Estigmasterol	29
20. Espectro DEPT-135 de la mezcla de β-sitosterol y Estigmasterol	31
21. Ampliación de Espectro DEPT-135 de la mezcla de β-sitosterol y Estigmasterol	32
22. Espectro Monodimensional DEPT-90 de la mezcla de β-sitosterol y Estigmasterol	34
23. Espectro de Protón de la mezcla de β-sitosterol y Estigmasterol	37

24. Ampliación del Espectro de Protón de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol	38
25. Espectro de ^1H RMN de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol (700 MHz, CDCl_3)	40
26. Espectro de ^{13}C RMN de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol (175 MHz, CDCl_3)	41
27. β -sitosterol y Estigmasterol y sus respectivos espectros ^{13}C RMN	42

RESUMEN

A pesar de los avances farmacológicos, todavía muchas personas recurren a la medicina tradicional para combatir algunas enfermedades. En estudios previos la especie *Blechnum pyramidatum* ha demostrado tener actividad antidiabética y anticancerígena. Con el objetivo de seguir identificando los metabolitos secundarios presentes en *Blechnum pyramidatum* y relacionarlos con algunas de las actividades reportadas para la especie, se preparó un extracto orgánico de polaridad media para su análisis químico. Al extracto se le realizó un fraccionamiento líquido-líquido y varias cromatografías en columna abierta en fase normal. Posterior se utilizó la técnica como la resonancia magnética nuclear (^{13}C -RMN y ^1H -RMN) para proponer los metabolitos presentes. Después de varios fraccionamientos, no se logró purificar un compuesto, debido a que la mezcla era muy compleja. Sin embargo, se identificó por comparación con la literatura la naturaleza de los compuestos que formaban esa mezcla. El β -Sitosterol y Estigmasterol fueron identificados en el extracto de las hojas de *Blechnum pyramidatum*, compuestos con varias actividades biológicas reportadas como la de reducir el colesterol en el organismo, como antioxidante, anti-inflamatorio, antitumoral, anticancerígeno, hipoglucémico y regulador de la glándula tiroidea. Algunos de estos efectos solo se observan en presencia de ambos compuestos, el β -sitosterol y el estigmasterol.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos el ser humano se ha visto en la necesidad de tratar y curar sus dolencias, el principal recurso con el cual contó el hombre desde esos tiempos primitivos fueron las plantas. Hoy día después de un largo camino a través de los siglos y a pesar de los avances que se han dado en la síntesis química de compuestos elaborados, no se puede descartar a las plantas como fuente natural de medicamentos.

Actualmente se hace imperativa la búsqueda de nuevas fuentes de medicamentos en la naturaleza debido a los efectos secundarios que pueden ocasionar los compuestos sintéticos. Cada año se hace más imprescindible regresar a la naturaleza en busca de aquellos remedios que contribuyen a la recuperación de la salud de todo ser humano.

Este trabajo se diseñó con el fin de tener mayor conocimiento científico sobre los metabolitos secundarios de la especie *Blechum pyramydathum* y la validación de las actividades reportadas de acuerdo a los metabolitos encontrados. También se detalla el procedimiento que se siguió en la búsqueda de los metabolitos, ya sea la parte experimental y también después de obtenerse los espectros, como se llegó a los compuestos encontrados.

1. ANTECEDENTES

1.1 Familia Acanthaceae

1.1.1 Generalidades de la Familia Acanthaceae

Blechum pyramidatum (Lam.) Urb. pertenece a la familia de las acanthaceae, (Gupta, Santana y Espinosa. 2004, p 17). que se encuentran principalmente en los trópicos y algunas veces en los lugares de clima templado. Se extienden a través de: Indomalasia, África; parte de Latinoamérica, especialmente Brasil y América central. (Cabral y Medina, 2003, p 570)



Figura No. 1 Mapa de los lugares donde se extienden las plantas de la familia de las acantaceaes

1.1.2 Uso Etnomédico de la Familia Acanthaceae

Algunas acantaceaes poseen funciones antifúngicas, citotóxicas, anti-inflamatorias, antipiréticas, antioxidantes, insecticidas, hepatoprotectoras, inmunomoduladoras, anti-agregación plaquetaria y potencial anti-viral. (Awan, Ahmed, Uzair, Aslam, Farood, y Ishfaq, 2014, p.1).

Por ejemplos, *Acanthus ilicifolius* es utilizada en la India y China para tratar el asma, la diabetes, la lepra, la hepatitis, mordeduras de serpientes y la artritis reumatoide. (Danny y Leon. 2019).

Las hojas del *Acanto ebracteatus*, son conocidas por sus actividades antioxidantes. (Danny y Leon 2019).

1.1.3 Fitoquímica de la Familia Acanthaceae

La fitoquímica de la familia de las acantaceas, han arrojado que contienen: glúcidos, flavonoides, benzonoides, compuestos fenólicos, naftoquinonas y triterpenoides. (Awan, Ahmed, Uzair, Aslam, Farood, y Ishfaq, 2014, p.1)

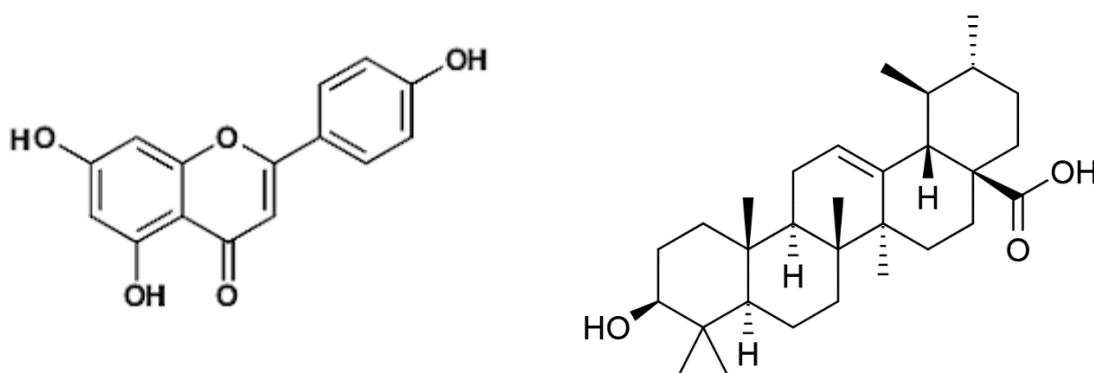


Figura No. 2 Estructuras de la Apigenina y el ácido ursólico

En las hojas de *Acanthus ilicifolius*, se ha encontrado compuestos como lupeol, α -amyrin, oleanolic y ácido ursólico, y en sus flores saponil y triterpenoide, alcanoides, como, por ejemplo: acanticifolina y benzoxazinium. (Firdiaus, Prihanto, y Nurdiani, 2013, p. 19). Entre los compuestos fenólicos encontrados están la acanfolicida, ilicifoliocida, acteosida, verbascocida y derivados de apigenina. (Tripp, Daniel, Lendermer. y McDade, 2019).

1.2 Generalidades del Género *Blechum*

1.2.1 Generalidades del Género *Blechum*

La tasa de estudio del género *Blechum* es escasa. En el artículo *New Molecular and Morphological insights prompt transfer of Blechum to Reullia (Acanthaceae)*, se examinaron características morfológicas que se han usado para distinguir el *Blechum* de la *Ruellia*.

El género *Blechum* fue establecido por Patrick. Browne en 1756, a pesar que algunas especies de *Blechum* fueron establecidas antes como *Ruellia* L. (Tripp, Daniel, Lendermer y McDade, 2009).

1.2.2 *Blechum pyramidatum*

Blechum pyramidatum (Lam.) Urb., es común en los lugares abiertos o cultivos, ya sea en estaciones áridas o húmedas. Distribuida por América Central, Panamá, norte de Sudamérica, este y sur de México, Bahamas e Indias occidentales, (Daniel y Acosta, 2003) Puerto Rico y demás Antillas Mayores y algunas de las Antillas Menores. (Urban. 2019)

En Panamá se encuentra en Bocas del Toro, Coclé, Colón, Chiriquí, área del Canal, Darién, Los Santos, Herrera, Panamá, Panamá Oeste, Guna Yala y Veraguas. (Gupta, Santana y Espinosa, 2004, p.18)

Entre sus nombres comunes tenemos: mazorquilla (Cuba), Doudou Kochon (Martinica) (Gupta, Santana y Espinosa. 2004, p 18). mazorca, mazorca de agua (Beyra, León, Iglesias, Ferrándiz, Herrera, Volpato, Godínez, Guimaraís y Álvarez, 2004, p.) yerba de papagayo (Puerto Rico), en Panamá se le conoce con el nombre de Zornea. (Rios, 2014)

Sinónimos de *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb.:

- *Barleria pyramidata* Lam.
- *Blechum blechum* (L.) Millsp.
- *Blechum brownei* Juss.
- *Blechum brownei* f. *Brownei* Juss
- *Ruellia parviflora* Sessé & Moc.
- *Barleria pyramidalis* Lam. ex Ness
- *Baleria pyramidata* Lam.
- *Blechum blechum* (L.) Millsp.
- *Blechum brownei* Juss. [thumb|right|200px|Flor](#)
- *Blechum brownei* f. *albiflora* Kuntze
- *Blechum brownei* f. *brownie*
- *Blechum brownei* f. *coeruleum* Kuntze
- *Blechum brownie* var. *laxum* Ness
- *Blechum brownei* var. *Subcordatum* Kuntze
- *Blechum luzonium* Ness
- *Justicia lupulina* Lam.
- *Justicia martinicensis* Sieber ex Ness
- *Ruellia gairae* Rohr ex Ness
- *Ruellia rohrii* Vahl ex Ness
- *Ruellia uliginosa* Blanco
- *Blechum brownei* f. *Puberulum* Leonard
- *Blechum* var. *Laxum* Ness
- *Ruelia blechum* L. (Urban. 2019)

1.2.3 Descripción taxonómica de *Blechum pyramidatum*

Como se cita en el libro de “Plantas Medicinales de Panamá”, la *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb tiene una descripción botánica de: “*Planta anual, puberulenta, erecta o ascendente, de 20 a 70 cm de altura, ramificada con las ramas delgadas. Hojas aovadas, delgadas, pecioladas, de 2 a 7 cm de largo, agudas en el ápice, obtusas o estrechas en la base. Flores pequeñas en densas espigas terminales, cuadrangulares de 3 a 6 cm de longitud; sus grandes brácteas foliáceas, imbricadas, aovadas, con venas pinnadas, de 1 a 1.5 cm de largo, flojamente estrigosas y ciliadas, agudas en el ápice, redondeadas en la base. Cáliz 5-partido, sus segmentos aleznados-lineales, ligeramente desiguales. Corola blanquecina, un poco más larga que las brácteas que la subtienden; con un tubo delgado poco expandido en la parte superior y un limbo extendido, casi igualmente 5-lobado. Estambres 4, didínamos, insertos en o encima del centro del tubo de la corola; anteras oblongas, sus celdas paralelas. Pocos o varios óvulos en cada cavidad del ovario; estilo con el ápice aleznado. Cápsula oblonga, puberulenta, como de 6 mm de largo. Semillas orbiculares*” (Gupta, Santana y Espinosa. 2004, p 18).



Figura No. 3 *Blechum pyramidatum* hojas y flores

Clasificación Taxonómica de *Blechum pyramidatum*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Acanthaceae

Subfamilia: Acanthoideae

Tribu: Ruellieae

Suntribu: Ruelinae

Género: Blechum

Especie: *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb. (Urban. 2019)

1.2.4 Importancia medicinal de *Blechum pyramidatum*

Blechum pyramidatum esta planta tiene diferentes usos medicinales en distintos países. Entre los usos más frecuentes tenemos:

1. Si se cocinan las hojas, se pueden tratar problemas de la piel.
2. La cocción con un poco de agua se puede administrar como diurético o como un antiemético.
3. En algunos lugares esta planta se aplica para tratar mordeduras de serpientes.
4. En México, los usos antidiabéticos y anticancerígenos de esta han sido patentados. Incluso cuando los compuestos activos de esta planta no se han separado, aun así, el uso de esta planta ha resultado ser seguro.

Se han obtenido resultados que sugieren que la inhibición de la enzima α -glucosidasa es parte del mecanismo antidiabético de esta planta. (Chérigo y Martínez,2018, 13(4), p.462-463)

En Panamá tiene uso para combatir problemas de la piel, es usada contra la erisipela y la gangrena; con la infusión de esta planta se lavan las heridas y así se evitan infecciones. También tiene uso contra la acidez estomacal y la diarrea. Para el dolor muscular se toma el té preparado con toda la planta. (Rios, 2014)

1.2.5 Estudio fitoquímico de *Blechum pyramidatum*

En estudios anteriores sobre *B. pyramidatum*, se han logrado aislar diferentes compuestos, entre los que tenemos: el Triacotanol, ácido palmítico, estigmasterol, ligulariaphytin, estigmasterol-3-O-D-glucósido, (Chérigo, Salazar y Martínez, 2012, 7(12) p. 24174)

1.2.5.1 Triacotanol o TRIA:

Es un regulador del crecimiento en plantas que se encuentra en las ceras epicuticulares; según varios investigadores, tiene efectos en metabolismos básicos como: la fotosíntesis, consumo de aguas, nutrientes y actividades enzimáticas o síntesis de proteínas. El TRIA, mejora la eficiencia fisiológica de las células.

Varios estudios presentan fuertes evidencias que la aplicación de TRIA a raíces u hojas, promueven el crecimiento y producción de vegetales u otros cultivos, incluyendo los cultivos agronómicos y hortícolas, como los cultivos de plantas medicinales y aromáticas; bajo condiciones normales o adversas. El aislamiento y caracterización de los genes reguladores de TRIA, fue el primer paso para el entendimiento de las acciones del TRIA. El TRIA afecta la fotosíntesis al incrementar los niveles y actividad de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa o RuBisCO y mejora el estatus de la fotosíntesis. (Naeem, Masroor, Khan y Moinuddin (2012), 7(2) p. 129)

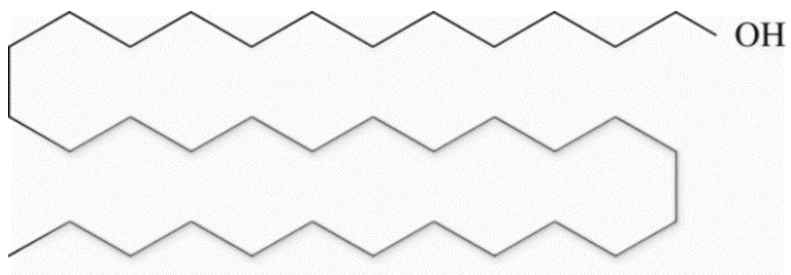


Figura No. 4 Estructura del Triacotanol

1.2.5.2 Ácido Palmítico

ácido palmítico ($C_{15}H_{31}CO_2H$) es un ácido graso saturado, que es común en los aceites vegetales y frutos de la palma. (Machado, 1998).

La presencia de ácido palmítico en *Blechum pyramidatum* un potente inhibidor de la enzima α -glucosidasa nos proporciona evidencia del porque *Blechum pyramidatum* tiene actividad antidiabética. (Chérigo y Martínez, 2018, 13(4) p. 461-464)

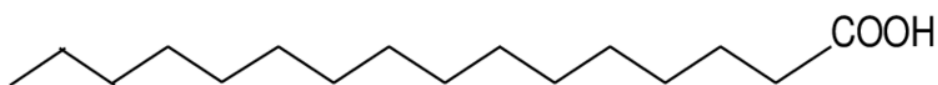


Figura No. 5 Ácido Palmítico

1.2.5.3 Estigmasterol

El estigmasterol también se conoce como Estigmasterina, un esteroide insaturado proveniente de las plantas, este esteroide es común en muchas plantas medicinales y actúa como precursor en la síntesis de progesterona, en numerosas síntesis y semi-síntesis de compuestos farmacéuticos y además actúa como intermediario en la biosíntesis de andrógenos, estrógenos, corticoides y en la síntesis de vitamina D₃. Este compuesto es no polar y se encuentra en varias partes de las plantas, se aísla en los extractos de las plantas con compuestos no polares. (Kaur *et.al*, Chaushary, Jain y Kishore, 2011, 2(9), p.2259-2261)

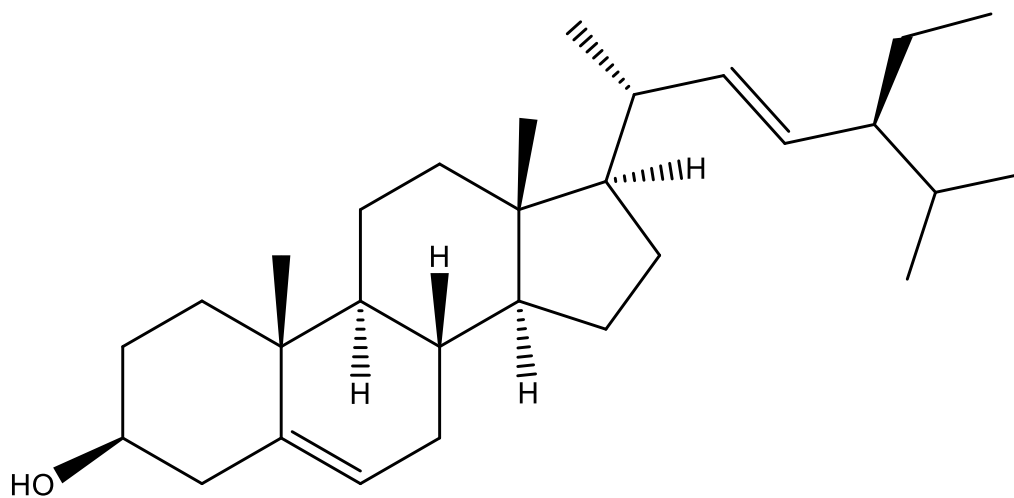


Figura No. 6 Estigmasterol

1.2.5.4 Ligulariaphytin

Es un sólido amorfo de color verde oscuro con una fórmula molecular de $C_{37}H_{40}N_4O_7$, este compuesto se produce durante el aislamiento con etanol. (Li, H.; Li, L.; Zheng, Kuroda y Wang, 2012, 17 (5) p. 5220)

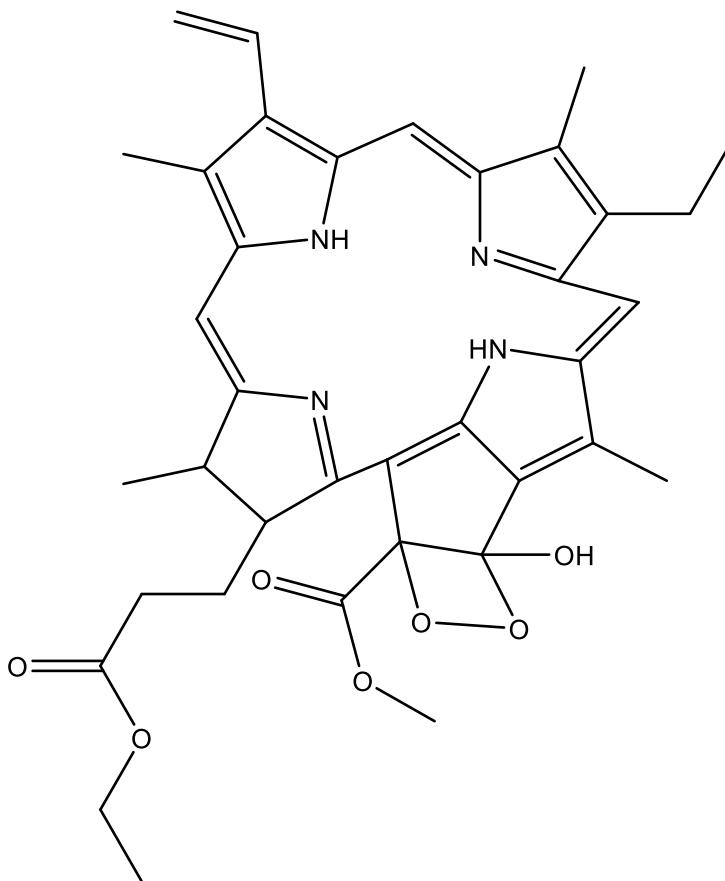


Figura No. 7 Ligulariaphytin

1.2.5.5 Estigmasterol-3-O-D-glucósido

Es un antibacterial, de la familia de los esteroides, casi siempre se relaciona con taraxerona y el sitoesterol. La primera vez que se Estigmasterol-3-O-D-glucósido y Taraxerona fueron aislados fue a partir de la Acacia. (Kaur, Chaushary, Jain y Kishore, 2011)

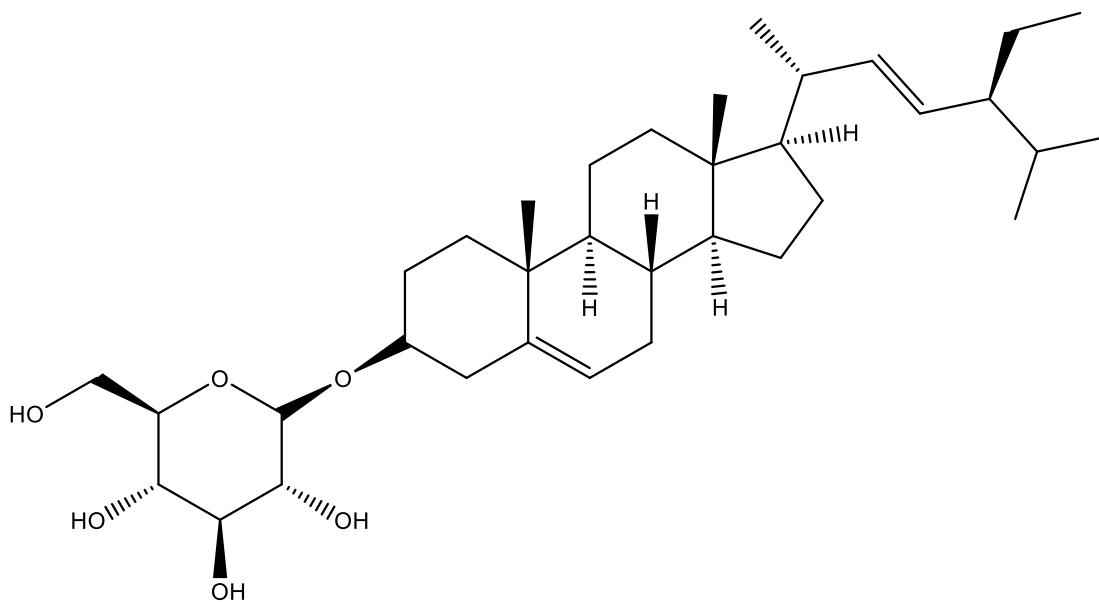


Figura No. 8 Estigmasterol-3-O-D-glucósido

2. JUSTIFICACIÓN

Constantemente se buscan medicamentos, ya sea para enfermedades a las que aún no se ha encontrado la cura, enfermedades que tienen procesos de mutación o enfermedades que exigen tratamientos más específicos. También los costos de algunos medicamentos, han incentivado a la búsqueda de tratamientos o medicamentos de más bajo costo, o alternativas en plantas que contengan los analitos necesarios para contrarrestar enfermedades; según la literatura el 25% de los fármacos existentes se han obtenido de extractos vegetales o de síntesis en sustancias halladas en investigaciones fitoquímicas. Ejemplos de estos son: la digitalina (origen: *Digitalis purpurea*, tratamiento para la hidropesía/retención de líquidos e insuficiencia cardíaca), quinina (origen: árbol de la quina, tratamiento para la malaria), lidocaína (Beyra, León, Iglesias, Ferrándiz, Herrera, Volpato, Godínez, Guimaraís y Álvarez, 2004, p.185) (origen: *Acmella oleracea* (Balanta, 2015), tratamientos: antiarrítmico ventricular, es también un anestésico local (Anónimo,2012)) y la pilocarpina (origen: se obtiene de las hojas de los arbustos tropicales de las Américas pertenecientes al género *Pilocarpus* (Rang, 2003); tratamiento: hipertensión ocular, glaucoma de ángulo abierto y de uso miótico (Flórez, Armijo y Mediavilla, 1987) son fármacos de uso común que raramente son asociados a su origen vegetal.

Es allí donde entran nuestros ancestros, quienes por siglos han utilizado remedios con plantas naturales para la cura o tratamiento de algunas enfermedades o síntomas. Según estudios etnobotánicos de la OMS, el 80 % de la población mundial usa plantas como remedio medicinal principal. La OMS (Organización Mundial de la Salud) en el año de 1985, estableció un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria. Este mismo año se reconoció la existencia de 119 sustancias químicas que son consideradas importantes fármacos, útiles en más de 60 tratamientos terapéuticos que fueron obtenidas de 91 especies principalmente. (Beyra, León, Iglesias, Ferrándiz, Herrera, Volpato, Godínez, Guimaraís y Álvarez, 2004, p. 185-186)

Las principales formas de aplicación o ingestión de las plantas medicinales son a través de infusiones, jugos, polvos o plasmas. La brecha entre la medicina tradicional y la medicina ortodoxa o convencional se ha acortado a través del tiempo; donde antes la medicina tradicional era un obstáculo para la medicina convencional, ahora progresan conjuntamente. (Beyra, León, Iglesias, Ferrándiz, Herrera, Volpato, Godínez, Guimaraiz y Álvarez, 2004, p.187).

Este tipo de estudio nos ayuda a aislar compuestos de interés y así como conocer cuáles son los compuestos que se encuentran mayormente en una planta y sus familias. Se han encontrado, mediante este tipo de estudios, que una misma planta expuestas a diferentes habitats llega a producir diferentes concentraciones en sus compuestos; compuestos que muchas veces son de interés farmacológico.

Por nuestra parte; el estudio al *Blechum Pyramidatum*, la cual es una planta ampliamente extendida por las zonas Tropicales, tiene su valor principal en sus actividades anticancerígenas y antidiabéticas. 2 enfermedades que cada día toman más vidas y donde encontrar nuevos fármacos es de gran importancia.

Se ha encontrado que el *Blechum pyramidatum* tiene actividad fitotóxica.

En México, los usos antidiabéticos y anticancerígenos del *Blechum pyramidatum* han sido patentados.

Se han obtenido resultados que sugieren que la inhibición de la enzima α -glucosidasa es parte del mecanismo antidiabético de esta planta.

3. Objetivos:

3.1 Objetivo General

- Estudiar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb.

3.2 Objetivos Específicos

- Aislar y Purificar mediante técnicas de cromatografía los metabolitos secundarios que tienen presencia en la hoja de *Blechum pyramidatum*.
- Caracterizar la estructura de los diferentes metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Identificar las posibles aplicaciones de las hojas de *Blechum pyramidatum* en función de sus metabolitos secundarios.

4. METODOLOGÍA

4.1 Recolección:

Se realizaron los trámites pertinentes con la Autoridad Nacional del Ambiente, para proceder a recolectar la especie en las plantaciones de café de Santa Clara, Provincia de Chiriquí, Panamá. La especie de interés fue recolectada e identificada por un botánico. Una vez colectada la planta, la muestra fue procesada siguiendo los protocolos estándar del herbario. El ejemplar fue identificado por el botánico de acuerdo a claves taxonómicas y mediante comparación con los testigos presentes en el Herbario de la Universidad de Panamá.

4.2 Extracción del material vegetal:

Las hojas secas y pulverizadas fueron sometidas a una extracción por maceración con una mezcla de Diclorometano-Metanol (1:1). Se colocó la muestra en contacto con la mezcla durante 48 horas. Luego se filtra y el filtrado se concentra en un rotavaporador al vacío hasta sequedad, lo cual produce un sólido de color verde oscuro. Esto se repite varias veces, hasta extraer la mayor cantidad de los constituyentes del material vegetal. Este sólido de color verde se conoce como extracto.

4.3 Separación y Análisis por Cromatografía en capa fina del extracto.

4.3.1 Extracción líquido-líquido

El extracto orgánico preparado de las hojas de *Blechnum pyramidatum* Lam, se le realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano y metanol acuso. Después de separar la fase orgánica (diclorometano) de la acuosa (metanol acuoso), se procedió a realizar un segundo lavado con 200 mL de metanol. Luego se procedió a secar ambas fases en los rotavapores.



Figura No. 9 Rotavapor al vacío

4.3.2 Fraccionamiento Primario del extracto

La fase orgánica de la extracción líquido-líquido se sometió a una columna cromatográfica abierta con fase estacionaria normal. La columna se empacó con 11.4819 g de sílica gel, y luego se agrega la muestra en la parte superior que está previamente preparada, como se explica en el párrafo siguiente.

La muestra se prepara adicionando un poco de Hexano-Diclorometano 1:1 a la muestra para que se adhiera a las partículas de sílica gel, se debe agregar hasta que se forme una especie de pasta que al revolver no se pegue a las paredes del vial donde está mezclando la muestra y la sílica gel. Posteriormente se deja secar para colocar en la columna.

La elución de la columna inició con Hexano al 100 % y posteriormente cada 500 mL se le aumentaba la polaridad con diclorometano y después con acetato de etilo. Se recolectaron fracciones de 100 mL

Las fracciones recolectadas son reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico por cromatografía en capa fina.

Todos los reactivos utilizados en las fases móviles son grado HPLC y en las columnas de TLC se utiliza como revelador una mezcla de 95 mL de Etanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se ponen las TLC dentro de un recipiente plano que contenga el revelar, se espera hasta que toda la TLC quede bañada con el revelador, luego se espera que se seque un poco el exceso de revelador y se pone en un plato calentador a temperatura media, se calienta hasta que comiencen a verse los compuestos que no se pueden apreciar a simple vista o con la luz ultravioleta.



Figura No. 10 Disolventes utilizados como fase móvil.

4.3.3 Fraccionamiento Secundario

Se escogió una fracción en la cual se podían apreciar las separaciones de sus analitos en la cromatografía de capa fina o TLC, que además tuvieran suficiente peso. La razón es que, al tener poca muestra con muchos analitos, no será posible purificarse correctamente. La muestra escogida tenía separaciones visibles en las TLC y además se colectó suficiente muestra para someter a las diferentes cromatografías de columna, hasta llegar a la purificación.

4.3.4 Purificación de los metabolitos secundarios

Cuando ya se había aislado el analito de interés, se realizó una purificación, utilizando una pequeña columna de no más de 5 cm, esta se eluye hasta que solo se logre vislumbrar un solo punto en la TLC.

4.3.5 Caracterización de los metabolitos aislados

Se usa un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Jeol sistema eclipse 400 FT con un magneto Oxford AS 400, para la obtención de los espectros de ^1H , ^{13}C y DEPT-135 para la identificación del compuesto obtenido.

5. Resultados y Discusión

5.1 Obtención del Extracto:

Luego de la extracción del material vegetal por maceración y la evaporación de la mezcla de disolventes utilizada para la extracción se obtuvo 51.8085g de extracto orgánico.

5.2 Fraccionamiento líquido-líquido:

Aproximadamente 51.8085g de extracto se le realizó un fraccionamiento líquido-líquido utilizando una mezcla bifásica formada por los disolventes inmiscibles en equilibrio: diclorometano y metanol acuoso. De este proceso se obtuvieron dos fases, una orgánica (3.6394 g aprox.) y una acuosa (48.16 g aprox.).

5.3 Fraccionamiento Primario

Se recolectaron 43 fracciones de la columna cromatográfica de la fase orgánica de la extracción líquido-líquido, a todas estas fracciones se le realizó cromatografía de capa fina para reunir las y obtener las fracciones primarias.

Se mezclaron de la fracción 3 a 9; de la fracción 11 a 12, 13 a 14; 15 a 18, 22 a 25, 26 a 39 y de la 40 a la 43. Estas fracciones se eluyeron con hexano al 100 % calidad HPLC.

Luego se eluyó con una mezcla de Hexano-Diclorometano (9:1), se obtuvieron 20 fracciones, se unieron de la fracción 1 al 6, del 7 al 8, 9 a 10 y del 11 en adelante se mantuvieron separadas.

Todas estas fracciones se les realizó cromatografía de capa fina con mezclas de Hexano-Diclorometano (7:3) y Hexano-Diclorometano con una razón de (9:1).

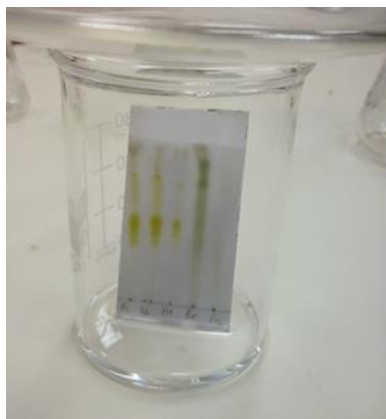


Figura No. 11 Cromatografía de capa fina o TLC

Se utilizó una tercera fase móvil con Hexano-Diclorometano (7:3), en donde se obtuvieron 13 fracciones, de la cual se reunieron las fracciones de la 3 a la 13; dando un total de 0,0701g. Se corrió una TLC de Hexano-Diclorometano 1:1.

Posteriormente, se usó una mezcla de Hexano-Diclorometano a una razón de 1:1. Esta elución nos arrojó 25 fracciones, de las cuales se unieron de la 1 a la 5 donde se obtuvo un peso de 0,1878 g; de la fracción 6 a la 10 con un peso de 0.0244 g; de la fracción 11 a 19 con un peso de 0,0878 g y de las fracciones desde la 20 a la 25, con un peso de 0,0437 g.

De la elución con Diclorometano 100 %, se obtuvieron 11 fracciones, de las cuales se unieron de las fracciones 1 a 4, de la 6 a la 8 y de la 9 a 11, obteniéndose 4 fracciones totales al final. A todas se les corrió TLC con diclorometano.

Posteriormente, se utilizó como fase móvil cloroformo al 100%, con 5 fracciones como resultado. Seguido de una elución con acetato de etilo al 100 % con un resultado de 12 fracciones; y una última elución con metanol al 100 %, con 5 fracciones, donde se corrió una TLC con una fase móvil de Acetato de Etilo-Metanol 9:1.

Los gramos recuperados de todas las fracciones a través de la primera columna fueron de 3,1119 g. Dando un porcentaje de rendimiento del 85,51%

De las 25 fracciones con la fase móvil de Hexano-Diclorometano 1:1, se reunieron las fracciones de la 6 a la 25. Esta mezcla es la que se utilizó para la segunda cromatografía de Columna Abierta.

5.4 Fraccionamiento Secundario

Los gramos de muestra obtenidos de las fracciones 6 - 25 con la fase móvil Hexano-Diclorometano 1:1 (0,1559 g) de la columna anterior. Se sometió a un segundo fraccionamiento. La Columna se comenzó a eluir con una fase móvil de Hexano-Diclorometano con una razón de 6:4, de esta columna se obtuvieron 94 fracciones. La columna fue eluída con fases móviles desde Hexano-Diclorometano 1:1 hasta metanol al 100 %, todos los reactivos grado HPLC.



Figura No. 12 Cromatografía de Columna abierta

A todas las fracciones recolectadas se les realizó TLC para así poder visualizar la separación de los compuestos, primero de manera visual, luego por luz ultravioleta y por último se utilizó un

revelador, descrito previamente. Escogiéndose así de la fracción 20 a la 23, con un peso 0,0841 g y las fracciones de 92 a 94 con un peso total de 0,0136 g. Estas muestras se purificarán.

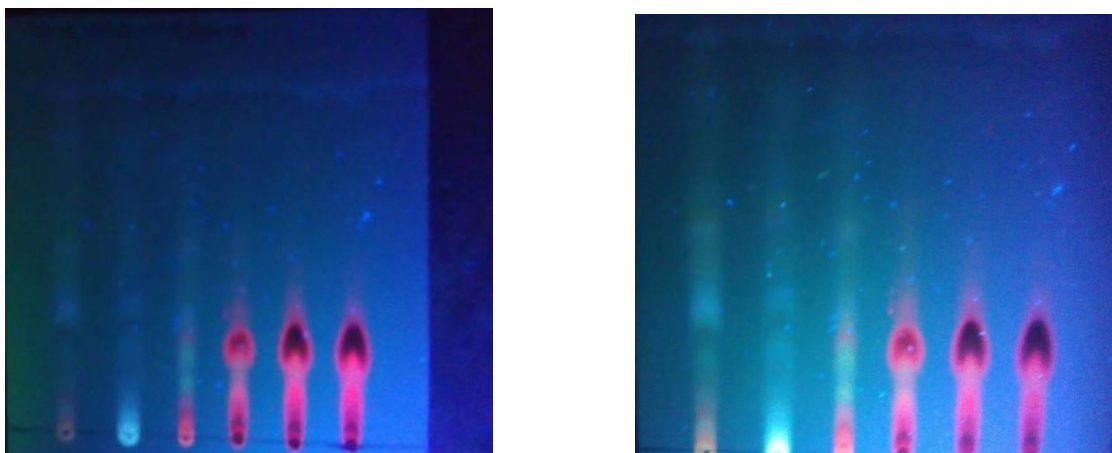


Figura No. 13 Cromatografía de capa fina o TLC, vistas con luz UV

5.5 Purificación del metabolito secundario:

Se montan 2 pequeñas columnas, con las muestras anteriores, ambas se eluyen primero con Hexano al 100% hasta llegar a diclorometano al 100%, se hace cromatografía de capa fina hasta que solo se vislumbre 1 solo analito. Lo recolectado se lleva a sequedad para luego pesarse.

Estas muestras al someterse a un espectro de resonancia magnética nuclear, nos dio como resultado que nuestra fracción elegida es una mezcla entre β -sitosterol y estigmasterol.



Figura No.14 Muestra, pesada y purificada de nuestro analito

5.6 Esquema de Separación

Se realizó un esquema de separación para una mejor visibilidad de los procedimientos que se realizaron y de los resultados obtenidos.





Figura No.15 Esquema de separación

5.7 Caracterización del metabolito Secundario

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La herramienta para la determinación estructural de moléculas orgánicas más potente es la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Cualquier átomo con Número atómico o Masa atómica impar tiene spin nuclear y se puede analizar por esta técnica. Los espectros de RMN (^1H , ^{13}C y bidimensionales) nos proporcionan información sobre los distintos átomos de un compuesto orgánico; sobre sus enlaces y la orientación en el espacio además de la manera en la que ocurre la interacción con los átomos de una molécula o compuesto.

La Resonancia Magnética o RMN, tiene su fundamento en la carga electromagnética de los núcleos que se comportan como una especie de imanes. (Castells, 1981)

“Los espectros RMN casi siempre muestran un gráfico de absorbancia vs δ , lo que equivale a un gráfico de absorbancia vs frecuencia aplicada, en donde δ aumenta hacia la izquierda, dependiendo de cómo estén desprotegidos los átomos; la escala comienza a partir de 0.”

En los espectros de ^1H RMN, podemos observar una multiplicidad en las señales de acuerdo a la siguiente ecuación: $n + 1$, donde “n” es la cantidad de protones de H vecinos al protón de la señal en estudio.

Si los H son químicamente equivalentes absorben a la misma frecuencia, tanto una sola señal, pero con mayor intensidad.

El desplazamiento de cada H depende de su entorno.

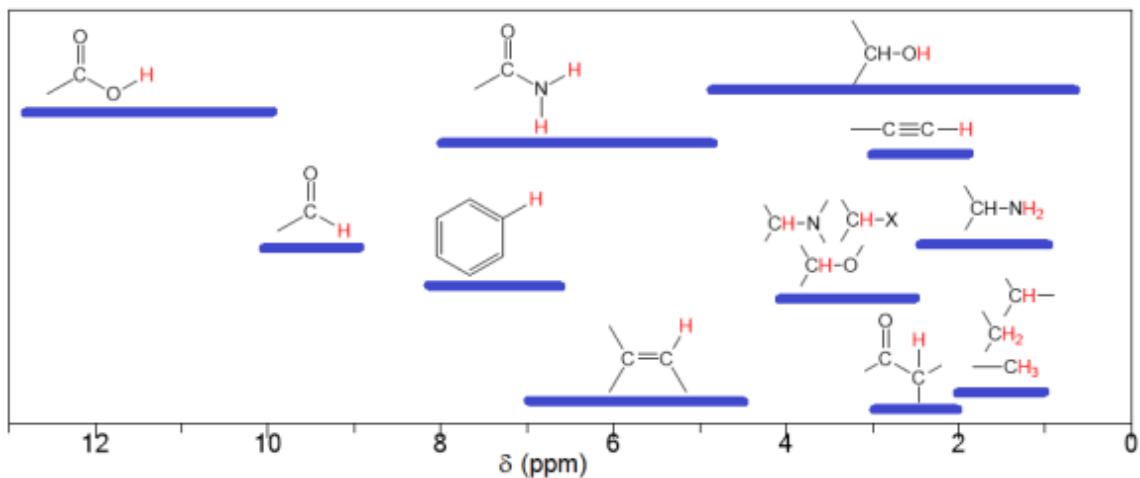


Figura No.16 Rango para diferentes grupos funcionales en $^1\text{HRMN}$.

$^{13}\text{CRMN}$

La Resonancia Magnética Nuclear o $^{13}\text{CRMN}$, necesita muestras más concentradas y en mayor cantidad que $^1\text{HRMN}$. Este espectro va desde 0 ppm a 200 ppm. Lo que hace esta técnica es impedir el acoplamiento de C y H.

La $^{13}\text{CRMN}$ tiene la ventaja que nos permite distinguir los distintos núcleos de carbono.

Las predicciones que se tienen son. (Laurella, 2017):

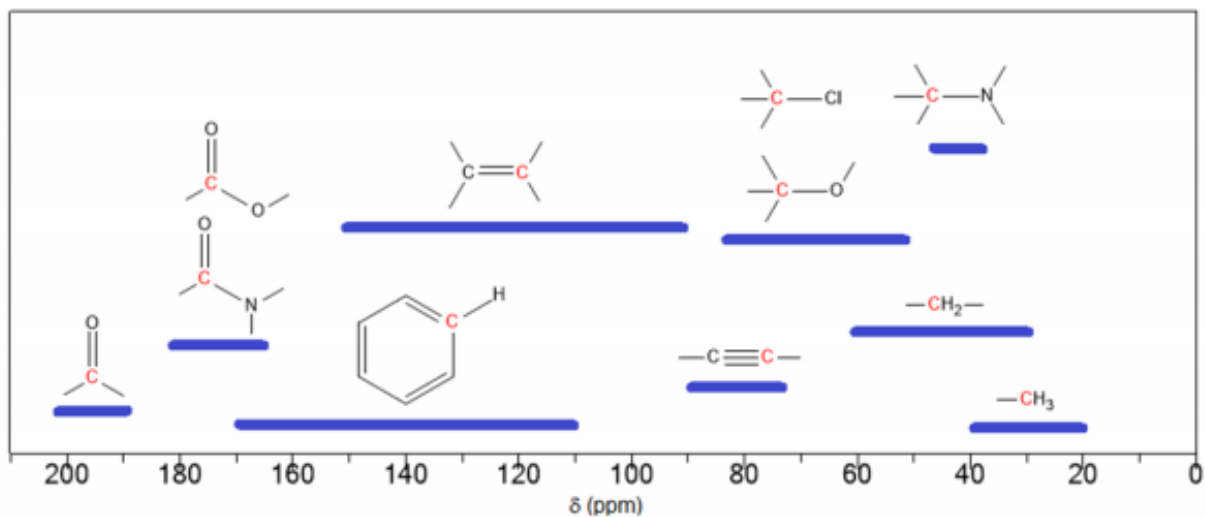


Figura No.17 Rango para carbono

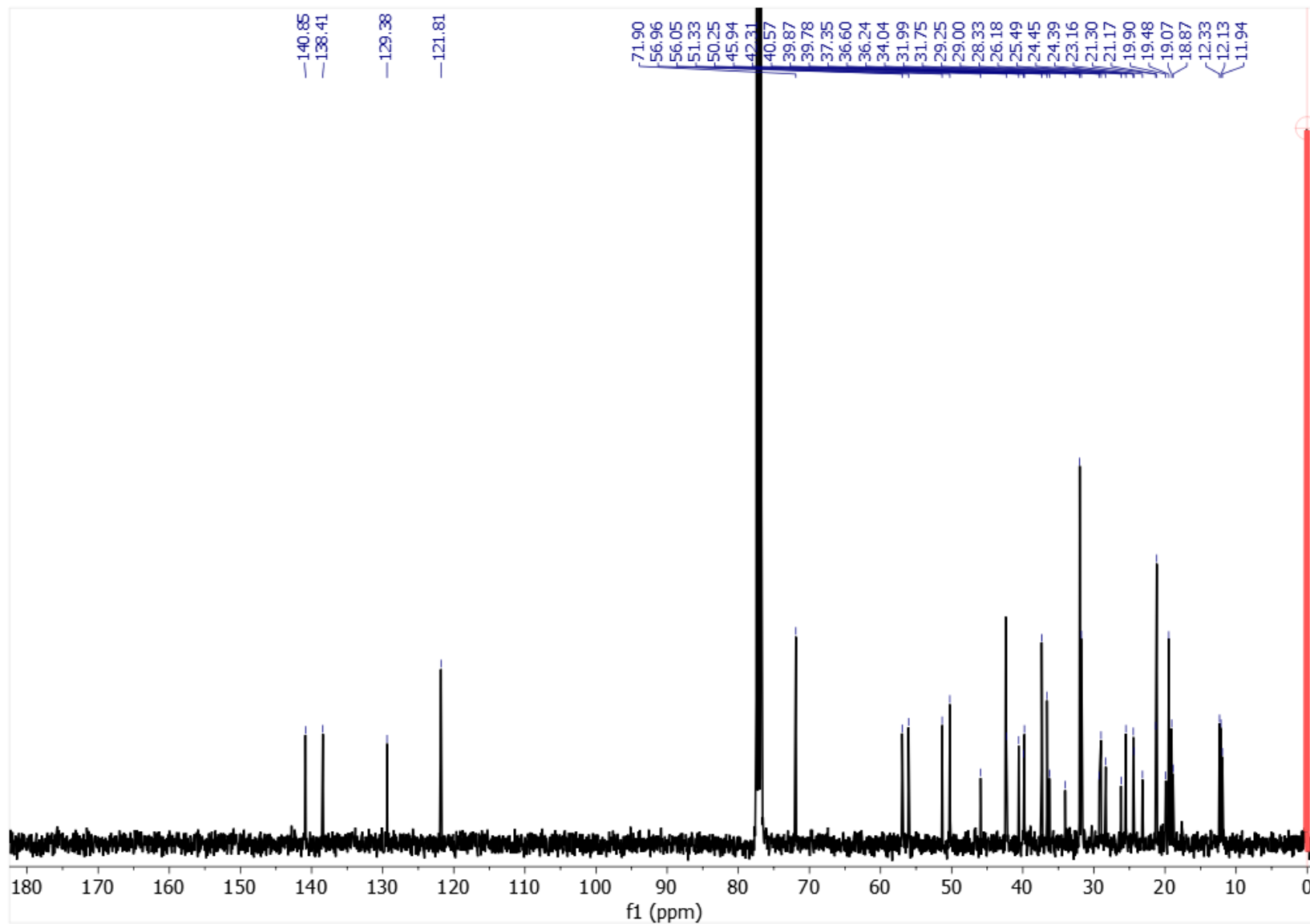


Figura No. 18 Espectro de ^{13}C de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

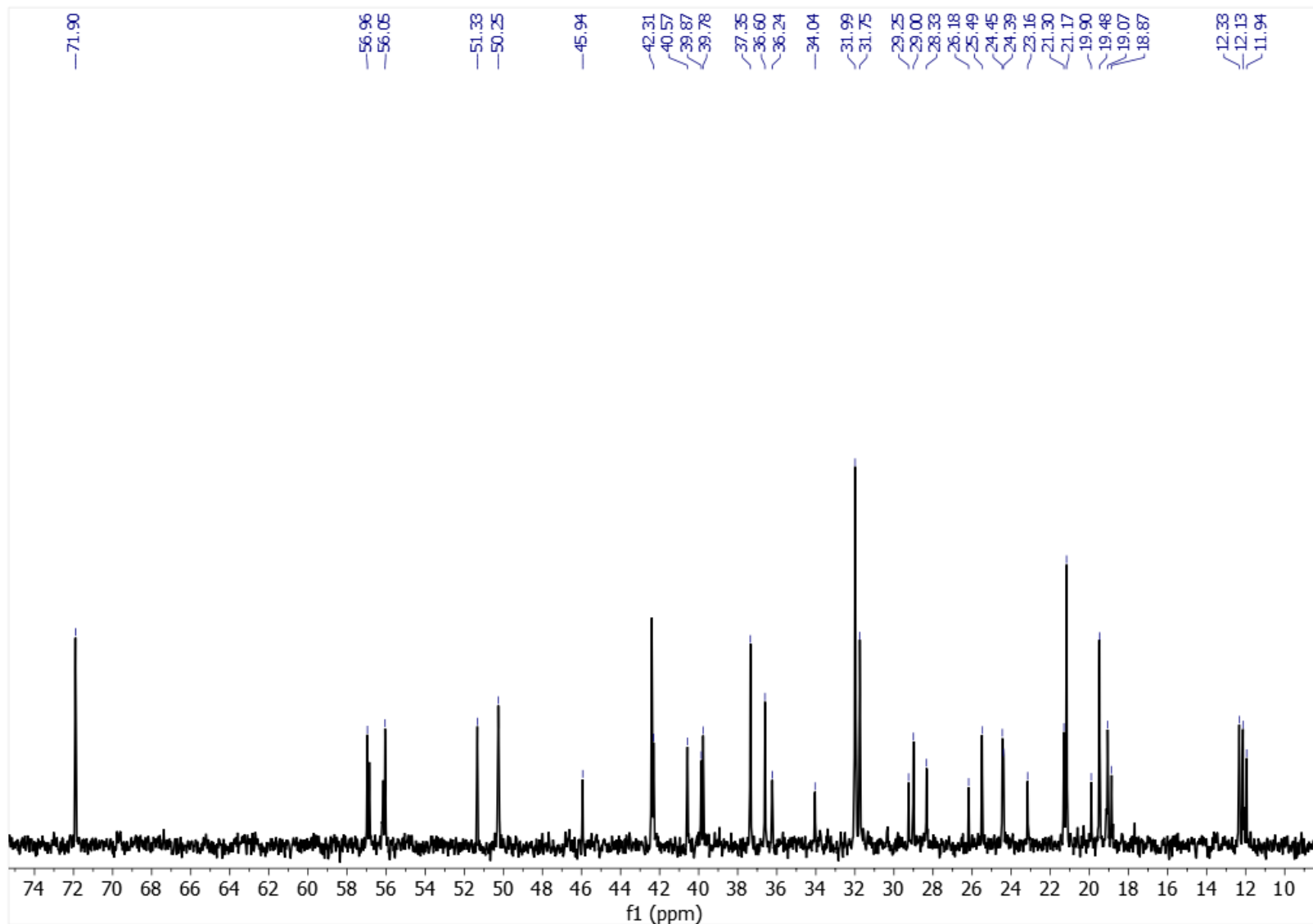


Figura No.19 Ampliación del Espectro de ^{13}C de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

De estos espectros de ^{13}C -RMN podemos obtener los siguientes desplazamientos químicos

Tabla No. 1 Desplazamientos Químicos de ^{13}C de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

Número de señal	ppm	Número de señal	ppm	Número de señal	ppm	Número de señal	ppm
1	11.94	11	24.39	21	36.24	31	56.05
2	12.13	12	24.45	22	36.60	32	56.96
3	12.33	13	25.49	23	37.35	33	71.90
4	18.87	14	26.18	24	39.78	34	121.81
5	19.07	15	28.33	25	39.87	35	129.38
6	19.48	16	29.00	26	40.57	36	138.41
7	19.90	17	29.25	27	42.31	37	140.85
8	21.17	18	31.75	28	45.94		
9	21.30	19	31.99	29	50.25		
10	23.16	20	34.04	30	51.33		

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 se observan 37 señales, esto nos sugiere que podría haber 37 carbonos en nuestra estructura. Si consideramos que tenemos 37 carbonos, utilizando la ecuación: $2n+2$ podríamos inferir el número de protones que deberían existir en la molécula. Al realizar el cálculo observamos que debería tener 76 hidrógenos; esto es sin tomar en cuenta aún las insaturaciones presentes en la molécula. $H = 2n + 2 = 2(37) + 2 =$

76

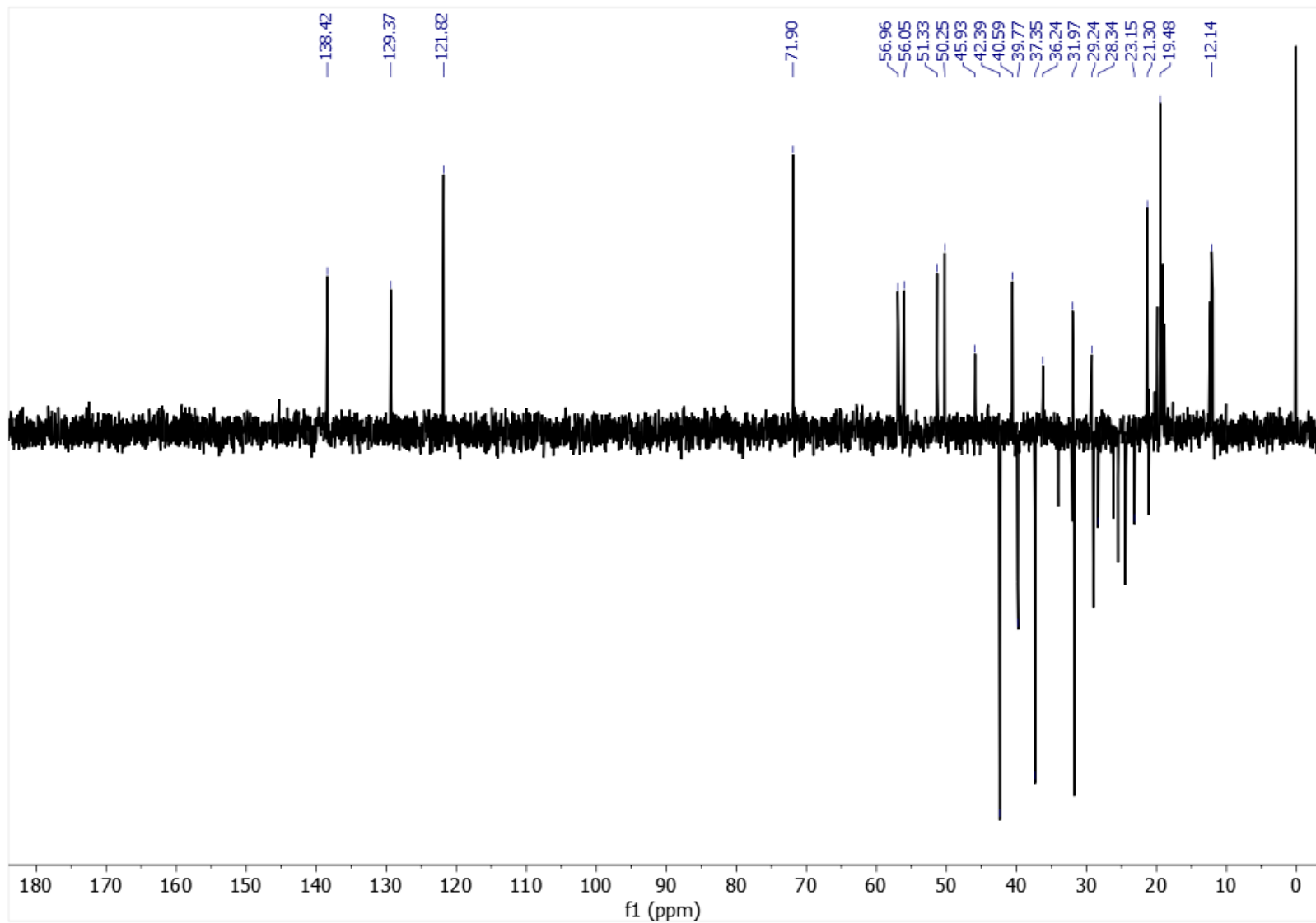


Figura No. 20 Espectro DEPT-135 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

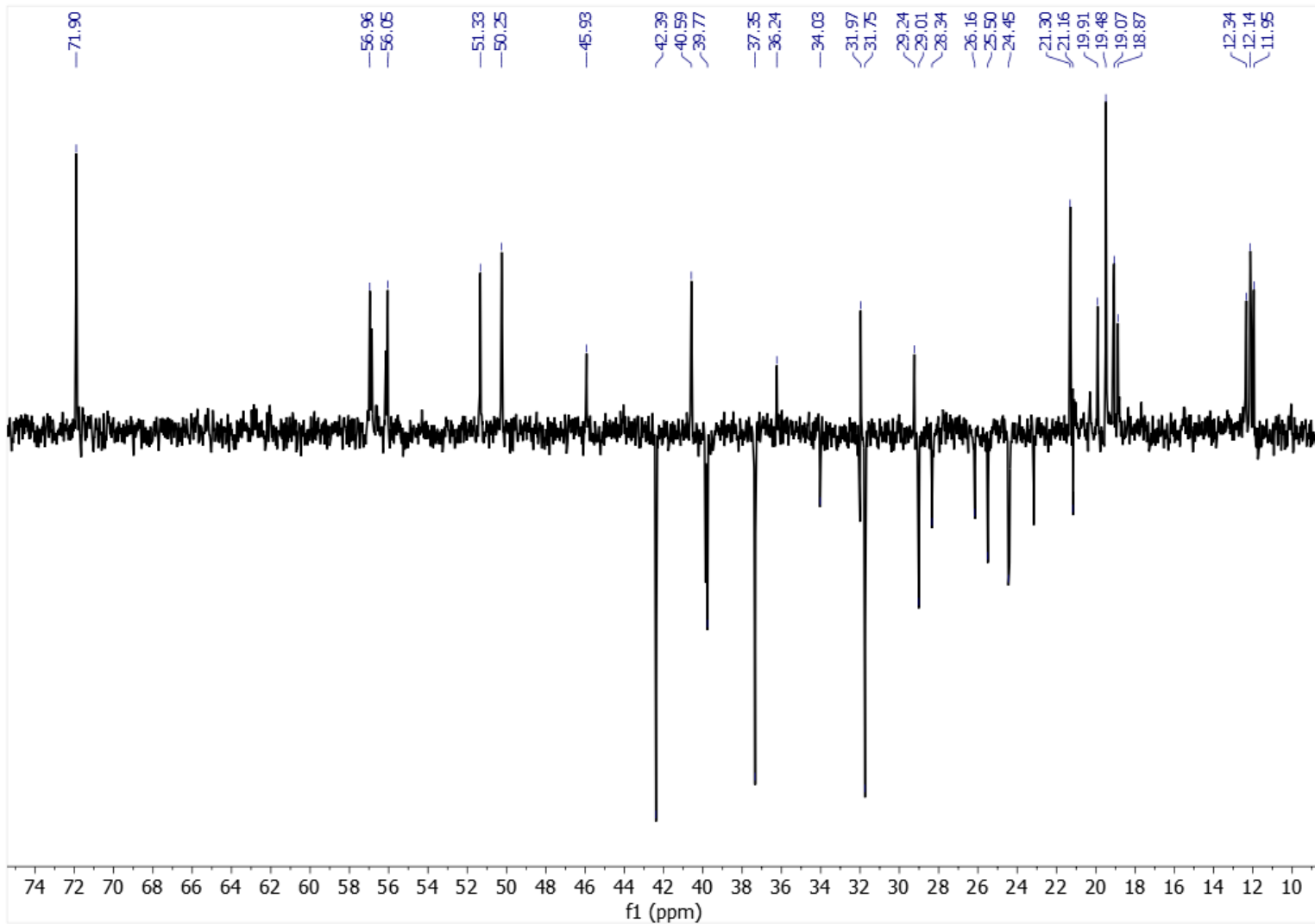


Figura No. 21 Ampliación de Espectro DEPT-135 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

Tabla No. 2 Desplazamientos Químicos de ^{13}C con respecto al Espectro Dept 135 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

Número de señal	ppm	Número de señal	ppm	Número de señal	ppm	Número de señal	ppm
1	11.95	10	23.16	19	34.03	28	56.05
2	12.14	11	24.45	20	36.24	29	56.96
3	12.34	12	25.50	21	37.35	30	71.90
4	18.87	13	26.16	22	39.77	31	121.82
5	19.07	14	28.34	23	40.59	32	129.37
6	19.48	15	29.01	24	42.39	33	138.42
7	19.91	16	29.24	25	45.39		
8	21.16	17	31.75	26	50.25		
9	21.30	18	31.97	27	51.33		

El espectro Dept135 nos ayuda a discernir entre la presencia de metilos, metinos, metilenos y carbonos cuaternarios. En nuestro caso, observamos 33 señales, que al analizar detectamos que 21 señales corresponden a carbonos con enlaces ya sea $\text{C}-\text{H}_3$ ó $\text{C}-\text{H}$ y 12 señales corresponden carbonos con enlace $\text{C}-\text{H}_2$ (picos hacia abajo).

Finalmente, podemos asumir que existen 4 carbonos cuaternarios ($\text{C}-\text{C}$ ó $\text{C}=\text{C}$), ya que si no existen señales de estos 4 carbonos en el espectro Dept135, es debido a que se trata de carbonos cuaternarios, es decir carbonos no protonados.

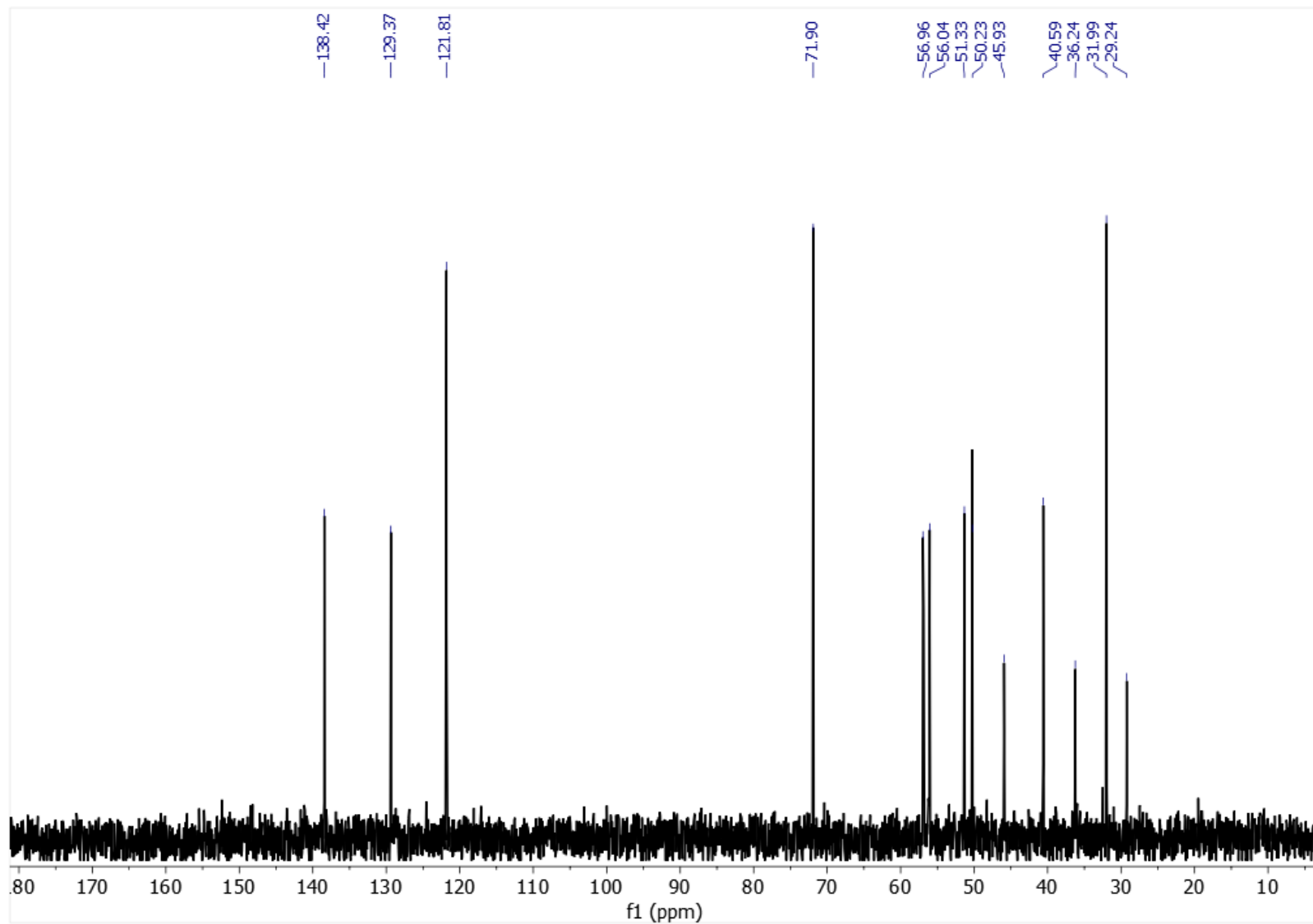


Figura No 22 Espectro Monodimensional DEPT-90 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

Tabla No. 3 Desplazamientos Químicos de ^{13}C con respecto al Espectro Dept 90 de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol.

Número de señal	ppm	Número de señal	ppm	Número de señal	ppm	Número de señal	ppm
1	29.24	5	45.93	9	56.96	13	138.42
2	31.99	6	50.23	10	71.90		
3	36.24	7	51.33	11	121.81		
4	40.59	8	56.04	12	129.37		

En el espectro DEPT-135 habíamos señalado que 21 señales corresponden a carbonos con enlaces ya sea $\text{C}-\text{H}_3$ ó $\text{C}-\text{H}$, y no podíamos diferenciar la cantidad exacta de metilos y metinos. Con el espectro DEPT-90, podemos hacer esta diferenciación, ya que este experimento nos indica de manera específica la presencia de enlaces $\text{C}-\text{H}$. En el espectro DEPT-90 de nuestro compuesto observamos 13 señales por lo que podemos decir que nuestro compuesto cuenta con 13 metinos. Además, al compararlo con el espectro DEPT-135, también podemos inferir que el compuesto tiene 8 metilos.

Así que ahora podemos calcular el número de hidrógenos presentes en todos los metilos y metilenos.

Debido a que la cantidad de carbonos con enlace CH es 13, tenemos que hay 13 Hidrógenos para los CH .

La cantidad de enlaces CH_3 es de 8, por lo que se calcularía la cantidad de H para los enlaces metilo son 24.

$8(3) = 24\text{H}$; donde 8 es la cantidad de carbonos y 3 es la cantidad de H.

Con la información obtenida hasta el momento, ya podríamos calcular nuestra fórmula molecular. Si tomamos en cuenta los 76 H que habría si nuestro compuesto no tuviera insaturaciones y le restamos la cantidad de H que hemos detectado experimentalmente; tenemos que 15 carbonos serían los que faltarían y que por lo tanto deberían estar formando algún ciclo.

$$24\text{H} + 13\text{H} + 24\text{H} = 61\text{H}$$

$$76\text{H} - 61\text{H} = 15\text{H}$$

$$\text{Cantidad de insaturaciones} = \frac{15\text{H}}{2} = 7.5$$

Con este cálculo podemos inferir que nuestro compuesto podría tener insaturaciones.

Hasta ahora nuestra molécula tendría una fórmula empírica de:



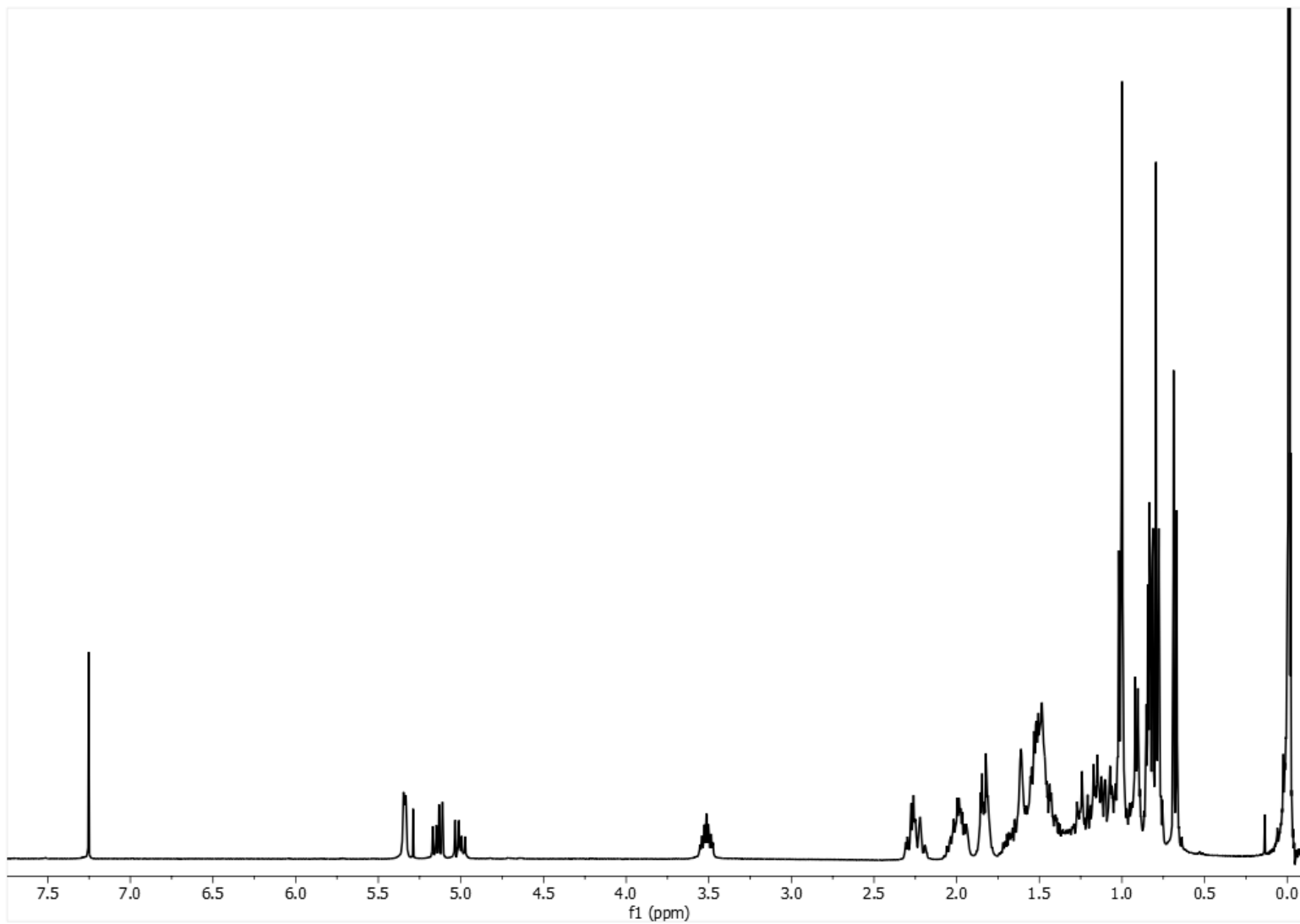


Figura No. 23 Espectro de Protón de la mezcla de β-sitosterol y Stigmasterol

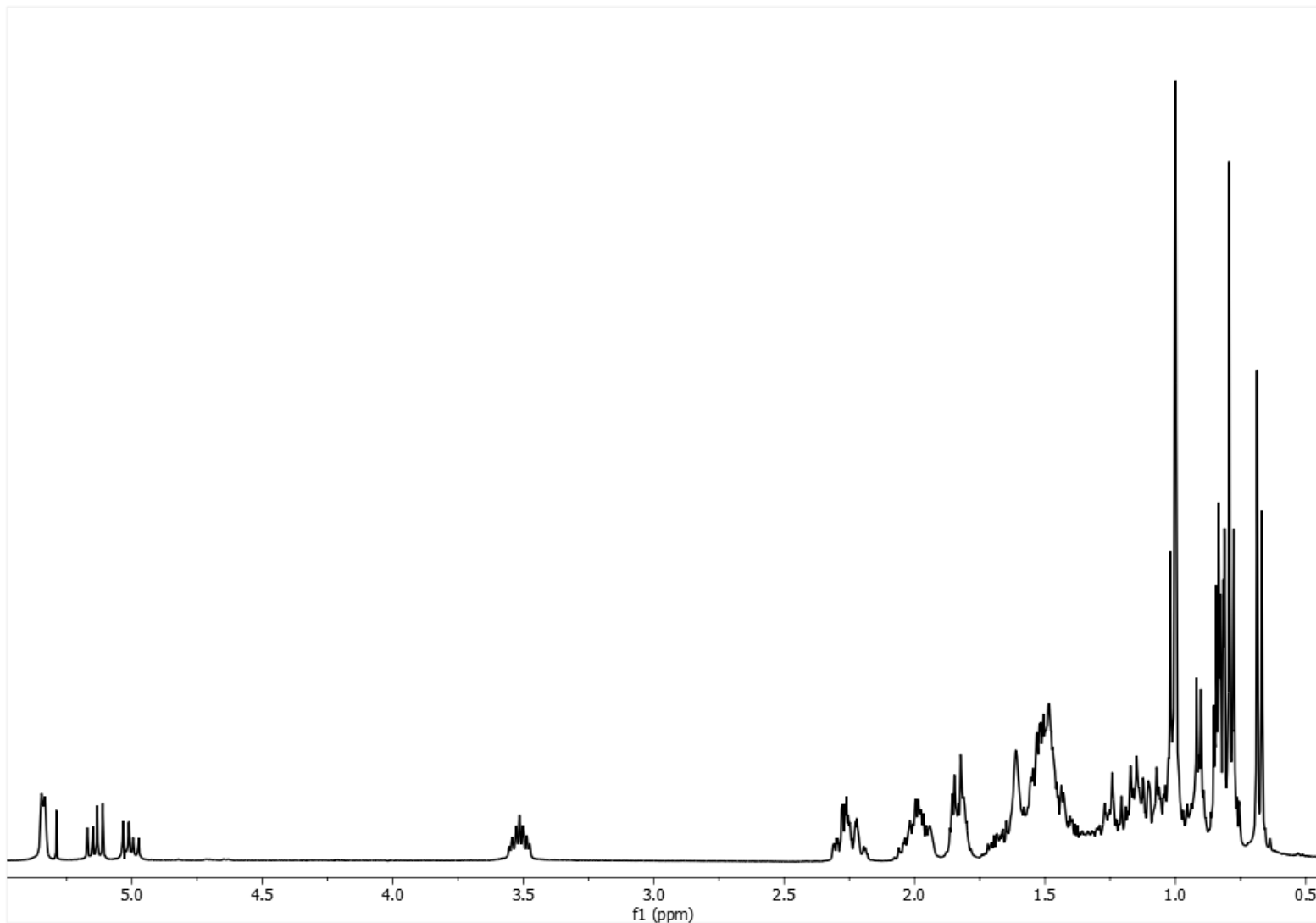


Figura No. 24 Ampliación del Espectro de Protón de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón nos indica que hay un quintuplete a un desplazamiento de 3.5 ppm, por tanto, nos corrobora que existe un enlace OH, también podría ser un enlace NH; pero los oxígenos están más hacia los 3.5 ppm, mientras los enlaces simples con nitrógeno se ubican a campos más bajos, 3.00 a 3.40 ppm. No hay enlaces carbonilos en nuestra molécula, esto es demostrado gracias a nuestro espectro de carbono, cuando existen enlaces carbonilo, los picos son mayores a 150 ppm y en nuestra molécula, el pico más alto es a 140.85 ppm. También la posición y desplazamiento de los picos nos indican que nuestra molécula es un triterpeno escualeno ya sea en los picos agrupados entre 0.6 ppm a 2.00 ppm de espectro de hidrógenos o en los picos del espectro de carbono que se encuentran de 11.94 ppm a 56.96 ppm.

Otra de las señales principales en el espectro de $^1\text{HRMN}$ son las señales alrededor de 5.0 ppm, 5.1 ppm y 5.3 ppm.

Las señales de carbono en campos más altos 121.81 ppm a 140.85 ppm nos indican los dobles enlaces presentes en nuestra molécula que vendrían siendo el doble enlace, ya sea, dentro de los anillos de carbono y del enlace que se encuentra en la cadena exterior del estigmasterol.

Según las distintas señales en los espectros y comparando con trabajos previos en el estudio de otras plantas, podemos señalar que lo encontrado en nuestra fracción es una mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol.

Algunos de los espectros encontrados en los estudios de hojas y flores de la *Cassia Timorensis* DC. son los que se encuentran a continuación. Estos son algunos de los espectros que fueron comparados para corroborar que la muestra obtenida y purificada se trataba de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol. (Nurul, Alhwarri, Amir, Dianita, Mohd, Nogawa y Wahab, 2020, 25(19) p.4)

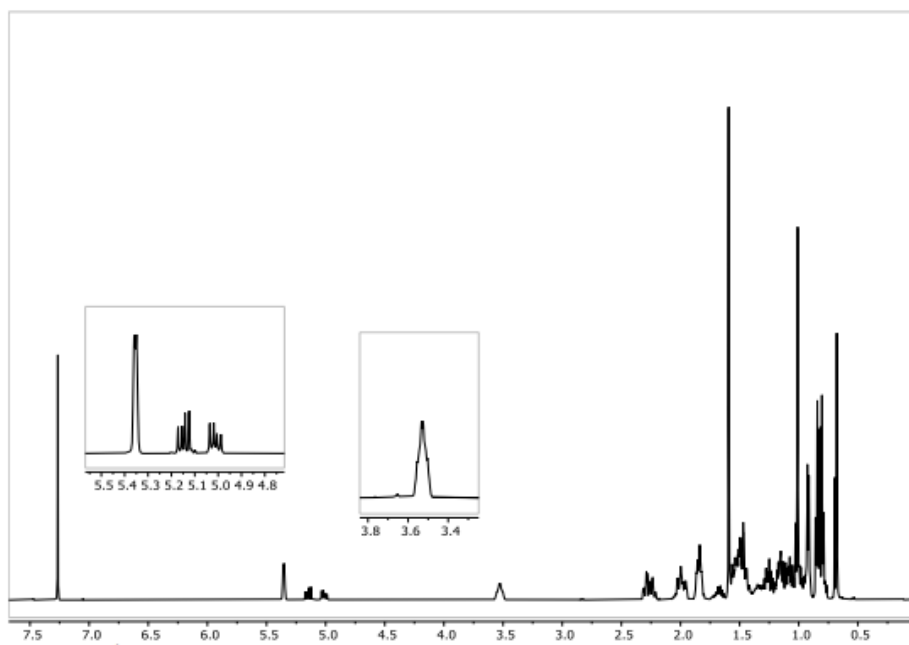


Figura No.25 Espectro de $^1\text{HRMN}$ de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol (700 MHz, CDCl_3)

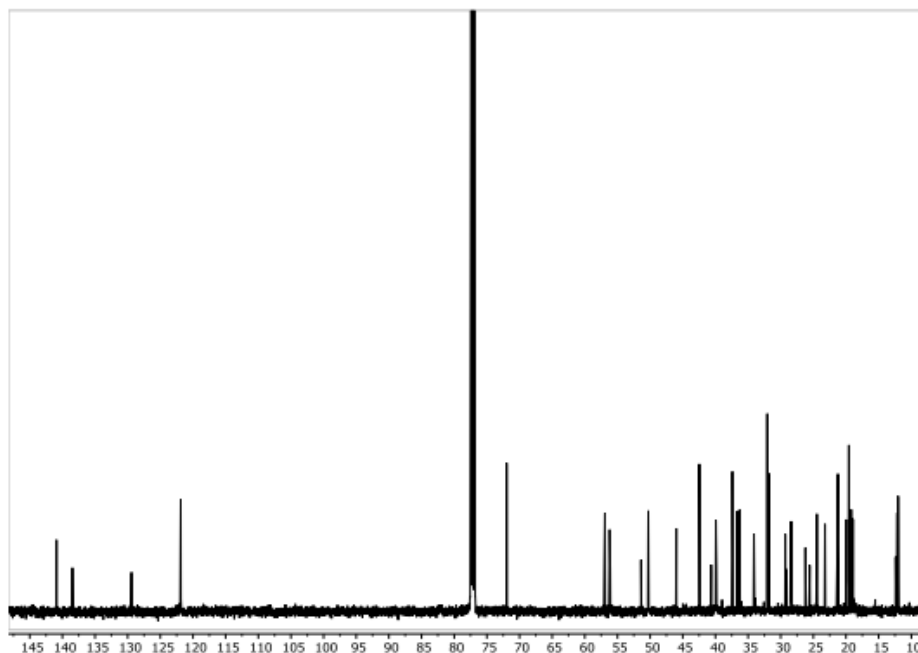


Figura No.26 Espectro de ^{13}C RMN de la mezcla de β -sitosterol y Estigmasterol (175 MHz, CDCl_3)

Estos compuestos se encuentran normalmente juntos en una mezcla.

La señal a aproximadamente 3.5 en el espectro de RMN de protón, es característica de tanto el β -sitosterol, como del Estigmasterol, también la señal alrededor de 5.35 ppm. Además, las señales entre aproximadamente 0.6 ppm a 1.0 ppm son distintivas de los esteroides.

La señal de 140.85 ppm y 121.81 ppm, representa tanto a al β -sitosterol y al estigmasterol.

Tanto el β -sitosterol y el estigmasterol son difíciles de encontrar en forma pura. (Nurul, Alhawarri, Amir, Dianita, Mohd, Nogawa y Wahab, 2020, 25(19) p.4)

Ambos, tanto el β -sitosterol como el estigmasterol, son fitoesteroides, los cuales son compuestos parecidos al colesterol y por tanto pueden sustituirlo, reduciendo así los niveles de colesterol en el organismo. (Novotny, Abdel-Hamid y Hunakova, 2017, 2, p.129). Ambos compuestos son cristales blancos.

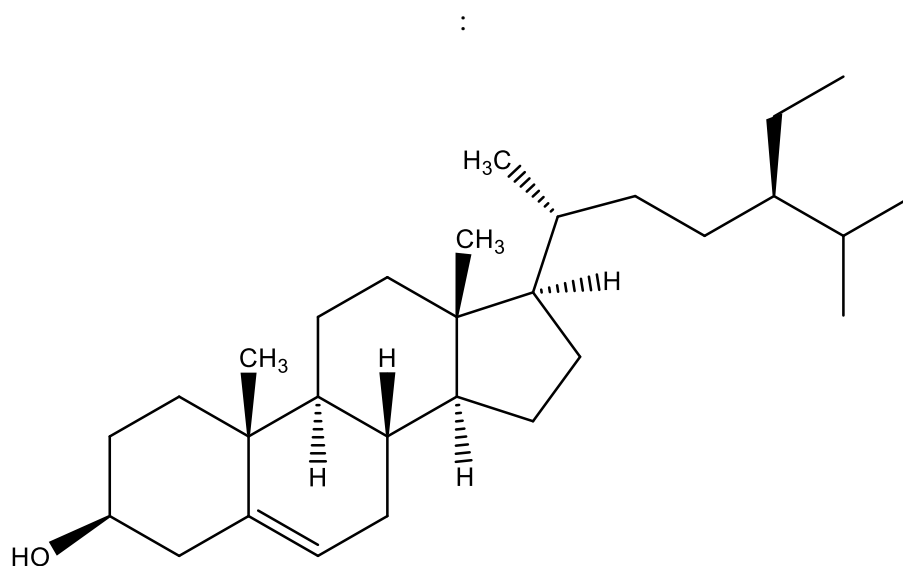
β -sitosterol:

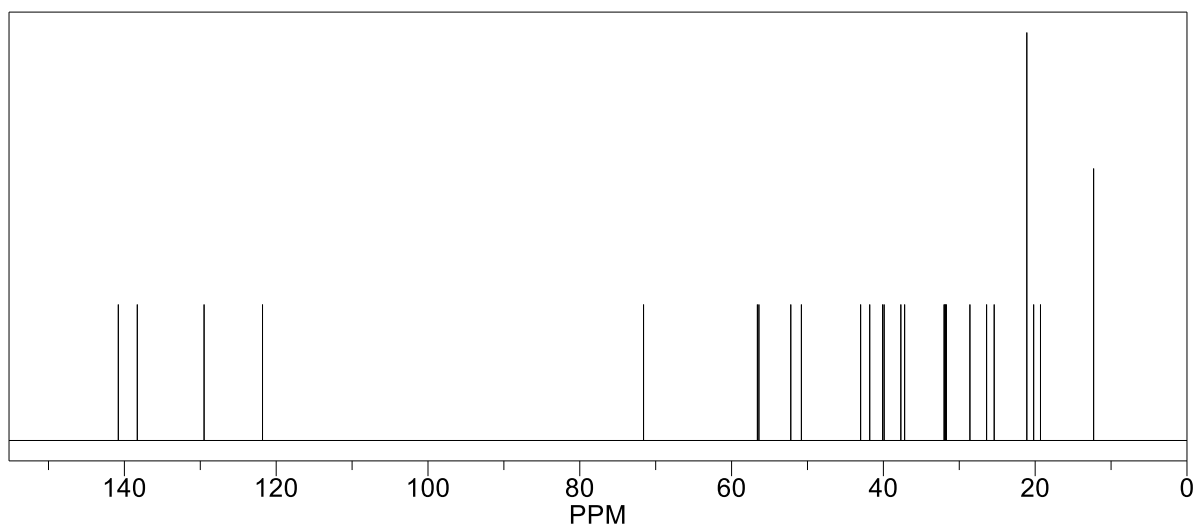
Una de las señales representativas del β -sitosterol es la que se encuentra a 3.5 en el $^1\text{HRMN}$, también la señal alrededor del 5.3. Entre las señales distintivas de β -sitosterol están la del 45.94 ppm.

Este compuesto contiene un grupo funcional y un alcohol secundario.

Aunque tiene una reactividad menor que el estigmasterol, este compuesto es utilizado como terapia de obesidad, diabetes, síndromes asociados a la diabetes y también el cáncer.

El β -sitosterol inhibe la ρ -glicoproteína, que en muchos casos es la responsable que la quimioterapia sea ineficaz. También modula el crecimiento del estrógeno, responsable de las células del cáncer de seno. Por otro lado, ocurre una reducción de la MCF-7 (célula de cáncer de seno, aislada en 1970, su nombre es: **MichiganCancer Foundation -7**). En el cáncer de color ayuda reduciendo el estrés oxidativo, pudiendo utilizarse en quimioterapia, (Novotny, Abdel-Hamid y Hunakova, 2017, 2, p.129- 132)





El estigmasterol

Entre las señales representativas del estigmasterol están: las señales de 3.5 ppm, 5,0 ppm, 5,1 ppm y 5.3 ppm para $^1\text{HRMN}$ y las señales principales en el espectro de carbono que se diferencian del espectro de β -sistoterol

Este compuesto contiene un grupo funcional, un alcohol secundario y un doble enlace.

Es precursor en la síntesis de progesterona y actúa como intermediario en la biosíntesis de andrógenos, estrógenos, corticoides y de vitamina D_3 . Tiene efectos antiartríticos, antihipercolesterolemico, citotóxico, antioxidante, antitumoral, hipoglucemiante, antimutagenico, anti-inflamatorio y efectos en el sistema nervioso central (CNS).

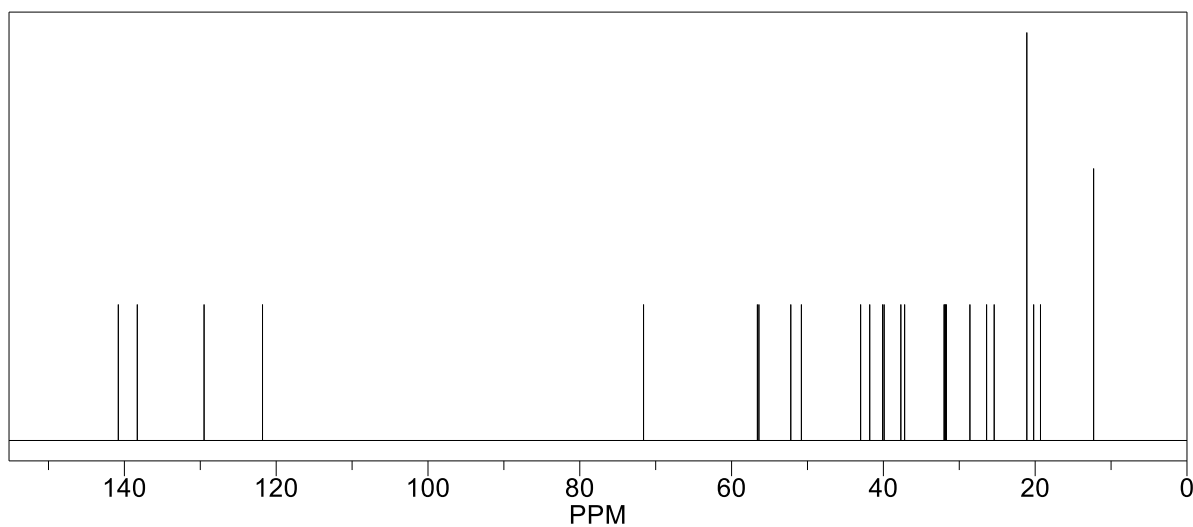
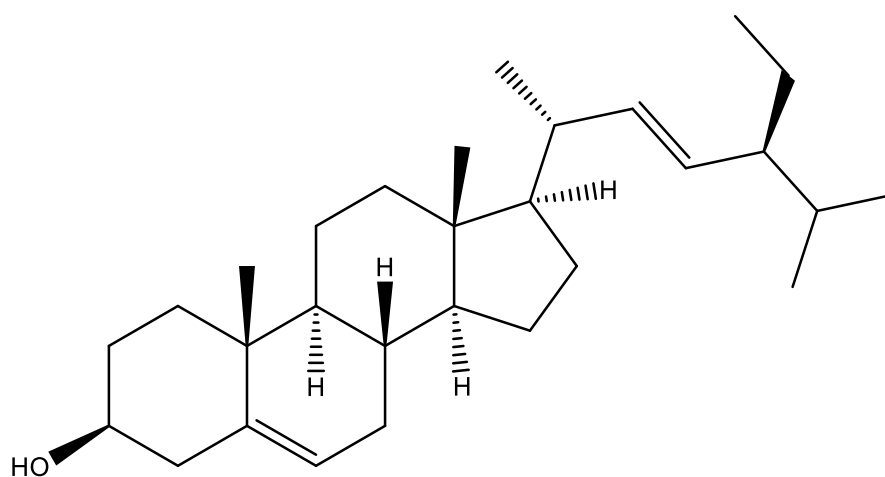
El estigmasterol tiene inhibición en la biosíntesis de colesterol, inhibiendo el Esterol Δ_{24} reductasa en el adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2) y las células de leucemia promielocítica humana (HL-60), suprimiendo el colesterol hepático.

El estigmasterol, junto a otros constituyentes inhibe la actividad de la liasa de la DNA polimerasa β y también potencia los efectos inhibitorios de la droga anticancerígena bleomicin.

Es necesaria tanto el estigmasterol como la β -sitosterol para que la actividad hipoglucémica y su efecto sobre la regulación en la glándula tiroidea ocurran.

Tanto el β -sitosterol, como el estigmasterol tiene actividades anti-inflamatorias, y deben estar junto al perillaldehído para producir esta actividad. (Kaur *et.al*, Chaushary, Jain y Kishore, 2011, 2(9), p.2259-2261)

:



6. Conclusiones

- Del extracto orgánico con polaridad media de las hojas de *Blechum pyramedathum* se logró identificar la presencia de β -sistoterol y estigmasterol.
- La presencia de estos esteroides le confiere actividad antidiabética y anticancerígena a la especie *Blechum*, como se pudo ver, su actividad anticancerígena de estos esteroides ha sido ampliamente estudiada.
- Según la literatura y el trabajo realizado se puede inferir que esta especie contiene una gran diversidad de metabolitos secundarios.
- Ambos metabolitos encontrados tienen varias similitudes, al ser de parte de los fitoesteroides.
- Los metabolitos encontrados se encuentran difícilmente separados uno del otro en la naturaleza, casi siempre se encuentran en forma de una mezcla.

7. Recomendaciones

Se recomienda utilizar la técnica de cromatografía de alta eficiencia para la separación de los metabolitos.

Otra de las recomendaciones es que durante la extracción por maceración se haga una extracción por gradientes, es decir que se vaya aumentando la polaridad poco a poco; ya que al ser una planta con tan diversos metabolitos, se dificulta en mayor medida la separación de ellos.

Por otra parte, en la fase de caracterización, tener un espectro COSY (espectroscopía de correlación en 2 dimensiones) es de gran ayuda. Este espectro nos puede ayudar a saber que señales están correlacionadas; permitiendo así, determinar la estructura.

Se recomienda hacer cromatografía de capa fina en 2D, antes de la etapa de purificación. Esto nos ayudará a saber:

1. Si hay presencia de uno o más compuestos, aparte del analito de interés.
2. Nos ayuda a tener una idea sobre cuáles pueden ser las fases móviles más adecuada en fases para nuestras columnas.

Hacer un estudio de las actividades o funciones de los metabolitos encontrados, sería pertinente.

8. Bibliografía

1. Gupta, M., Santana, A., Espinosa, A (2004). *Plantas Medicinales de Panamá*. Panamá. pág 17-19.
2. Cabral, E., Medina, W. (2003), Salas, R. *Guía de Consultas BotánicaII*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) ASTERIDAE –Scrophulariales – Acanthaceae, pág 570.
3. Awan, A.; Ahmed, C.; Uzair, M.; Aslam, M.; Farood, U.; Ishfaq, K. (2014) *Family Acanthaceae and Genus Apherlandra: Ethnopharmacological and Phytochemical Review*; International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences; 6(1) pág 1; Innovare Academic Sciences. from: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/2569>
4. S. Danny, P. Leon; (2019) *Acanthaceae – Acanthaceae*. Edición: 24 de Diciembre de 2019: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acanthaceae>
5. Firdiaus, M.; Prihanto, A, Nurdiani, R. (2013) *Antioxidant and cytotoxic activity of Acanthus ilicifolius flower*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(1) pág 17-21 Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2221169113600179?via%3Dihub>
6. Beyra, Á; León, M.; Iglesias, E.; Ferrándiz, D.; Herrera, R.; Volpato, G.; Godínez, D.; Guimaraes, M.; Álvarez, R. (2004) *Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba)*; Anales del Jardín Botánico del Madrid 61(2): 185-187.
7. Tripp, E.; Daniel, T.; Lendermer, J.; McDade, L. (2009) *New molecular and morphological insights prompt transfer of Blechum to Ruellia (Acanthaceae)*, Taxon, 58(3). Available from: <https://doi.org/10.1002/tax.583017>
8. Urban, I. (2019) *Blechum Pyramidatum*. Edición: 3z Julio 2019, available from: https://es.m.wikipedia.org/wiki/Blechum_pyramidatum
9. Chérigo, L.; Salazar, M.; Martínez, S. (2015) *Evaluation of Phytotoxic Activity of Blechum Pyramidatum, A Weed of Panamanian coffee crops* – International journal of current research, 7(12) pág24 ; Scientific ResearchGate. Available from: <http://www.journalcra.com>
10. Naeem, M.; Masroor, M., Khan, A.; Moinuddin, Anis (2012) *Triocontanol*, research gate, 7(2) pág 129-132Scientific ResearchGate.

Available from: https://www.researchgate.net/figure/Structural-formula-of-triacontanol-TRIA_fig2_254249527

11. Machado, Nélio. (1998). *Fractionation of PFAD-Compounds in Countercurrent Columns Using Supercritical Carbon Dioxide as Solvent*. Technischen Universität Hamburg-Harburg, Alemania, pág: 60

12. Balanta, D.; (2015) Introducción A la Química Farmacéutica (Diapositivas de PowerPoint) Recuperado de: <https://slideplayer.es/slide/3262319/>

13. Anónimo (2012) *Lidocaína*, ANMAT – Argentina.

Recuperado de: <https://www.vademecum.es/principios-activos-lidocaina+anestesico+localn01bb02>

14. Dabiel, T.; Acosta, S. (2003) *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes*. Acanthaceae, Clifornia Academy of Science, USA, pág 12

15. Rang, H. P (2003). *Pharmacology* (5th ed). Churchill Livingstone, Edinburgh

16. Flórez, J.; Armijo, J.; Mediavilla, A. (1987) *Farmacología humana*. EUNSA. Pamplona, pág 131.

17. Kaur, N.; Chaushary, J.; Jain, A.; Kishore, L. (2011); *Stigmasterol: A Comprehensive Review* research gate, pag 2259-2261, Vol. 2(9); Scientific ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/publication/264420218_Stigmasterol_A_Comprehensive_Review

18. Chérigo, L.; Martínez, S (2018) *α -Glucosidase Inhibitor Isolated from *Blechum pyramidatum** – Natural Product Communications, Vol 13(4), pág 461 -464 available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X1801300421>

19. Li, H.; Li, L.; Zheng, Q.; Kuroda, C.; Wang, Q. (2012) *Phaeophytin Analogues from *Ligularia knorringiana** - Research Gate, 17 (5) pág. 5220 Scientific Research Gate. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/224917902>

20. Castells, J. (1981) *Fundamentos de Química Orgánica. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear*. México, Alhambra Pág 198-207

21. Laurella, S. (2017) *Resonancia Magnética Nuclear* – Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares. (Argentina) Catedra pág 22-109
22. Rios, L. (2014) - *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb – Zornea *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb.. Blog 23: <http://plantasmedicinalesdepanama.blogspot.com/2014/10/blechum-pyramidatum-lam-urb.html>
23. Nurul, N.; Alhawarri, M.; Amir, M.; Dianita, R.; Mohd, A.; Nogawa, T.; Wahab, H. (2020) *Potencial Anti-Acetylcholinesterase Activity of Cassia timorensis DC*. *Molecules* Vol. 25(19) pág. 4. Available from: doi:10.3390/molecules25194545
24. Novotny, L.; Abdel-Hamid, M.; Hunakova, L. (2017) *Anticancer Potential of β -Sitosterol*, *International Journal of Clinical Pharmacology & Pharmacotherapy*. Vol 2, pág 129- 132.

Bibliografía de las imágenes

1. Cabral, E., Medina, W., Salas, R. (2018) *Guía de Consultas Botánica II*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) ASTERIDAE –Scrophulariales – Acanthaceae, pág 570
2. Rios, L. (2014) - *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb – Zornea *Blechum pyramidatum* (Lam.) Urb.. Blog 23: <http://plantasmedicinalesdepanama.blogspot.com/2014/10/blechum-pyramidatum-lam-urb.html>3
3. Gupta, M., Santana, A., Espinosa, A (2004). *Plantas Medicinales de Panamá*. Panamá. pág 17-19.
4. Xie, Y.; Liang, D.; Wu, Q.; Chen, X.; Buabeid, M.; Wang, Y. (2019) *A System-Level Investigation into the Mechanisms of Apigenin Against Inflammation*. Natural Product Communication 14(9) pág 9. Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Structural-formula-of-apigenin_fig1_336079102 accessed 1 March, 2020
5. Alcalde, M. del Pozo, A. (2004) *Ácido Ursólico*: OFFARM. Barcelona 23(10) pág.153 elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-acido-ursolico-13069619
6. Naeem, M.; Masroor, M., Khan, A. (2012); Moinuddin, Anis; Triocontanol, research gate, 7(2) pág 129-132 Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Structural-formula-of-triacontanol-TRIA_fig2_254249527 accessed 3 March, 2020
5. Machado, Nélio. (1998). Fractionation of PFAD-Compounds in Countercurrent Columns Using Supercritical Carbon Dioxide as Solvent. Pag: 60
6. Chaturvedula, V.; Prakash, I. (2012). Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. International Current Pharmaceutical Journal. Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/publication/269563880_Isolation_of_Stigmasterol_and_Sitosterol_from_the_dichloromethane_extract_of_Rubus_suavissimus

7. Chérigo, L.; Salazar, M.; Martínez, S. (2015) Evaluation of Phytotoxic Activity of *Blechum Pyramidatum*, A Weed of Panamanian coffee crops – International journal of current research, 7(12) pág24 ; Scientific ResearchGate. Available from: <http://www.journalcra.com>.
8. Gupta, M.; Santana, A.; Espinosa, A (2004). *Plantas Medicinales de Panamá*. Panamá. pág 17-19.
9. Nurul, N.; Alhawarri, M.; Amir, M.; Dianita, R.; Mohd, A.; Nogawa, T.; Wahab, H. (2020) *Potencial Anti-Acetylcholinesterase Activity of Cassia timorensis DC. (Supplementary Information)*. *Molecules* Vol. 25(19) pág. 1-16. Available from: [doi:10.3390/molecules25194545-s001](https://doi.org/10.3390/molecules25194545-s001)