

RECONOCIMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS HOJAS DE *Ilex guayusa* Loes

RECOGNITION OF SECONDARY METABOLITES IN LEAVES OF *Ilex guayusa* Loes

*¹Guevara Cuasapud Lorieth Alejandra; ¹Gómez Barrera Milton

¹Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Grupo de investigación Búsqueda de Principios Bioactivos. Colombia. Correo electrónico: * laguevarac@uqvirtual.edu.co, miltongob@uniquindio.edu.co

Recibido 30 de agosto de 2019; aceptado 15 de mayo de 2020

RESUMEN:

Ilex guayusa Loes, es una planta nativa del noroeste de la amazonia, ha sido tradicionalmente cultivada y usada por diferentes comunidades indígenas para preparar bebidas rituales que actúan como estimulantes y eméticos. En el departamento de Nariño, tienen como tradición y costumbre utilizar las hojas de guayusa para aromatizar y dar un sabor diferente a las bebidas embriagantes autóctonas. En el caso del municipio de Ipiales (Nariño), usan estas hojas para la preparación de licor. Los métodos utilizados son: Tamizaje fitoquímico preliminar, fraccionamiento por cromatografía de columna de los diferentes metabolitos secundarios y análisis de estructura molecular por cromatografía de gases acoplada a masas HPLC. Esta investigación está centrada en conocer más sobre la planta *Ilex guayusa* Loes. Los resultados obtenidos podrán ser utilizados en industrias farmacéuticas en las que puedan usar sus propiedades y los metabolitos secundarios de ésta planta, para que puedan aportar

beneficios a la sociedad. Se ha detectado que las hojas de guayusa contienen alcaloides, taninos, y flavonoides que pueden usarse en la industria alimenticia.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.
¹Guevara Cuasapud Lorieth Alejandra E-mail:
laguevarac@uqvirtual.edu.co

Palabras clave: extracción, fitoquímica, *Ilex guayusa* Loes, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

Ilex guayusa Loes, is a native plant of the northwest of the Amazon, has been traditionally cultivated and used by different indigenous communities to prepare ritual drinks that act as stimulants and emetics. In the department of Nariño, they have as a tradition and custom to use guayusa leaves to aromatize and give a different flavor to native intoxicating drinks. In the case of the municipality of Ipiales (Nariño), they use these leaves for the preparation of liquor. The methods used are: preliminary phytochemical screening, fractionation by column chromatography of the different secondary metabolites and analysis of molecular structure by gas chromatography coupled to HPLC mass. This research is focused on knowing more about the *Ilex guayusa* Loes plant. The results obtained can be used in pharmaceutical industries in which they can use their properties and the secondary metabolites of this plant, so that they can contribute benefits to society. Guayusa leaves have been found to contain alkaloids, tannins, and flavonoids that can be used in the food industry.

Key words: extraction, phytochemistry, *Ilex guayusa* Loes, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos de las plantas se dividen en metabolitos primarios y secundarios basados en su función y vías biosintéticas. Los metabolitos primarios son sustancias orgánicas que se ocupan directamente de los procesos biológicos como el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. Por otro lado, los metabolitos secundarios generalmente no están implicados en los procesos biológicos principales, pero usualmente tienen funciones ecológicas importantes y desempeñan papeles imperativos en la protección de las plantas contra plagas, enfermedades y diversas tensiones ambientales. Estos metabolitos naturales son fuentes de los compuestos bioactivos utilizados en productos farmacéuticos, fármacos, cosméticos y fragancias. (Hatami, *et al*, 2016; Pua R, *et al.*, 2016).

La obtención de metabolitos secundarios de plantas es uno de los temas de mayor interés en la actualidad con el fin de buscar y conocer de donde provienen, los diferentes mecanismos de su producción (biosíntesis) y la utilización de estos en la planta para diferentes procesos que permitan su crecimiento, la utilización de estos en reemplazo de productos sintéticos, mostrando siempre un desarrollo del

conocimiento y ayudando a entender otras ramas de la ciencia. Algunas de las técnicas más utilizadas para el aislamiento y la purificación de estos metabolitos son las técnicas cromatográficas, las cuales comenzaron con la separación de compuestos de plantas con cromatografía de columna que permite visualizar la purificación por diferentes bandas coloreadas. (Vargas, 2011). Hoy día se están empleando diversas técnicas que favorecen el proceso de extracción y obtención de compuestos bioactivos de diferentes fuentes (Rodríguez y Blandón, 2019; Rincón, *et al.*, 2017; Pua, *et al.*, 2015).

La guayusa, *Ilex guayusa* Loes, una planta nativa del noroeste de la amazonia, ha sido tradicionalmente cultivada y usada por diferentes comunidades indígenas para preparar bebidas rituales, proporcionar energía y fortaleza a hombres y mujeres (Lewis *et al.*, 1991; Schultes, 1972).

El objetivo general del presente proyecto es realizar una caracterización fitoquímica reconociendo los metabolitos que contienen las hojas de *Ilex guayusa* Loes proveniente del corregimiento, la Victoria del municipio de Ipiales (Nariño) y verificar cuáles estimulan el sistema corporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el análisis fitoquímico preliminar se realizó los siguientes pasos:

1. **Recolección:** Se tuvo en cuenta datos específicos para la recolección como: hora, fecha, habitad en la que se encuentra la planta, ubicación geográfica y estado vegetativo de la planta. Se tuvo cuidado con la planta y se limpiaron las hojas.
2. **Secado:** Las hojas de la planta *Ilex guayusa* Loes fueron secadas a la sombra, con una temperatura máxima de 40°C. (Padilla-Frías, *et al.*, 2018).
3. **Triturado y tamizaje:** Cuando se obtuvo el material vegetal seco, se procedió a tritararlo para obtener un polvo fino el cual se pasó por un tamiz para dejar las partes más gruesas por fuera.
4. **Rectificación del solvente:** Por otra parte, se realizó la rectificación del etanol, para tener un alcohol más puro y así utilizarlo para obtener el extracto etanólico.
5. **Obtención del extracto:** Para esto se usó el alcohol anteriormente rectificado, etanol al 95%. El proceso de extracción se realizó colocando el material vegetal en un percolador y agregando etanol por la parte superior. El etanol resultante contenía el extracto de la planta.
6. **Concentración del extracto:** Este proceso se llevó a cabo en un rotaevaporador a una temperatura menor o igual a 40 °C. Lo que se hace es separar el extracto obtenido en el reflujo del solvente. Esto hace que el extracto este más concentrado para el siguiente proceso.
7. **Obtención de fracciones:** En esta parte se hizo un montaje de cromatografía en columna con el extracto y se utilizó diferentes solventes (baja polaridad, media y alta polaridad) los cuales arrastraron diferentes fracciones del contenido del extracto.
8. **Cromatografía capa fina:** Se realizó ésta cromatografía para juntar las fracciones anteriores que son similares. Hubo fracciones incoloras, las cuales fueron visibles por una lámpara de UV-Vis, fué fundamental tener una a lo largo de todo el proceso.
9. **Separación de compuestos:** Al juntar las fracciones con el anterior paso, se tomó las que tuvieran mayor cantidad y se preparó con ellas una columna pequeña ya que al realizar CCF éstas eran muy complejas. Las fracciones resultantes que fueron similares se juntaron nuevamente y se procedió a realizar cromatografía preparativa con las fracciones más abundantes.

10. **Otros análisis:** Por último, se realizan pruebas instrumentales en las que se pueda corroborar los resultados obtenidos en todo el proceso; una de estas pruebas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de

interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Conjuntamente a este proceso se realizó el tamizaje fitoquímico partiendo desde el extracto etanólico obtenido y se procedió a realizar las diferentes pruebas de identificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolección: Las hojas de la planta *Ilex guayusa* Loes fueron recolectadas en el corregimiento de La Victoria del municipio de Ipiales - Nariño. La Victoria cuenta con una muy buena parte de bosques no intervenidos, representados por una gran reserva de bosques en los que se encuentra una gran variedad de árboles nativos que sirven como refugio para distintas especies de animales y aves. (Pineda G, 2015).

Este procedimiento se realizó en plantas que estaban en fase adulta (ver figura 1), se recolectaron en horas de la mañana ya que es lo recomendado para que en sus hojas tengan la mayor cantidad de compuestos, esto se realizó entre 6:30 y 7:30 a.m., se tuvo cuidado de no dañarlas y solo se tomaron hojas sanas. Ver figura 2.



Figura 1. Planta *Ilex guayusa* Loes en fase adulta.



Figura 2. Hojas de guayusa recolectadas.

Secado: Las hojas de guayusa se dejaron secar a condiciones ambientales en el municipio de Potosí – Nariño. Ver figura 3.



Figura 3. Hojas de guayusa secándose.

Triturado y tamizaje: El triturado se realizó cuando el material vegetal se encontraba totalmente seco, incluso con las manos ya era fácil de desintegrar su forma (ver figura 4), esto se hizo en un molino eléctrico (ver figura 4)



Figura 4. Material vegetal seco y triturando.

Luego se procedió a tamizar para dejar el material fino y desechar las partes más gruesas. Ver figura 5.



Figura 5. Material vegetal tamizado.

Obtención del extracto: Éste proceso se realizó colocando el material vegetal en un percolador (ver figura 6) y se agregó etanol por la parte superior para que al pasar éste extrajera el extracto de la planta.



Figura 6. Percolador extrayendo el extracto de la hoja de guayusa.

Concentración del extracto: Este proceso se llevó a cabo en un rotaevaporador a una temperatura menor a 40 °C para no dañar el

extracto y dejar sus metabolitos secundarios en perfecto estado (ver figura 7). Al sacar el extracto se llevó a baño maría en una placa de porcelana para terminar de evaporar el solvente (ver figura 8).



Figura 7. Concentrando el extracto en el rotaevaporador.

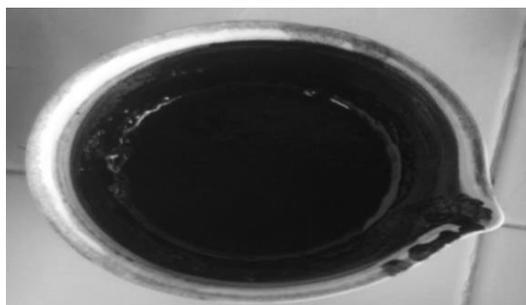


Figura 8. Extracto puro.

Cromatografía en columna: Se realizó el montaje para cromatografía en columna con el extracto obtenido anteriormente y se empezó a correr con cloroformo. Se obtuvieron 82 fracciones con cloroformo hasta que se confirmó, sembrando una placa con la última fracción, que el solvente no

arrastraba más compuestos del extracto; seguidamente se procedió a cambiar de solvente, acetato de etilo, con el fin de seguir extrayendo compuestos. Con éste solvente ya se han obtenido 80 fracciones y aun no se agotan los compuestos, por tal razón se sigue el proceso. Ver figura 9.



Figura 9. Cromatografía en columna inicial y en proceso.

Cromatografía en capa fina: De las fracciones obtenidas se ha hecho cromatografía de capa fina, con el fin de observar aquellos con características similares y poderlos unir, obteniendo así 13 de cloroformo y hasta la fecha, 12 de acetato de etilo. Ver figura 10 y 11.

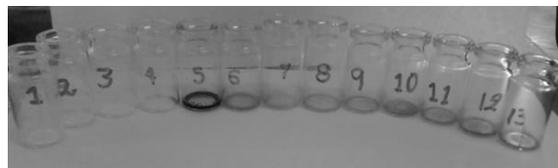


Figura 10. Fracciones obtenidas con cloroformo



Figura 11. Fracciones obtenidas hasta el momento con acetato de etilo

Separación de compuestos: Debido a que las primeras cuatro fracciones de cloroformo eran tan abundantes y complejas (ver figura 12), se decidió realizar una segunda cromatografía en columna para separar mejor sus componentes. Ver figura 13.

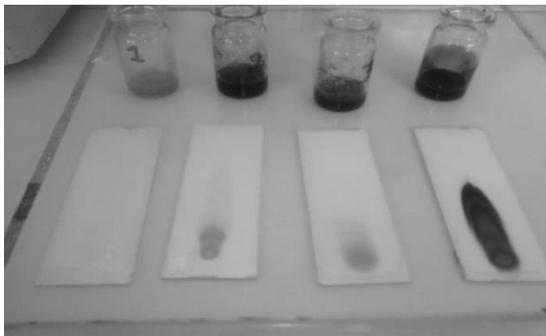


Figura 12. Primeras fracciones obtenidas con cloroformo con su respectiva CCF.



Figura 13. Segunda separación por cromatografía en columna.

Para las cuatro columnas se utilizó como solventes los mismos iniciales, cloroformo, acetato de etilo y metanol. Las fracciones obtenidas se volvían a juntar si eran similares.

La primera fracción de cada columna, marcadas como 1.1, 2.1, 3.1 y 4.1, vuelven a tener mayor abundancia (ver figura 14), por lo tanto se realiza una separación por cromatografía de placa preparativa y se ponen a correr con el mismo solvente, cloroformo. En la figura 15 se puede observar la separación que tiene cada una de las fracciones.



Figura 14. Primeras fracciones de las columnas.

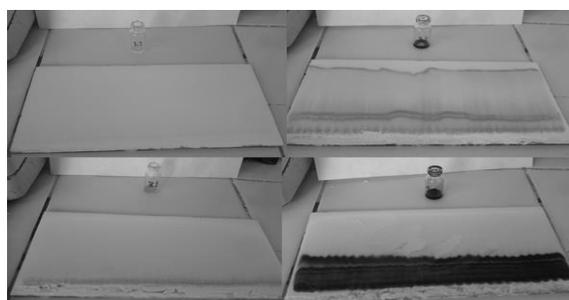


Figura 15. Cromatografía placa preparativa primeras fracciones de las columnas.

Como se observa en la parte inferior derecha de la figura 15, en la fracción 1 de la columna 4 no hay una buena separación, por lo tanto se vuelve a correr la placa con una mezcla de cloroformo y acetato de etilo (50-50). Ver figura 16.

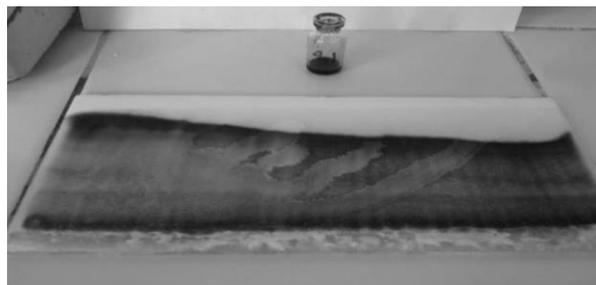


Figura 16. Cromatografía placa preparativa columna 4, mezcla cloroformo - acetato de etilo.

Con ayuda de la lámpara UV-Vis se pudo observar con facilidad las franjas en las que se dividía cada fracción obteniendo los siguientes resultados (Ver tabla 1):

Tabla 1. Numero de franjas observadas bajo UV-Vis.

Fracción 1 de Columnas	Número de franjas
1	7
2	7
3	4
4	6

Cada una de las franjas se las recolectó (ver figura 17) y se está realizando una cromatografía en columna corriendolas con cloroformo (ver figura 18), este procedimiento se realiza con el fin de obtener un compuesto más puro y posteriormente poder enviar a HPLC para tener certeza de los compuestos que se tiene.

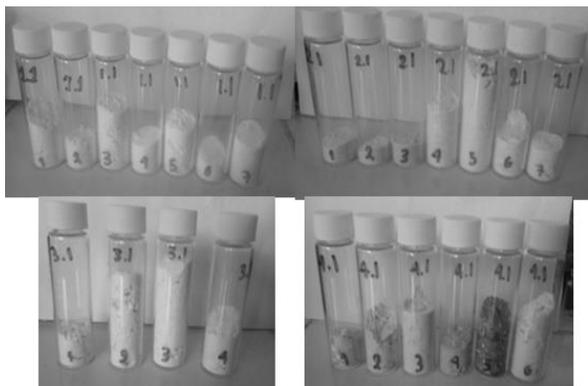


Figura 17. Franjas de sílice recolectadas de las placas preparativas.



Figura 18. Cromatografía en columna de las franjas de sílice recolectadas.

Simultáneamente a este proceso se ha venido realizando un tamizaje fitoquímico el cual ha arrojado los resultados vistos en la tabla 2. Aún falta realizar las pruebas para

CONCLUSIÓN

El presente proyecto de investigación se encuentra en proceso de desarrollo en el cual hasta el momento se puede concluir que

determinar la presencia de esteroides, cardiotónicos, cumarinas y lactonas terpénicas.

Tabla 2. Tamizaje Fitoquímico preliminar

METABOLITOS	PRUEBA	RESULTADO
Alcaloides	Reactivo Dragendorff	(+)
	Reactivo Mayer	(+)
	Reactivo Valsler	(-)
	Reactivo Reineckato de amonio	(+)
Flavonoides	Reacción de la Cianidina	(+)
	Reacción con HCl	(+)
Taninos	Reacción Gelatina - Sal	(+)
Naftoquinonas y/o Antroquinonas	Reacción de Borntrager - Crauss	(-)
Saponinas	Prueba de espuma	(-)
	Prueba de Hemólisis	(-)

Como se observa en la tabla 2 se encontró presencia de alcaloides, flavonoides taninos con potencial uso a nivel industrial.

las hojas de *Ilex guayusa* Loes contienen alcaloides, taninos y flavonoides que pueden usarse en la industria alimenticia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almanza H. Kevin, Navarro U. Miguel, Ruiz C. Javier (2019). Extracción de colorante en polvo a partir de la semilla de aguacate en variedades hass y fuerte. Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN 1692-7125. Volumen 17 N° 1. Pp: 5 – 14.
- Hatami, M., Kariman, K., Ghorbanpour, M. (2016). Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants.. *Science of the Total Environment* 571, 275–291. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/uniqueid/doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.048> Consultado: Noviembre 2016
- Lewis, W., Kennelly, E., Bass, G., Wedner, H., Elvin-Lewis, M., Fast, W. (1991). Ritualistic Use of the Holly Ilex guayusa by Amazonian Jivaro indians. *Journal of Ethnopharmacology* p 25–30.
- Padilla-Frías, Keyla Andrea Granados-Conde, Clemente Leon-Mendez, Glicerio Arrieta Pineda, Yurica y Torrenegra-Alarcon, Miladys (2018). Evaluación de la influencia de la temperatura en procesos de secado. Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN 1692-7125. Volumen 16 N° 2. Pp: 107 – 117.
- Pineda, Gilberto Oswaldo Y La Victoria E., (2015). El Sur-oriente de Ipiales, aspectos históricos y geográficos. Primera edición, Ipiales – Nariño, p 28-37-38.
- Pua R., Amparo L., Barreto R., Genisberto E., González A., Jessica., Acosta V., César. (2016). Composición nutricional de las hojas del silbadero (*geoffroea spinosa jacq*) del municipio de tubará (Atlántico). Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN 1692-7125. Volumen 14, N° 1, p. 38 -48
- Pua, R. Amparo L. y Barreto, G. R., Ariza, C. S. (2015). Extracción y caracterización de la pectina obtenida a partir de la cáscara de limón Tahití (*citrus x latifolia*) en dos estados de maduración. Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN 1692-7125. Volumen 13, N° 2, pp: 180 - 194.
- Rincón E. Jessica P., Torres B. Darwin F., Rodríguez Q. Sandra P. (2017). Extracción y caracterización de glucano obtenido de la vaina de la moringa (*moringa oleifera*). Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN 1692-7125. Volumen 15 N° 1. Pp:28 – 41.

Rodríguez S. Patricia y Blandón C. Natalia.
(2019). Evaluación del efecto de la aplicación de pre-tratamientos con ultrasonido sobre el nivel de extracción de aceite de la semilla de árbol neem (*Azadirachta Indica A. Juss.*). Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. ISSN 1692-7125. Volumen 17 N° 1. Pp: 60 -79..

Schultes, R. E. (1972). Ilex guayusa from 500 A.D. to the present. Etnologiska Studier 32.

Vargas, J. (2011). Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Wigandia urens*. Recuperado de:
<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2559/547756V297.pdf?sequence=1>