

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**"AISLAMIENTO, VERIFICACION E  
IDENTIFICACION DEL PRINCIPIO ACTIVO  
RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA  
DE LAS HOJAS DE Bixa orellana  
(ACHIOTE)".**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

JOHANNA CHEW DE CAMPOS

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO

GUATEMALA, JULIO DE 1997.



06  
T(1821)  
C.4

JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO: LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR

SECRETARIO: LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA

VOCAL I: LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ

VOCAL II: LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN

VOCAL III: LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE

VOCAL IV: BR. ANA MARIA RODAS CARDONA

VOCAL V: BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

DEDICATORIA.

DEDICO ESTE ACTO:

A DIOS

A LA SANTISIMA VIRGEN MARIA

A MI MADRE: LIDYA ESPERANZA CHEW FRANCO

A MI ESPOSO: ALEX GUSTAVO CAMPOS

A MI HIJO: JONATHAN ALEJANDRO

A MIS FAMILIARES, EN ESPECIAL A:  
AURALICIA CHEW, OFELIA DE ZAMUNER, ANA DE ESCOBAR,  
MARGARA, MARIO Y BYRON CHEW

A LA FAMILIA CAMPOS HERNANDEZ, ESPECIALMENTE A:  
ELBA, IRIS, VINICIO Y LUDWING

A MIS AMIGAS, EN ESPECIAL A:  
NEREIDA DE CABRERA, KALINA DE VIDAURRE,  
ELIZABETH ALVAREZ Y KARLA ALDANA

A LA SEÑORA ROSA VDA. DE GODOY

A MIS PROFESORES, EN PARTICULAR A:  
LICDAS.: YOLANDA DE CHAVEZ, FLORA DE SCHELL,  
THELMA DE GALLARDO, JEANNETTE WYLER Y DIANA PINAGEL.

AL PERSONAL DOCENTE Y ADMINISTRATIVO  
DE LA ESCUELA DE QUIMICA EN ESPECIAL A:  
LICDAS.: NOHEMI OROZCO, NORA GUZMAN, FLOR DE MARIA LARA,  
SILVIA DE OROZCO, JULIETA DE PEZZAROSSO, ROSE MARIE DE GONZALEZ.

## AGRADECIMIENTOS.

A FARMAYA POR EL APORTE DEL EXTRACTO DE Bixa orellana.

AL DEPARTAMENTO DE CITOLOGIA DE LA ESCUELA DE QUIMICA BIOLÓGICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA, USAC; POR LA COLABORACION EN LOS BIENSAYOS.

A LA UNIDAD DE ANALISIS INSTRUMENTAL Y AL DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA DE LA ESCUELA DE QUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA, USAC; POR FACILITAR LAS INSTALACIONES, EQUIPO Y REACTIVOS NECESARIOS PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO, EN PARTICULAR A LA LICDA DIANA PINAGEL Y AL SR. RICARDO LOPEZ.

AL DR. LUCA RASTRELLI DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SALERNO, ITALIA; POR SU VALIOSA COLABORACION EN LA PURIFICACION Y ELUCIDACION DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LAS HOJAS DE Bixa orellana.

DE MANERA MUY ESPECIAL AGRADEZCO A LA LICDA. AURA PADILLA ARREAGA POR SU ORIENTACION, ASESORIA Y AMISTAD YA QUE GRACIAS A ELLO FUE POSIBLE CULMINAR ESTE TRABAJO.

## INDICE.

CONTENIDO	PAGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	5
4. JUSTIFICACIONES	13
5. OBJETIVOS	14
6. HIPOTESIS	15
7. MATERIALES Y METODOS	16
8. RESULTADOS	20
9. DISCUSION DE RESULTADOS	26
10. CONCLUSIONES	35
11. RECOMENDACIONES	37
12. REFERENCIAS	38
13. ANEXOS	43

## 1. RESUMEN.

Las hojas de Bixa orellana secas y molidas (500g) fueron proporcionadas por FARMAYA. Se efectuaron 3 extracciones con disolventes de diferente polaridad en frío hasta llegar a etanol al 80%. Se usaron aproximadamente 2.5 L de disolvente cada vez, obteniéndose en total 7.5 L de extracto (exto) madre.

El exto. madre etanólico se concentró en rotavapor a una temperatura de 55°C, hasta llevarlo a una consistencia pastosa.

El fraccionamiento fitoquímico del exto. madre se llevó a cabo en una columna empacada con 100g de Sephadex y 600 mL de metanol en un tubo de vidrio de 65 cm. de alto por 5 cm. de diámetro. Se eluyó con metanol a un flujo de 0.2 mL/min, se obtuvieron 6 fracciones.

A las fracciones se les realizaron bioensayos, obteniendo resultado para las fracciones 1, 3, 4, y 6 de estas únicamente la fracción 3 presentaba actividad antifúngica positiva a una concentración < 1 mg/mL.

La fracción activa continuó fraccionándose vía Sephadex LH-20 y metanol como eluyente, colectándose 75 fracciones de 3 mL cada una. Estas fracciones se puntuaron en cromatoplasmas de sílica gel y se corrieron con una mezcla de disolventes: butanol:ácido acético:agua (60:15:25), todas las cromatoplasmas se revelaron con solución de sulfato de cerio saturada en ácido sulfúrico. Con esto se determinó cuales fracciones eran iguales y por lo tanto podían unirse. Al final se llegó a 4 fracciones las que se rotaevaporaron a una temperatura de 55°C, cuando se tenían unos 2 mL de cada uno de los extractos se dejaron en viales destapados para que se terminaran de evaporar al ambiente. Las fracciones I a IV fueron llevadas a Italia por el Dr. Luca Rastrelli de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno, Italia; para su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Espectrometría de Masas (FABMS) (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) protónica y de  $^{13}\text{C}$  para la elucidación estructural de los compuestos presentes en dichas fracciones.

Por medio de análisis en cromatografía en capa fina (CCF) y pruebas químicas vía húmeda se determinó que en las fracciones II y III habían compuestos de interés fitoquímico y farmacológico. La CCF reveló que estos compuestos eran de tipo flavonoide. Además la CCF indicaba que ambas fracciones tenían los mismos compuestos solo que en III estaban mas concentrados, por lo que solo se trabajo con III.

La purificación de los compuestos presentes en la fracción activa se realizó por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa con una columna WATERS  $\mu$ -Bondapak C-18 semipreparativa de 30 cm de longitud y 7.8 mm de diámetro, una mezcla de metanol agua (50:50) como eluyente; un flujo de 2.5 mL/min y un detector de índice de refracción Varian RI-4.

En la fracción III se aislaron 4 compuestos:

1. quercetina-3-O-rutinoside
2. quercetina-3-O-robinobioside
3. isoramnetina-3-O-rutinoside
4. isoramnetina-3-O-robinobioside

La identificación de estos compuestos se logró por los análisis de los espectros FABSM y RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT  $^{13}\text{C}$  que se realizó con la ayuda del Dr. Luca Rastrelli de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno, Italia.

La parte correspondiente al fraccionamiento y separación de los extractos se hizo en la Unidad de Análisis Instrumental y el Departamento de Química Orgánica ambos de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (CC QQ) de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). Las pruebas biológicas se realizaron con la colaboración del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de CC QQ y Farmacia de la USAC, mientras que el objetivo general del trabajo que era la purificación e identificación de los metabolitos se logró con la ayuda del Dr. Rastrelli.

La conclusión principal a la que se llegó fue que la actividad antifúngica de las hojas de B. orellana se debe a la presencia de compuestos de tipo flavonoide en ellas.

## 2. INTRODUCCION.

Las plantas tienen diversidad de usos, entre los cuales pueden mencionarse los siguientes: comestibles, medicinales, ornamentales e industriales. En el presente trabajo se ha centrado la atención en la planta Bixa orellana conocida popularmente como achiote, la cual se ha utilizado principalmente como colorante alimenticio (1). El achiote posee también propiedades medicinales pues se ha utilizado como diurético, antifúngico, antibacteriano y antihipoglucémico (2).

Esta investigación tiene como fin aislar, verificar e identificar los compuestos responsables de la actividad antifúngica de las hojas de la B. orellana, para lo cual es necesario encontrar la mejor ruta fitoquímica capaz de extraer al principio activo responsable de dicha actividad. La parte experimental a seguir comprende dos fases:

### Fase I:

- recolección del material vegetal a estudiar: hojas de achiote, las que fueron proporcionadas por FARMAYA listas para analizar, en forma de hojas secas (secadas al sol) y molidas
- extracción y fraccionamiento químico de las hojas utilizando disolventes de diferente polaridad
- evaluación de los extractos (positivo o negativo) para la actividad antifúngica por medio de pruebas biológicas con las cinco especies de hongos mencionadas en 6.3.2.5

### Fase II:

- tamizaje fitoquímico de los extractos que presenten actividad antifúngica
- purificación de cada uno de los extractos con actividad antifúngica positiva
- determinación del extracto con mayor actividad antifúngica
- aislamiento y elucidación de estructuras químicas por medio de Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía de Permeación en Gel en Columna Abierta, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Espectroscopía Infrarroja (IR), Espectroscopía Ultravioleta (UV),



Resonancia Magnética Nuclear (RMN) protónica ( $^1\text{H}$ ) y de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) y por último Espectrometría de Masas de tipo FABMS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry).

Esta investigación se llevó a cabo con el apoyo de diferentes instituciones y países. La parte correspondiente a los bioensayos, tanto en el extracto madre como en los extractos purificados, se realizó en el Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). El fraccionamiento fitoquímico y la purificación de los extractos se hizo en la Unidad de Análisis Instrumental y en el Departamento de Química Orgánica de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC, mientras que la identificación se hizo con apoyo del Dr. Luca Rastrelli de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno, Italia.

El hecho de que en Guatemala existan numerosas plantaciones de achiote permite realizar investigaciones que tengan como fin encontrar otros usos que beneficien a la población, en este caso los cultivos se aprovecharían en mayor grado y a la vez se pondrían en el mercado medicamentos eficaces y de bajo costo.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 2.1 ESTUDIOS REALIZADOS.

##### 2.1.1 ESTUDIOS FITOQUIMICOS.

Los primeros estudios de las hojas de B. orellana reportaban que estas contenían leucocianidina, ácido elálgico y dos flavonoides no identificados (3). La presencia de ácido elálgico fue confirmada mas tarde por Lebreton y Bouchez (4).

De acuerdo con R. Scherry, (5) en la pulpa de la semilla de B. orellana se encuentran dos pigmentos: la bixina y la orellina.

W. Schneider, et al. (6) indican que se encontró en B. orellana, el ácido tomentósico (figura 1), el que posteriormente fue convertido en su triacetato. Este último, presentó una estructura idéntica al del ácido obtenido a partir de la especie Terminalia tomentosa.

M. Chaco, et al. (7) describen el procedimiento para la obtención de un sesquiterpeno a partir de las hojas de B. orellana, para el cual sugirieron el nombre de bixaganeno. Las características físicas y la composición elemental encontrada y los trabajos realizados para obtener la fórmula estructural, sugirieron un sesquiterpeno tricíclico que contiene un doble enlace oleofínico tetrasustituido y tres grupos metílicos, con una fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$ .

B. Lawrence, y J. Hogg; (8) indican que a partir del aceite de las hojas de B. orellana, se obtuvo un hidrocarburo sesquiterpénico, el que se identificó como ishwarano (figura 1); igualmente fueron identificados los monoterpenos y sesquiterpenos.

J. Harbone (9) indica que tres nuevas flavonas bisulfato fueron aisladas de las hojas de B. orellana, las que fueron identificadas como 7-bisulfato de apigenina, 7-bisulfato de luteolina y 8-bisulfato de hipolaetina (figura 2).

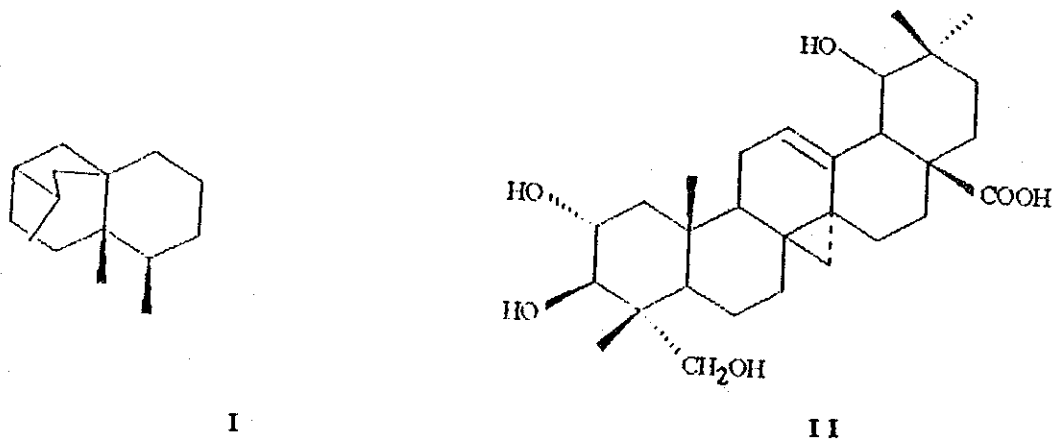


Figura no. 1. Fórmulas estructurales de compuestos químicos aislados de B. orellana. I. Ishwarano. II. Acido tomentósico.

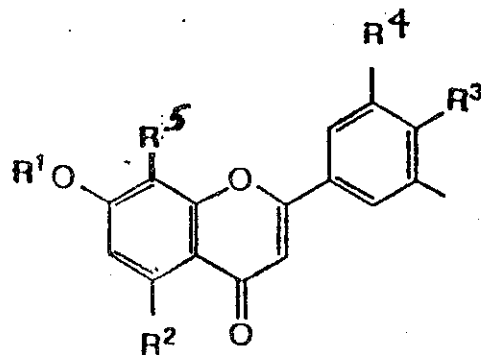


Figura no. 2. Estructura de las flavonas aisladas por J. Harbone (9).

1. 7-bisulfato de apigenina.  $R_1 = \text{KHSO}_4$ ,  $R_2 = R_3 = -\text{OH}$ ,  $R_4 = R_5 = -\text{H}$
2. 7-bisulfato de luteolina.  $R_1 = \text{KHSO}_4$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = -\text{OH}$ ,  $R_5 = -\text{H}$
3. 8-bisulfato de hypolaetina.  $R_1 = R_2 = -\text{OH}$ ,  $R_3 = R_4 = -\text{H}$ ,  $R_5 = \text{KHSO}_4$ .

E. Pinto, (10) realizó un análisis químico cualitativo del extracto metanólico (80%) de tallo, hojas y semillas de la B. orellana encontrando lo siguiente:

- |                              |          |
|------------------------------|----------|
| - alcaloides cuaternarios    | negativo |
| - alcaloides no cuaternarios | negativo |
| - saponinas                  | negativo |

- esteroides insaturados	positivo
- cardenólicos	positivo
- bufadienólicos	negativo
- flavonoides	negativo
- leucoantocianinas	negativo
- taninos	positivo
- polifenoles	positivo
- antraquinonas	negativo
- glicósidos cianogenéticos	negativo

Monjes (11), utilizando el extracto despigmentado de semillas de B. orellana, identificó los siguientes compuestos:

- ésteres metílicos	
- esteroides: $\beta$ -sistosterol, ergosterol y vitamina D	
- glicéridos	
- ácidos grasos:	
laúrico	trazas
mirístico	1.32%
palmitico	21.40%
palmitoleico	1.08%
esteárico	2.85%
oléico	15.70%
linoléico	56.00%
linolénico	1.65%

De las hojas se ha aislado un sesquiterpeno tetracíclico denominado bisígeno. La semilla es rica en sustancias colorantes y contiene un 80% de bixina soluble en alcohol, la cual es de color rojo y 20% de orelina soluble en agua, la cual es de color amarillo. Las semillas también son ricas en alcaloides tóxicos y el aceite rico en un raro sesquiterpeno tetracíclico hidrocarburo insaturado (2).

### 2.1.2 ESTUDIOS FARMACOLOGICOS.

Desde tiempos remotos, la pulpa de achiote ha sido utilizada por los indígenas para pintar sus cuerpos y pelo; así como para repeler insectos y protegerse de las quemaduras del sol. Además, el achiote es utilizado ampliamente como colorante alimenticio (1).

En muchas partes del mundo, las diferentes partes de B. orellana o achiote han sido utilizadas para remediar muchos males. En México, las hojas perforadas y maceradas con agua dan una sustancia resinosa que se utiliza como diurético, purgante y para el tratamiento de la gonorrea (2). La misma sustancia tomada en poción es purgante y desinflamatoria. La pulpa roja mezclada con aceite se administra oralmente para detener la diarrea y como febrífugo (12). La cápsula que contiene la semilla se hierve y la decocción tomada se utiliza para la diarrea y como febrífugo (13). Además se emplea para evitar cicatrices en pequeñas heridas, salpullido e inflamaciones (14). La decocción de las raíces es usada en el tratamiento de enfermedades venéreas como la gonorrea; también es utilizada en las hemorragias post-parto (15).

Se ha reportado en Perú la actividad diurética en una infusión en caliente, tanto de las semillas secas como de las hojas (16).

En Trinidad, las hojas con semillas de sapodilla y café salvaje son utilizadas en decocción como diurético (17).

Los extractos acuosos de la raíz tienen efectos hipoglucemiantes en ratas albinas a partir de 30g/Kg; el efecto se hace más evidente con dosis de 50g/Kg, poniéndose de manifiesto que a medida que aumenta la concentración de la raíz de la planta el efecto hipoglucemiante se hace más significativo (18).

La actividad tricomonocida *in vitro* se estableció mediante la cuantificación de *Trichomonas vaginalis*, los resultados obtenidos demuestran que el achiote presenta actividad tricomonocida (19).

La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de fruto y hojas ha sido estudiada *in vitro* sobre *Staphylococcus*

*aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, los cuales demostraron la actividad antibacteriana (20,21).

La actividad hipotensora y antisecretora gástrica en los extractos acuosos de la raíz ha sido demostrada *in vivo* en ratas. También posee actividad depresora del sistema nervioso central. La decocción de hojas induce la contracción del útero de la rata (20,21).

Los extractos acuoso y clorofórmico de la semilla, poseen actividad hipoglucémica no insulino dependiente en el perro. El extracto alcohólico, al contrario, provoca hiperglicemia. Algunos trabajos ponen en evidencia un estímulo de la circulación sanguínea en casos de hematoma (20,21).

La actividad antibacteriana de hojas, tallo, flores y fruto fue estudiada por Salvador AL (22), dicho estudio confirmó esta actividad principalmente en tallo y hojas, contra las siguientes bacterias:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli* enteropatógena
- *Salmonella typhi*
- *Shigella flexneri*
- *Streptococcus pyogenes*

y contra los siguientes hongos:

- *Candida albicans*
- *Aspergillus flavus*
- *Epidermophyton floccosum*
- *Microsporium gypseum*
- *Trichophyton rubrum*

Además en este trabajo se determinó que el mejor sistema de disolventes que extrae el principio activo responsable de la actividad antimicrobiana es el etanol al 50% seguido de etanol al 80% (22).

## 2.2 Bixa orellana.

### 2.2.1 DESCRIPCION DE LA PLANTA.

Arbol pequeño de hasta 5 m de altura, en Guatemala ha llegado a alcanzar 12 m. Hojas alternas acorazonadas, 15 cm de largo por 10 cm de ancho. Flores grandes, 4 cm de diámetro, con 5 pétalos, de color blanco o rosado. Estambres numerosos de color morado. El fruto es una cápsula de 3 cm, de color café y completamente cubierta de espinas. En la cápsula se encuentran muchas semillas rodeadas de una pulpa de color rojo (18).

### 2.2.2 CLASIFICACION BOTANICA.

- Reino: Vegetal
- Subreino: Fanerógamas, endoprotaleas, espermatofitas
- Subtipo: Angiospermas o estigmadas
- Clase: Dicotiledóneas
- Sub-clase: Dialipétalas superovarieas, polestemona
- Orden: Ranunculíidas
- Familia: Bixácea
- Género: *Bixa*
- Especie: *orellana*
- Nombre común: Achiote (23)

### 2.2.3 ORIGEN Y DISTRIBUCION.

Planta nativa del continente americano, se ha descrito desde México hasta Bolivia en alturas de hasta 1,000 m. En Guatemala se cultiva por su producción de colorante en los siguientes departamentos: Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, El Progreso, Jutiapa, Zacapa, Chiquimula, Santa Rosa, Escuintla, Quetzaltenango y Chimaltenango. Se han encontrado algunas variedades en Guatemala y Centroamérica, tales como: *B. orellana* var *urucurana*, distribuida en El Petén, Retalhuleu, Jutiapa, Santa Rosa y Escuintla; *B. orellana* var *leicocarpa*, la cual se ha encontrado en El Petén, Santa Rosa, Sololá y Sacatepéquez, pero probablemente se encuentra en todos los departamentos agrícolas.

Ambas variedades son diferenciables por el fruto, la primera tiene un fruto globoso de medidas variables y densamente cubierto de espinas flexibles y la segunda variedad tiene un fruto con cubierta uniforme, espinosa y dura. Florece en noviembre y se cosecha en marzo y abril (1,20,24,25).

#### 2.2.4 USOS.

Se utiliza toda la planta en el tratamiento de la disenteria, diarrea, vómitos, dolor de estómago, gastritis, hemorroides, indigestión, estreñimiento, flatulencia, para tonificar el apetito, afecciones hepáticas, inflamación de la garganta, asma, pleuresia, diabetes, oliguria, dolor de oído, dolor de cabeza, infecciones del ombligo; la parte roja que cubre las semillas se emplea acontra erupciones de la piel, salpullido y quemaduras; la decocción de la raíz se utiliza en tratamientos contra enfermedades de transmisión sexual como gonorrea y también en leucorreas y en hemorragias postparto (12,13,20,25,26,27).

La población utiliza la semilla como colorante de las comidas. Los indígenas se pintaban el cuerpo con achiote durante los ritos y también como repelente de insectos (12,13,20,25,26,27).

#### 2.2.5 COMPOSICION QUIMICA.

La B. orellana contiene: 8% de humedad, 14.42% de proteínas, 4.5% de cenizas, 3.96% de grasas, 13.8% de celulosa, 55.5% de carbohidratos. Los minerales: calcio, fósforo, hierro. Las vitaminas: tiamina, niacina, ácido ascórbico (2). La fruta (pulpa) contiene vitamina A en cantidad de 1,000 a 2,000 UI/g del extracto oleaginoso, y contiene vitamina D en una cantidad aproximada de 150 UI/g del extracto (1,26). Además la pulpa contiene 54 calorías por cada 100 g, 84.4% de agua, no contiene proteínas, 0.3% de grasa, 14.3% de carbohidratos, 0.5% de fibra, 1% de ceniza, 7 mg/100g de calcio, 10mg/100g de fósforo, 5mg/100g de hierro, 90µ/100g de caroteno, 0.05 mg/100g de riboflavina, 0.3 mg/100g de niacina y 2 mg/100g de ácido ascórbico (27).

También contiene colorantes ricos en aminoácidos esenciales;



12% de proteínas,  $\beta$ -caroteno de 6.8% a 11.3%, 2% de otros carotenos (entre ellos: criptoxantina, norbixina, euxina, metilbixina y bixina) (27).

Las harinas completas contienen entre 13.7% a 15.6% de proteínas, 15.8% a 16.3% de fibra cruda y aminoácidos en abundancia del tipo triptófano, lisina, treonina, arginina, histidina y valina. Las semillas contienen 13.1% de proteínas, 5% de grasas y 5.4% de cenizas (27).

#### 4. JUSTIFICACIONES.

Las plantas medicinales son una riqueza natural de Guatemala. La población por su idiosincracia y tradición las utiliza como remedios caseros para tratar sus enfermedades particulares, sin embargo, es necesario efectuar estudios fitoquímicos para identificar los compuestos responsables de estos efectos con lo que puede lograrse su validación científica.

La B. orellana o achiote, es una planta muy utilizada en el tratamiento de diversas afecciones. La actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Mycrosporium gymseum* y *Trichophyton rubrum* fue investigada y verificada por Salvador AL (22), aunque no se llegó a establecer que compuesto o compuestos son los responsables de dicha actividad. Es importante llegar a elucidar la estructura del compuesto o compuestos responsables de la actividad antifúngica, con lo cual podrían elaborarse productos medicinales económicamente accesibles a la población.

## 5. OBJETIVOS.

### 4.1 GENERAL:

Aislar e identificar el o los compuestos responsables de actividad antifúngica de las hojas de B. orellana (achiote) por medio de métodos físicos, químicos e instrumentales.

### 4.2 ESPECIFICOS:

4.2.1 Realizar el fraccionamiento fitoquímico del extracto madre.

4.2.2 Determinar por medio de bioensayos, la fracción con mayor actividad antifúngica.

4.2.3 Realizar pruebas y análisis químicos e instrumentales a la fracción con mayor actividad antifúngica con el fin de proporcionar información suficiente para la elucidación parcial de la estructura.

4.2.4 Determinar el grupo o grupos funcionales de la molécula responsables de la actividad antifúngica.

4.2.5 Identificar la estructura química del compuesto responsable de la actividad antifúngica por medio de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.

## 7. MATERIALES Y METODOS.

### 6.1 UNIVERSO

Plantas de B. orellana

### 6.2 MUESTRA

Hojas de B. orellana

### 6.3 RECURSOS

#### 6.3.1 Humanos

Br. Johanna Chew de Campos, autor

Licda. Aura Elizabeth Padilla Arreaga, asesor

#### 6.3.2 Materiales

##### 6.3.2.1 Recursos Físicos

- Unidad de Análisis Instrumental (UAI)
- Departamento de Química Orgánica, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC.

##### 6.3.2.2 Equipo y Aparatos

- Rotavapor Büchi 15060107
- Cromatoplasmas de sílica gel 60F-254
- Columna cromatográfica de vidrio de 3x50cm
- Espectrofotómetro Infrarrojo PE-283
- Espectrofotómetro UV-VIS PE-Lambda III
- Balanza analítica AND 0-200g FR-200
- Balanza semianalítica O'Hauss 0-2kg GT-4100
- Horno de convección VWR 1300U
- Desecadora

##### 6.3.2.3 Cristalería

- Balones de fondo redondo con unión esmerilada 24/40 de 250 y 1000 mL
- Vasos de precipitados de 50, 250 mL y 1000 mL
- Probetas de 100 mL

- Matraces erlenmeyer de 25 y 250 mL
- Tubos de ensayo de 10x950mm
- Cámara cromatográfica de vidrio de 250x40x80mm
- Micropipetas de vidrio
- Agitadores de vidrio
- Vidrios de reloj

#### 6.3.2.4 Reactivos

- Metanol para análisis (p.a)
- Etanol al 80%
- n-Butanol p.a
- Acido acético p.a
- Acetona p.a
- Diclorometano p.a
- Cloroformo p.a
- Anisaldehído
- Solución de sulfato de cerio saturada en ácido sulfúrico al 10%
- Sílica gel G-60
- Sephadex LH-20

#### 6.3.2.5 Cepas de cinco hongos

- |                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| - <i>Candida albicans</i>         | ATCC 10231 |
| - <i>Aspergillus flavus</i>       | A-75 CCQG  |
| - <i>Epidermophyton floccosum</i> | 761 IGSS   |
| - <i>Microsporium gymseum</i>     | M-71 CCQG  |
| - <i>Trichophyton rubrum</i>      | T-3.5 CCQG |

#### 6.3.3 METODOS

##### Procedimiento:

- a) Obtención del material vegetal a analizar: hojas de achiote. Este material lo proporcionará FARMAYA ya seco y molido.
- b) Obtención del extracto madre. El material vegetal ya seco y molido se coloca en una percoladora de vidrio y se le agregan disolventes con gradiente de polaridad empezando con hexano, luego cloroformo y por último etanol al 80%. Cada uno de los

disolventes se agrega en tres porciones sucesivas de 1L cada una (pueden ser hasta 5, dependiendo de la intensidad del color de las fracciones). Entre cada porción se deja reposar el solvente por una noche, luego se recolecta y se guarda hasta que se tienen todas las fracciones. La fracción que interesa es la etanólica pues ya se estableció en el trabajo de Salvador AL (22) que presenta actividad biológica contra los hongos mencionados en 6.3.2.5.

c) Concentración del extracto madre. Se obtienen como mínimo 3L de extracto madre, los cuales se concentran en rotavapor a una temperatura no mayor de 55°C hasta llegar a una consistencia pastosa.

d) Cromatografía en columna con Sephadex. Se pesan entre 1 y 3 g de extracto madre y se disuelven con la menor cantidad posible de metanol. Se empaca una columna de vidrio de 3x50 cm utilizando 100 g de Sephadex y 500 mL de metanol y se deja reposar hasta que toda la fase estacionaria se empaque bien. Se eluye el extracto madre en la columna (por gravedad) utilizando metanol como fase móvil. Se colectan las fracciones en tubos de ensayo, deben obtenerse aproximadamente 3 mL y cambiar de tubo, hasta que todo el extracto ha eluido.

e) Cromatografía en capa fina. Todas las fracciones obtenidas se analizan por cromatografía en capa fina utilizando 2 diferentes fases móviles: butanol:agua:ácido acético (60:25:15) y cloroformo:metanol:agua (80:18:2) para determinar cuales son las que pueden unirse.

f) Realización de bioensayos. Las fracciones obtenidas en d) y e) se concentran nuevamente en rotavapor y se llevan a una consistencia pastosa, se anota el peso de cada una y se prueba su actividad antifúngica contra las 5 especies de hongos que se mencionan en 6.3.2.5. Estos bioensayos los realizará el Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC. En esta parte se determinará cual de las fracciones obtenidas presenta mayor actividad, es decir contra todas o el mayor número

de especies de hongos en estudio.

g) La fracción con mayor actividad antifúngica se refracciona con Sephadex LH-20, obteniéndose de nuevo fracciones que deben colectarse y estudiarse por cromatografía en capa fina para determinar cuales son iguales. Estas fracciones ya unidas se rotavaporean a un volumen mínimo y se dividen en dos partes.

h) Una parte de las fracciones obtenidas en g) se enviarán para su purificación con el Dr. Luca Rastrelli, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno, Italia, lo cual se realizará por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa utilizando una columna WATERS  $\mu$ -Bondapak C-18 semipreparativa, una mezcla de metanol-agua (50:50) como eluyente; un flujo de 2.5 mL/min y un detector de índice de refracción Varian RI-4.

i) La otra parte de las fracciones obtenidas en g) se les harán pruebas químicas vía húmeda y espectroscopía infrarroja para obtener información acerca del (os) probable (s) grupo (s) funcionales del (os) compuesto (s) presente en dichas fracciones.

j) Los compuestos que se obtengan de h) se identificarán completamente por medio de espectrometría de masas de rápido bombardeo atómico de alta resolución (FABMS) y resonancia magnética nuclear (RMN) protónica y de carbono 13 con el apoyo del Dr. Luca Rastrelli de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno, Italia.

#### 6.3.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

- Por ser el trabajo una determinación cualitativa de compuestos fitoquímicos presentes en el extracto de las hojas de B. orellana no se utilizará un método estadístico específico.

## B. RESULTADOS.

### 8.1 OBTENCION DEL EXTRACTO MADRE.

Luego de las extracciones en frío con etanol al 80% se obtuvo 71 de extracto madre, que luego de rotavaporearlos pesaron 26.1g.

### 8.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO MADRE.

Se realizó un primer fraccionamiento en columna empacada con Sephadex LH-20 de donde se colectaron 6 fracciones:

Tabla no. 1. Coloración de las fracciones obtenidas en el primer fraccionamiento.

Fracción No.	COLOR
1	café
2	verde oscuro
3	verde claro
4	verde-amarillo
5	amarillo oscuro
6	anaranjado

### 8.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES.

Tabla no. 2. Actividad antifúngica de las fracciones de B. orellana (1 mg/mL) y de dos blancos (extractos de zanahoria en etanol al 80% y en acetona).

Fracción No.	1	2	3	4	5	6	B1	B2
Hongo								
<i>C. albicans</i>	>1	>1	<1	>1	>1	>1	—	—
<i>A. flavus</i>	>1	>1	<1	>1	>1	>1	—	—
<i>E. floccosum</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	—	—
<i>M. gymseum</i>	>1	>1	<1	>1	>1	>1	—	—
<i>T. rubrum</i>	>1	>1	<1	>1	>1	>1	—	—



Esta tabla mostró que únicamente la F3 tiene actividad antifúngica contra 4 de los hongos en estudios a una concentración menor de 1 mg/ml.

#### B.4 REFRACCIONAMIENTO DE F3.

La F3 (con mayor actividad positiva) se refraccionó en la columna empacada con Sephadex utilizando metanol como fase móvil. Fracciones obtenidas: 75 de aproximadamente 3 ml c/u.

#### B.5 ANALISIS DE LAS FRACCIONES DE F3 POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Las fracciones se puntearon en cromatoplasmas de sílica gel, se utilizó como fase móvil butanol:ácido acético:agua (60:15:25). Las placas se revelaron con Sulfato de cerio en ácido sulfúrico. En este punto se determinó que las fracciones iguales eran:

Cuadro no. 1. Fracciones iguales del F3 de B. orellana.

Bo.1	1-9
Bo.2	10-14
Bo.3	15-24
Bo.4	25-37
Bo.5	38-47
Bo.6	48-57
Bo.7	58-66
Bo.8	67-72
Bo.9	73-75

Un nuevo análisis por CCF de estas fracciones determinó que se podían reagrupar las siguientes fracciones:

Cuadro no. 2. Reagrupamiento de las fracciones por CCF.

Bo.1-Bo.4	I
Bo.5	II
Bo.6-Bo.7	III
Bo.8-Bo.9	IV

Este mismo análisis por CCF determinó que las fracciones II y III eran iguales, pero que en III la concentración de compuestos era mayor.

### 8.6 PRUEBAS QUIMICAS VIA HUMEDA. (39)

Tabla no. 3. Pruebas químicas vía húmeda sobre fracciones I a IV y sus resultados.

NOMBRE DE LA PRUEBA	CARACTERIZA A:	REACCION POSITIVA	RESULTADO (+ ó -)			
			I	II	III	IV
Shinoda	flavonoides	formación de tonos rojos	-	+	+	-
Erdman	alcaloides	producción de color rojo	-	-	-	-
Borntrager	antraquinonas, naftoquinonas.	color rojo en la capa acuosa	-	-	-	-
Lieberman-Burchard	saponinas	producción de color azul <sup>1</sup> o violeta <sup>2</sup>	-	-	-	-
Kedde	glicósidos cardíacos	producción de color azul	-	-	-	-
FeCl <sub>3</sub>	anillos fenólicos	producción de color azul	-	+	+	-

1. para saponinas esteroideas

2. para saponinas triterpénicas

### 8.7 ANALISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR).

Los espectros hechos por IR no se incluyen porque no proporcionaron mucha información, solamente se hicieron para las fracciones II y III. (Ver sección de discusión de resultados, sección 9.5).

### 8.8 PURIFICACION DE LAS FRACCIONES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).

De la purificación por HPLC de la fracción III se llegó a obtener 4 compuestos:

Tabla no. 4. Cantidades y tiempos de retención de los compuestos presentes en III.

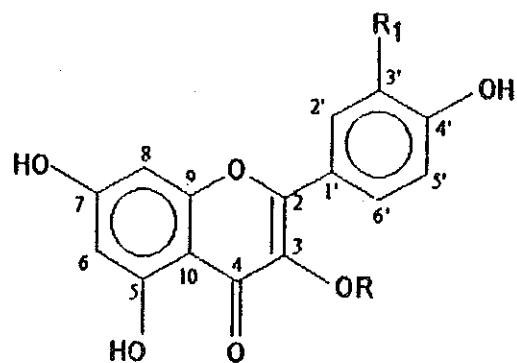
Compuesto	Peso (mg)	Tiempo de retención (Rt)
1	45	13.5 min
2	35	15.5 min
3	28	21 min
4	48	23 min

### 8.9 IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS PUROS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS (FABMS) Y POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN) PROTONICA Y DE CARBONO 13.

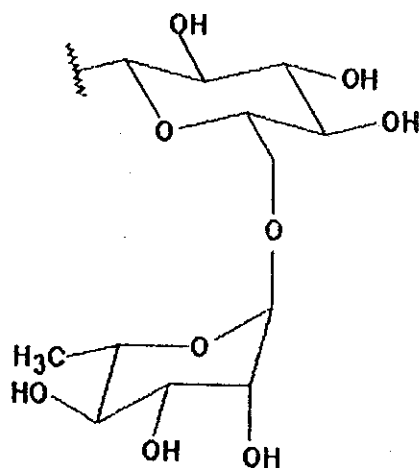
El análisis por FABMS y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  reveló las estructuras de 4 compuestos que se enlistan a continuación:

Tabla no. 5. Fórmulas moleculares y nombres comunes de los metabolitos encontrados en las hojas de B. orellana.

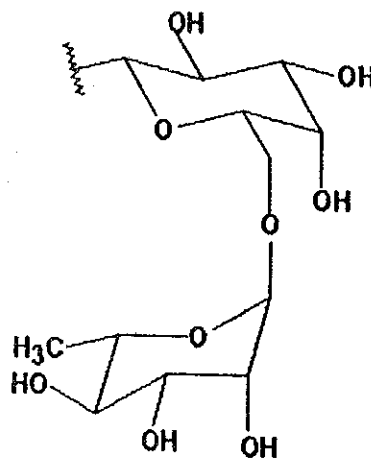
Compuesto	Fórmula molecular	PM (g/mol)	Nombre común:	Estructura (ver Figura que se indica en el cuadro)
1	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.51	Quercetina-3-O-rutinoside	1
2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.51	Quercetina-3-O-robinobioside	2
3	$C_{26}H_{32}O_{16}$	624.51	Isoraanetina-3-O-rutinoside	3
4	$C_{26}H_{32}O_{16}$	624.51	Isoraanetina-3-O-robinobioside	4



	R	R <sub>1</sub>
1	Rutinoside	OH
2	Robinobioside	OH
3	Rutinoside	OCH <sub>3</sub>
4	Robinobioside	OCH <sub>3</sub>



Rutinoside



Robinobioside

Figura 3. Estructuras de los compuestos 1-4.

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS.

### 9.1 OBTENCION DEL EXTRACTO MADRE.

El material vegetal analizado (hojas de B. orellana) fue proporcionado por FARMAYA ya seco y molido. Con este material se procedió a efectuar las extracciones en frío utilizando primero un disolvente apolar (hexano) para eliminar en su mayoría los compuestos mas apolares que se encuentren en las hojas de B. orellana. Después de realizadas las extracciones con hexano (3 en total), se continuó con cloroformo que es un disolvente menos apolar que el hexano. Con cloroformo se efectuaron 3 extracciones. Por último se hicieron las extracciones con etanol al 80% esta era la parte que interesaba para la investigación pues del estudio previo hecho por Salvador AL., (22) se conocía que la fracción etanólica era la que presentaba actividad antifúngica. Con etanol se efectuaron 5 extracciones, entre cada porción de etanol agregado se dejó reposar por un día completo con las hojas en una percoladora de vidrio, al siguiente día se recogió el extracto en frascos de vidrio oscuros. Se obtuvieron 7.5L de extracto.

Todas estas extracciones se practicaron en frío con el fin de no destruir ninguno de los compuestos que pudieran estar presentes en las hojas de B. orellana pues se consideró la posibilidad de que fueran termosensibles.

Para continuar con el estudio era necesario llevar el extracto hasta una consistencia pastosa, para lo cual se debía evaporar la mayor parte del etanol que se necesitó para la extracción. Esta evaporación se hizo con rotavapor a una temperatura de 55°C. El uso del rotavapor tiene dos ventajas: no se somete el extracto a una temperatura muy alta (lo que podría llevar a descomposición) y se recupera casi todo el disolvente usado en la extracción.

### 9.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO MADRE.

El fraccionamiento del extracto madre se realizó en una columna abierta de vidrio de 65 cm de largo por 5 cm de diámetro,

utilizando 100g de Sephadex LH-20 (0.26g muestra/g de Sephadex) como fase estacionaria, éste se preparó dejándolo reposar con 600 mL de metanol, para que se humedeciera y se hinchara. De esta manera se convierte en un gel que sirve como empaque en la cromatografía de exclusión molecular.

Se decidió utilizar Sephadex como fase estacionaria para efectuar el fraccionamiento luego de un análisis por cromatografía en capa fina (CCF) en cromatoplasmas de sílica gel del extracto madre y tres diferentes fases móviles:

- a. apolar: tolueno-éter de petróleo (1:1) saturado con ácido acético
- b. menos apolar: cloroformo:metanol (70:30)
- c. completamente polar: metanol

Con a) se observaron 8 manchas (las cromatoplasmas se vieron bajo luz ultravioleta) pero en las manchas con valores de  $R_f$  mas altos (compuestos mas afines con la fase móvil) no se observaba casi nada de separación, pudiendo darse el caso de que estas manchas encubrieran otras.

En el caso de b) se observaron 3 manchas con valores de  $R_f$  altos (0.80, 0.85 y 0.90) no se encontró ninguna otra mancha. Con esta fase móvil no hubo una buena partición, únicamente se separaron compuestos con mucha afinidad hacia ella.

Con c) pudieron verse 14 manchas con valores de  $R_f$  que iban desde 0.30 hasta 0.90. Con c) fue con la que se obtuvo el mayor número de manchas y mejor definidas cada una de ellas. Esta cromatoplasma reveló la presencia de compuestos de diferentes polaridades, correspondiendo los apolares a aquellos con valores de  $R_f$  bajo y los mas polares a aquellos con valores de  $R_f$  mayores.

Con datos se pensó que el extracto contenía un mayor número de compuestos polares, siendo posible separarlo con una fase estacionaria con afinidad por los compuestos polares pero que a la vez no los retuviera tan fuertemente que permitiera obtenerlos al utilizar como fase móvil un disolvente bastante polar. Este es el caso del Sephadex y metanol que a la vez presenta las ventajas

de efectuar la separación por tamaño de la molécula y por interacciones de nube electrónica (29).

El extracto etanólico pastoso, se disolvió con la menor cantidad de metanol posible para colocarlo en la columna. Se centrifugó para que no quedaran sólidos que pudieran interferir en el fraccionamiento. El extracto ahora metanólico se resbaló por las paredes de la columna muy lentamente para evitar alguna alteración en la superficie del Sephadex.

En el primer fraccionamiento se obtuvieron 6 fracciones que se diferenciaron solo por el color (tabla no. 1, Resultados).

Estas fracciones, mas dos blancos, se llevaron al Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica para efectuar las pruebas antifúngicas (tabla no. 2, Resultados) las que permitieron establecer que la fracción 3 (F3) era la que presentaba mayor actividad antifúngica (4 de las 5 especies en estudio fueron inhibidas por menos de 1 mg/mL de F3).

A lo largo del estudio, siempre que se obtenían fracciones se les practicaban análisis por CCF, en cromatoplasmas de sílica gel, fase móvil una mezcla de butanol:ácido acético:agua (60:15:25) y revelador una solución de sulfato de cerio saturada en ácido sulfúrico al 10%; para tener una idea del tipo de metabolitos presentes y las similitudes entre las fracciones.

Cuando se realizó la CCF de estas 6 fracciones se observaron entre ellas, manchas muy parecidas en color pero con variaciones de intensidad y diferentes valores de  $R_f$ . En este caso la intensidad de la mancha representaba la proporción del compuesto en la mezcla. El color que adquirieron las manchas al rociarse con el revelador mostraba que en estas fracciones habían compuestos de tipo flavonoide, lo que concuerda con los estudios realizados por Harbone J., (9).

En un momento se pensó que si en todas las fracciones habían flavonoides, todas deberían presentar actividad antifúngica positiva, pero debe recordarse que la actividad farmacológica de una planta depende de uno o varios de los metabolitos presentes en ella y de la proporción e interacción que éstos tengan entre



si.

### 9.3 REFRACCIONAMIENTO DE FRACCION 3.

Debido a que no hubo una buena separación de las fracciones fue necesario refraccionar F3. Se utilizó la misma columna (la que previamente fue lavada haciéndole pasar diferentes disolventes hasta que quedó limpia y nuevamente con metanol). Se colocaron 1.72g de F3 (29) disuelto en la menor cantidad de metanol posible y evitando hacer alteraciones en la superficie del empaque.

Cuando el extracto empezó a pasar a través de la columna se podían observar bandas bien definidas con coloraciones que iban del amarillo al verde, algunas anaranjadas. Si la separación fue efectiva es posible que cada banda representara un compuesto diferente.

El color no es un factor que pueda determinar hasta donde debía recogerse una fracción (29) por lo que para saber cuales fracciones eran iguales se llevó un seguimiento de lo que se obtenía de la columna por CCF. Cada vez que se colectaban 3 mL de extracto se cambiaba tubo de ensayo, para luego puntear todas las fracciones en cromatoplas. Setenticinco (75) fracciones se recogieron en total de la F3 activa.

Como ya se dijo estas 75 fracciones se analizaron por CCF, en cromatoplas de sílica gel, butanol:ácido acético:agua (60:15:25) como fase móvil y sulfato de cerio/ácido sulfúrico al 10% como revelador. La comparación de las manchas por la coloración y por los valores de  $R_f$  permitieron establecer cuales fracciones eran iguales y por lo tanto podían unirse. Luego de esto se reunieron un total de 9 fracciones (Bo. 1 a Bo. 9). (Cuadro no. 1, Resultados).

Un nuevo análisis por CCF de estas nueve fracciones permitió hacer un nuevo reagrupamiento de las mismas. Las 9 fracciones se puntearon en cromatoplas de sílica de gel y butanol:ácido acético:agua (60:15:25) como eluyente; de aquí se observó que las fracciones Bo.1, Bo.2, Bo.3 y Bo.4 presentaban manchas de igual

color y con los mismos valores de  $R_f$ , por lo puede decirse que estas fracciones contenían el mismo tipo de compuestos por lo que se reagruparon en una sola (I). Para las fracciones Bo.5, Bo.6 y Bo.7 también se observó manchas y valores de  $R_f$  iguales, pero en el caso de Bo.5 la intensidad de las manchas indicaba que la concentración de los compuestos en ella era mínima por lo que se decidió agrupar Bo.5 en una sola fracción (II) mientras que Bo.6 y Bo.7 se agruparon en otra (III) ya que en ellas la concentración de los compuestos era alta. Por último se agrupó Bo.8 y Bo.9 en otra (IV).

Al revelar esta cromatoplaque con solución de sulfato de cerio saturada en ácido sulfúrico, se pudo ver que en I solo habían compuestos tipo carbohidratos, los cuales no presentan valor fitoquímico, mientras que en las fracciones II y III estaban concentrados los compuestos de tipo flavonoide que se esperaban. Mas de 33 diferentes actividades biológicas han sido reportadas para alrededor de 30 de 137 flavonoides naturales conocidos hasta el año de 1955. Existen varios estudios publicados sobre las actividades biológicas y su lugar de acción de los flavonoides en la terapia de drogas. Reportes mas recientes concernientes a acciones antivirales, antiinflamatorias y dicitóxicas demuestran su importancia como fitoconstituyentes con actividad biológica (40).

#### 9.4 PRUEBAS QUIMICAS VIA HUMEDA.

Si la separación fue efectiva se podía pensar que en este punto ya podían haber compuestos puros, pero no era así, por el análisis por CCF se sabía que esta suposición era negativa (se veían varias manchas en una misma banda). Aunque también por la CCF ya se estimaba el tipo de compuestos, esto se confirmó con la realización de algunas reacciones de coloración características para cada tipo de compuesto. Aunque estas pruebas no son muy confiables debido a que visualización del experimentador varía de un sujeto a otro y que muchas pruebas pueden dar resultados falso-positivos o falso-negativos, pueden aportar una idea

bastante general acerca de los compuestos existentes en la fracción. Para efectuarlas es muy importante la calidad, la forma de preparación y la edad de los reactivos que se utilicen.

Estas pruebas (ver sección 8.6, Resultados) confirmaron los datos provenientes del análisis por CCF, en las fracciones II y III se encontraron reacciones positivas para flavonoides y para anillos fenólicos, mientras que para las otras mediante las pruebas realizadas se obtuvieron resultados negativos.

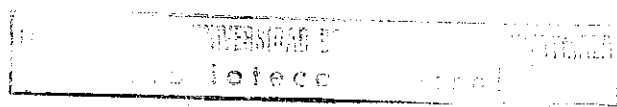
#### 9.5 ANALISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR).

Inicialmente se pensó hacer espectros infrarrojos para todas las fracciones. Se trabajó con la fracción II, desde aquí se vio que no se obtenían espectros con resolución, solo daba el espectro del disolvente que era metanol, aún aplicando una gran cantidad de ruido no era posible detectar algo más. Esto pudo deberse a dos razones: una la concentración muy baja del metabolito (s) presente (s) en esta fracción; y, por otro lado, el encubrimiento de picos ya sea por picos del disolvente o bien por suma de varios picos provenientes de los compuestos aquí presentes. Es necesario recordar que en este punto las fracciones no han sido purificadas completamente por lo que en cada una pueden haber uno o varios compuestos.

#### 9.6 PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).

Se utilizó para la purificación HPLC semipreparativa pues se persiguen fines más cuantitativos que cualitativos y por medio de este tipo de cromatografía es posible hacerlo.

La columna que efectuó la separación (WATERS Bondpack C-18), es una columna empacada con sílica gel cubierta con un hidrocarburo C-18, esto sirve para invertir la fase con lo cual se logra cubrir los grupos -OH de la sílica y convertirla en un adsorbente apolar. En caso de que solamente estuviera empacada con sílica se tendría una fase muy polar en la que los compuestos polares quedarían retenidos en ella y sería muy difícil la



separación. Al invertir la fase se cambian completamente las propiedades físicas del adsorbente y se pasa de una cromatografía de adsorción a una de fase inversa (29).

El detector utilizado fue uno de índice de refracción, este es el detector por excelencia para productos naturales ya que detecta todos los compuestos, tiene una sensibilidad suficiente mas no muy alta para lo que se necesita y se pueden inyectar hasta 12 mg de muestra. La detección se basa en la concentración de soluto. La línea base se ajusta con el índice de refracción del disolvente el cual será igual a cero (0) y solo se registra un pico cuando se detecta un compuesto diferente del disolvente (29).

Los resultados obtenidos en esta parte pueden verse en la sección 8.8, Resultados.

#### 9.7 IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS (FABSM) Y RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN) PROTONICA ( $^1\text{H}$ ) Y DE CARBONO 13 ( $^{13}\text{C}$ ).

##### Compuesto 1.

El espectro FABSM del compuesto 1 mostró un ión molecular  $[\text{M}-\text{H}]^-$  a una relación masa-carga ( $m/z$ )=609. Con los datos de la masa y de los espectros  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT RMN se obtuvo la fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ .

El análisis por cromatografía de gases del compuesto 1 después de la hidrólisis ácida mostró la presencia de dos moléculas de azúcar: glucosa y ramnosa.

La hidrólisis ácida (metanólisis) se hizo con 2 mg del compuesto, los que se calientan en viales por 24 h a  $80^\circ\text{C}$  en HCl al 2% (2 mL). Después se adicionó  $\text{Ag}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$  hasta que ya no hubo producción de  $\text{CO}_2$ . Se centrifugo, y el centrifugado se dejó secar sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Los monosacáridos resultantes fueron tratados con Trisil-Z (Pierce) para ser inyectados en el cromatógrafo de gases. Los tiempos de retención fueron iguales a aquellos de los trisil-azúcares originales.

El espectro por RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) indicaba la presencia de una señal de un grupo metilo de ramnosa a  $\delta=1.15$  (3H, J=6 Hz), un protón anomérico de una  $\alpha$ -ramnosa a  $\delta=4.55$  (1H, d, J=1.5 Hz) y a una señal  $\delta=5.55$  (1H, d, J=7.5 Hz) en acuerdo con un protón anomérico de una  $\beta$ -glucosa (42) (tabla no. 6).

La zona aromática mostraba señales protónicas a  $\delta=7.64$  (dd, J=8.5 Hz, J=2 Hz, H-6'), a  $\delta=6.89$  (d, J=8.5 Hz, H-5') y a  $\delta=7.70$  (d, J=2 Hz, H-2') todos estos datos juntos mostraron la presencia de un anillo aromático 3', 4' disustituido (tabla no. 7).

Las 5, 7 disustituciones del anillo A quedaron demostradas con la presencia de 2 H meta-acoplados a  $\delta=6.41$  (d, J=2 Hz, H-8).

Con el análisis de todos estos datos se pudo establecer para el compuesto 1, la aglicona, quercetina-3-O-sustituida con un disacárido.

La sustitución del C-6 de glucosa con ramnosa fue demostrada por un desplazamiento a campo bajo de 7.2 ppm en el espectro de  $^{13}\text{C}$  en comparación del correspondiente C-6 ( $\delta=61.3$ ) de la quercetina-3-O-glucosídico (41).

De la unión de todos los datos y de la confrontación de los mismos con los de la literatura (41) fue posible identificar el compuesto 1 como: quercetina-3-O-rutinoside.

#### Compuesto 2.

El compuesto 2 mostraba en el FABMS el mismo ión molecular de 1 a una relación  $m/z=609$ . De los datos de FABMS,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT RMN se pudo asignar a 2 la fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ .

El análisis por cromatografía de gases del compuesto 2 hidrolizado mostraba la presencia de galactosa-ramnosa. Los datos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  de RMN (tablas 6 y 7) para la aglicona del compuesto 2 eran parecidos a aquellos del compuesto 1 (42). La diferencia entre los compuestos 1 y 2 radicaba principalmente en las cadenas disacarídicas, de hecho el compuesto 2 mostraba la presencia de las señales típicas de una galactosa-6-O-sustituida (43), confirmado como se dijo antes por cromatografía de gases. En base a estas observaciones se estableció para el compuesto 2 la

estructura de quercetina-3-O-robinobioside.

#### Compuestos 3 y 4.

Estos compuestos mostraban en el espectro FABMS el mismo ión molecular a  $m/z=623$ . El análisis de los espectros FABSM,  $^{13}\text{C}$ , y  $^{13}\text{C}$  DEPT RMN indicaba para ambos compuestos la fórmula molecular de  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ .

Los espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de RMN de 3 y 4 mostraron la presencia de un grupo metoxílico ( $\delta=3.99$  y  $\delta=55.6$  para 3;  $\delta=3.93$  y  $\delta=56.8$  para 4) (tablas 6 y 7) en comparación con 1 y 2 respectivamente.

La hidrólisis ácida de los compuestos 3 y 4 liberaba correspondientemente glucosa-ramnosa para 3 y galactosa-ramnosa para 4, en el análisis por cromatografía de gases.

La comparación de los espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de RMN de 3 y 4 con respecto a 1 y 2 tomados como modelos estructurales (ver tabla no. 6) y con los datos de la literatura (42) permitieron caracterizar al compuesto 3 como isoramnetina-3-O-rutinoside y al compuesto 4 como isoramnetina-3-O-robinobioside.

## 10. CONCLUSIONES.

1. Unicamente la fracción 3 (F3) que se obtuvo del extracto madre de las hojas de Bixa orellana presentó actividad antifúngica positiva.
2. Se trabajó con F3 ya que esta presentaba actividad antifúngica positiva contra 4 de las 5 especies de hongos en estudio a una concentración menor de 1 mg/mL.
3. De la separación de la fracción positiva se obtuvieron 4 fracciones (I a IV) en total.
4. Los compuestos con interés fitoquímico se encontraron en las fracciones III y IV.
5. Las pruebas químicas vía húmeda así como el análisis por cromatografía en capa fina; indicaron la probabilidad de que en las fracciones II y III habían compuestos de tipo flavonoide.
6. Por medio de cromatografía en capa fina se estableció que las fracciones II y III contenían el mismo tipo de compuestos, pero en diferente concentración, siendo III la mas concentrada.
7. La purificación por cromatografía líquida de alta resolución reveló la presencia de cuatro compuestos diferentes en la fracción III.
8. Por medio del análisis de los espectros de masas (FABMS), de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$ , DEPT  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de cada uno de los compuestos y por la confrontación de los datos con la literatura; se identificaron los compuestos como los siguientes:

1. Quercetina-3-O-rutinoside
2. Quercetina-3-O-robinobioside
3. Isoramnetina-3-O-rutinoside
4. Isoramnetina-3-robinobioside.

9. La actividad antifúngica de las hojas de B. orellana se debe a la presencia de compuestos de tipo flavonoide.



### 11. RECOMENDACIONES.

1. Aislar cada uno de los compuestos encontradas en las hojas de B. orellana para verificar si la actividad antifúngica se debe a uno solo de los compuestos o a la presencia de todos ellos.
2. Efectuar fraccionamientos fitoquímicos con otras partes de la planta de B. orellana que presenten actividad biológica para conocer cuales son los compuestos activos.
3. Comparar los resultados de este estudio con trabajos futuros en plantas con actividad antifúngica para saber si los mismos flavonoides se encuentran presentes o si es otro tipo de compuestos el que confiere la actividad.

## 12. REFERENCIAS.

1. Morton J. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. USA: Charles Thomas Publishers, 1981. XXVII+1420p.
2. Martínez M. Plantas Útiles en la Flora Mexicana. 4a. ed. México: Editorial Botas, 1969. 70p.
3. Bate-Smith E. Bot. J. Linn. Soc. 1962;58:39.
4. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Germany, 1964. III. 282p.
5. Scherry R. Plantas Útiles al Hombre (Botánica Económica). España: Editores Salvat, S.A., 1956. 335p.
6. Schneider W., et al. Occurrence of Tomentosic Acid in Extracts of Bixa orellana. J. Org. Chem. 1965;30(8):2856-2857.
7. Chaco M., et al. Essential oils from West African plant. Isolation of sesquiterpene from Bixa orellana. Perfum. Essent. Oil Rec. 1969;60(6):247-248.
8. Lawrence B. & Hogg J. Ishwarene in Bixa orellana leaf oil. Phytochemistry. 1973;12(2):2995.
9. Harbone J. Flavonoid Bisulfates and their Co-occurrences with Ellagic Acid in the Bixaceae, Frankeniaceae and Related Families. Phytochemistry. 1975;14:1331-1337.
10. Pinto E. Recopilación de datos botánicos y análisis químico cualitativo de algunas especies de plantas consideradas medicinales en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1980. 57p.

11. Monjes C. Composición química del aceite de semillas despigmentadas de B. orellana (achiote). Guatemala: Universidad de San Carlos, 1973.
12. Aguilar J. Relaciones de algunos aspectos de la flora útil de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1985. 50p.
13. Manfred L. Recetas botánicas a base de 1300 plantas medicinales americanas. México: Universidad Autónoma de México, 1987. 250p.
14. House P., Lagos-Witte S. Manual Popular de 50 plantas medicinales en Honduras. Honduras: Universidad Nacional de Honduras, 1983. 45p.
15. Rescate de la medicina popular: Ministerio de Salud. Primer Informe sobre las 92 plantas medicinales usadas en la región "Las Segovias". Guatemala: Ministerio de Salud Pública, 1988. 100p.
16. Ramírez V. et al. Vegetales empleados en medicina tradicional norperuana. Perú: Universidad de Lima, 1987. 35p.
17. Simpson G. Folk medicine in Trinidad. Trinidad: York Publishers, 1980. 330p.
18. Palma L. Contribución al estudio farmacológico de B. orellana (achiote) como hipoglucemiante. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1981. 31p.
19. Morales A. Inhibición in vitro de *Trichomonas vaginalis* por extractos acuosos vegetales de uso popular. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1990. 89p.

20. Robineau L. Scientific research and popular use of medicinal plants in the Caribbean. Honduras: Work Shop Tramil-4, 1989. 474p.
21. Girón LF, et al. Estudios de plantas medicinales como antibacterianos. Guatemala: Informe Tramil-II, 1987. 260p.
22. Salvador AL. Confirmación de la actividad antimicrobiana de B. orellana y Wigandia urens var caracasana. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1994. 46p.
23. Lara S. Contribución al estudio fitoquímico y farmacológico de B. orellana (achiote). Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1983. 34p.
24. Stanley P. & Williams L. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany Editors, 1962. 29p.
25. Niembro A. Arboles y arbustos útiles en México. México: Editorial Limusa, 1990. 206p.
26. Orellana S. Indian medicine in highland Guatemala: The prehispanic and colonial periods. México: University of New Mexico, 1987. 308p.
27. Duke H. & Alchey A. Handbook of proximate analysis tables of higher plants. USA: CRC Press Inc, 1986. 389p.
28. Merck. Reactivos. Diagnóstica. Productos químicos. Alemania: Merck Company. Doc. Tec. 1992. 1571p.
29. Rastrelli L. Guatemala: Curso de fitoquímica impartido en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia del 24/10 al 3/11 de

1995 por el Dr. Luca Rastrelli de Italia.

30. Bauer K., Gross L., Sauer W. Cromatografía de capa fina: una introducción. Nonell S. trad. Alemania: Mitterweger Werksatz, 1992. 70p.

31. Joklik WA. Zinsser Microbiology. 17 ed. New York: Appleton Century Croffts, 1980. 1413p.

32. Lennette E. et al. Manual of clinical microbiology. 4a ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. 1449p.

33. Restrepo A. Micosis asociadas al paciente inmunocomprometido Aspergilosis. Guatemala: I Congreso Centroamericano, I Congreso de Micología: Memorias, 1992. 55p.

34. Swatek F., et al. Aspergillus species and other tunistic saprophytic hyaline Hiphomycles. Manual of Clinical Microbiology. 4a ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. 1449p.

35. Rippon JW. Medical Mycology: pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 2th ed. Philadelphia: Saunders Company, 1982. 843p.

36. Finegold SM, Martin WJ. Diagnóstico Microbiológico. 3a ed. Argentina: Médica Panamericana, 1983. 406p.

37. Loggeman HE, Herias MV, Quevedo JC. Manual de enfermedades infecciosas IV. Guatemala: Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, 1991, 53p.

38. Loggeman HE. Incidencia dermatofítica en Guatemala y actualización de micología médica. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, I y II Congreso Nacional de Microbiología. Memorias, 1983 y 1984. 220 y 218p.

39. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2a. ed. Perú: Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 1974. 300p.

40. Santa Cruz H. Manual de selección fitoquímica: guía práctica para los laboratorios de química de productos naturales y fitoquímica. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos. 1980. 89p.

41. Markham K. et al.  $^{13}\text{C}$  NMR of flavonoids-II. Tetrahedron. 1976;32:2607-2612.

42. Rastrelli L. et al. Studies on the constituent of *Chenopodium pallidicaule* seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. Journal Agr. Food Chem. 1976;43(8):2020-2024.

43. Breitmaier E. & Voelter W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. VCH Verlagsgesellschaft Geulsh. Germany: Weinheim, 1987; pp. 380-393.

**10. ANEXOS.****ANEXO 10.1. TABLAS CON VALORES DE RMN 13C E 1H PARA LOS COMPUESTOS 1 A 4.**

Tabla no. 6 Desplazamiento químico de RMN 13C para los compuestos 1 a 4.

Carbono	DEPT	1	2	3	4
1	-	-	-	-	-
2	C	159.3	159.0	158.8	158.8
3	C	135.6	135.3	135.5	135.4
4	C	179.2	179.4	179.3	179.4
5	C	162.1	162.9	162.9	162.9
6	CH	98.6	99.5	100.0	98.8
7	C	166.2	166.4	166.2	166.2
8	CH	94.2	94.9	95.0	93.6
9	C	158.5	158.5	158.8	158.4
10	C	105.5	105.9	105.6	105.5
1'	C	123.1	123.1	124.0	123.0
2'	CH	116.4	116.1	114.6	114.6
3'	C	145.8	145.7	150.8	150.8
4'	C	149.8	149.9	148.3	148.3
5'	CH	117.3	117.9	116.1	115.8
6'	CH	122.3	127.8	124.0	122.8
6lu 1	CH	103.7		104.5	
2	CH	75.1		75.9	
3	CH	79.3		78.2	
4	CH	72.5		71.6	
5	CH	78.3		77.3	
6	CH <sub>2</sub>	68.5		68.5	

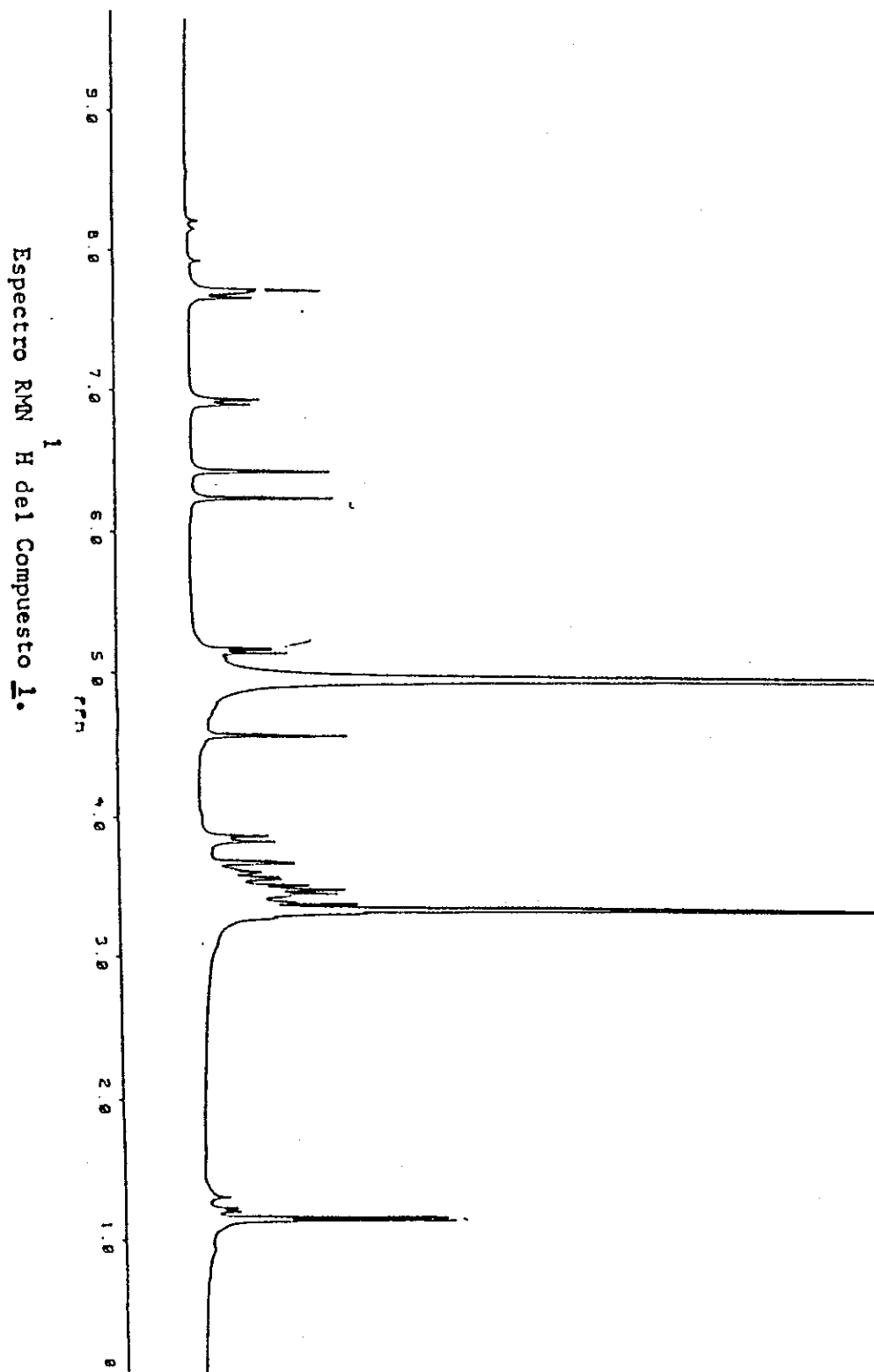
(Continuación tabla no. 6. Desplazamiento químico de RMN 13C para los compuestos 1 a 4).

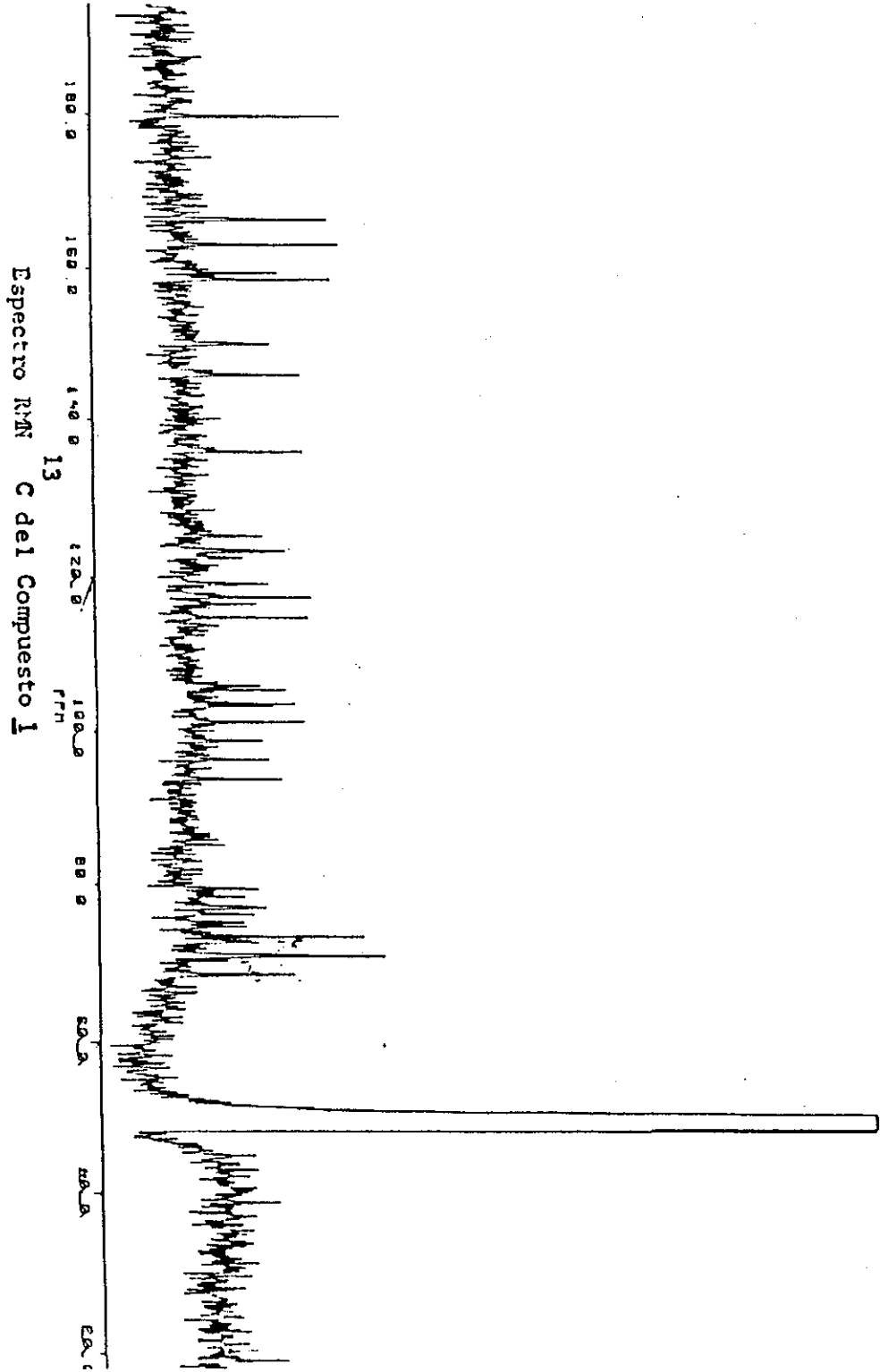
Carbono	DEPT	1	2	3	4
Gal 1	CH		101.9		101.3
2	CH		73.9		73.2
3	CH		75.2		74.3
4	CH		70.2		70.4
5	CH		75.4		75.0
6	CH <sub>2</sub>		67.6		68.8
Ran 1	CH	101.2	100.1	102.4	100.5
2	CH	71.0	72.1	72.1	70.8
3	CH	71.0	72.4	72.4	71.1
4	CH	73.2	73.9	73.9	72.7
5	CH	70.2	69.7	69.7	68.8
6	CH <sub>2</sub>	17.0	17.9	17.9	18.1
OCH3				56.8	55.6

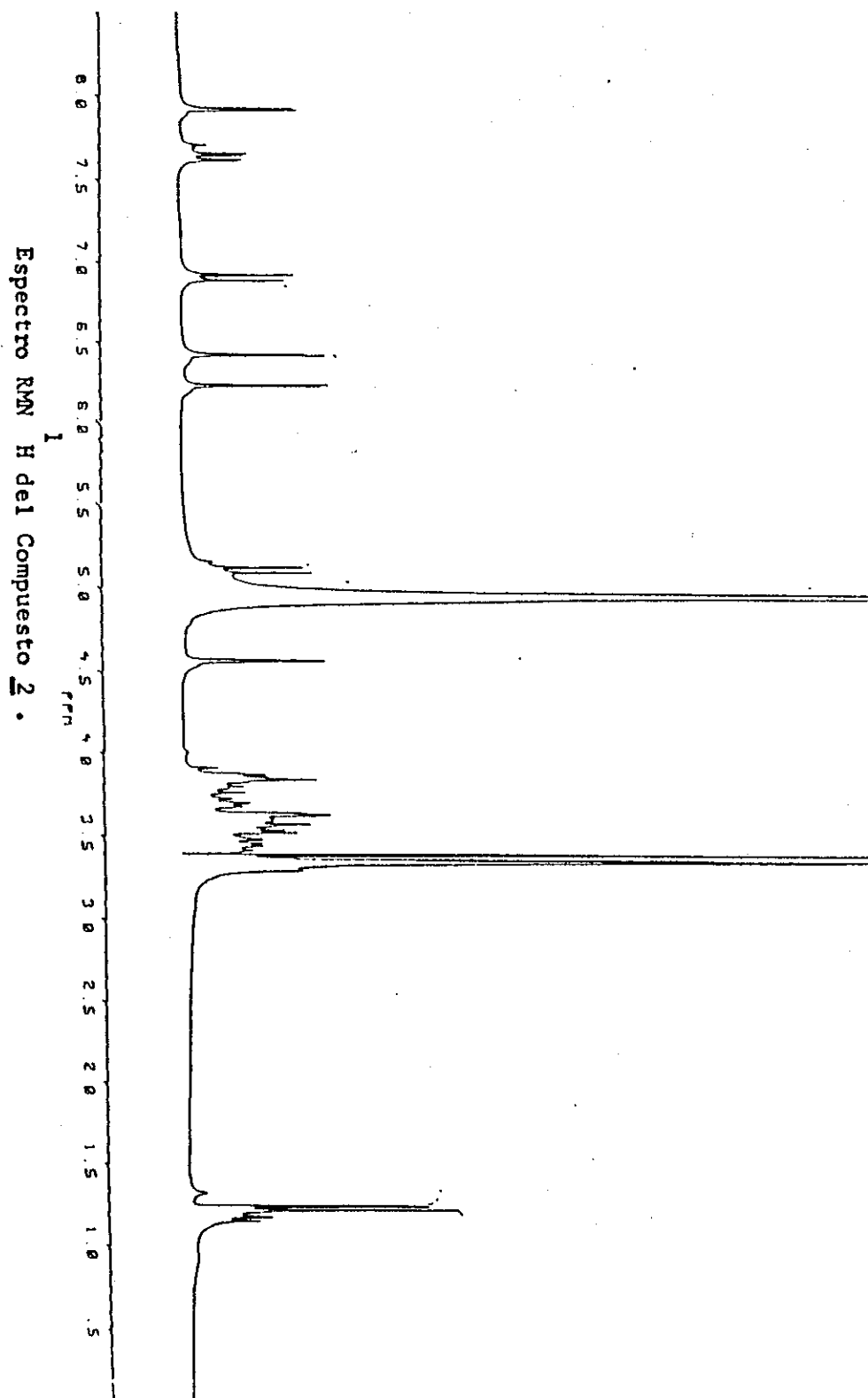


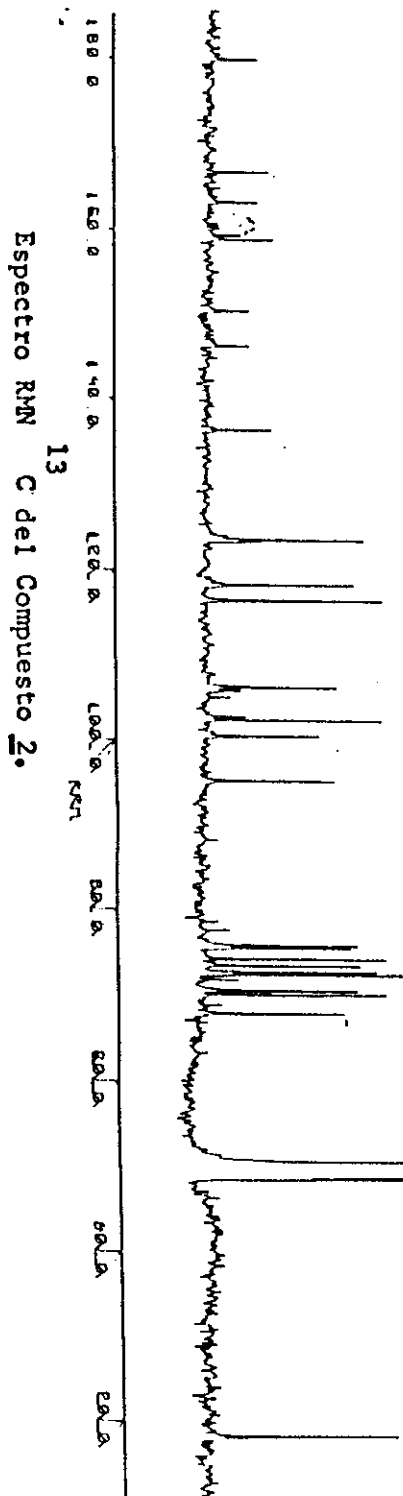
Tabla no. 7. RMN- 1H de compuestos 1 a 4 y valores de J (en paréntesis) expresados en Hz.

Protón	1	2	3	4
H-6	6.22 (2) d	6.22 (2) d	6.17 (2) d	6.22 (2) d
H-8	6.41 (2) d	6.41 (2) d	6.35 (2) d	6.41 (2) d
H-2'	7.69 (2) d	7.91 (2) d	7.93 (2) d	8.04 (2) d
H-5'	6.89 (8.5) d	6.90 (8.5) d	6.88 (8.5) d	6.92 (8.5) d
H-6'	7.64 (8.5, 2) dd	7.62 (8.2, 2) dd	7.59 (8.5, 2) dd	7.61 (8.5, 2) dd
H-1 Glu	5.14 (7.5) d		5.22 (7.5) d	
H-1 Gal		5.09 (7.5) d		5.24 (7.5) d
H-1 Ram	4.58 (1.5) d	4.55(1.5) d	4.51 (1.5) d	4.55 (1.5) d
Me Ram	1.16 (6) d	1.20 (6) d	1.09 (6) d	1.20 (6) d
OCH3			3.93 s	3.99 s

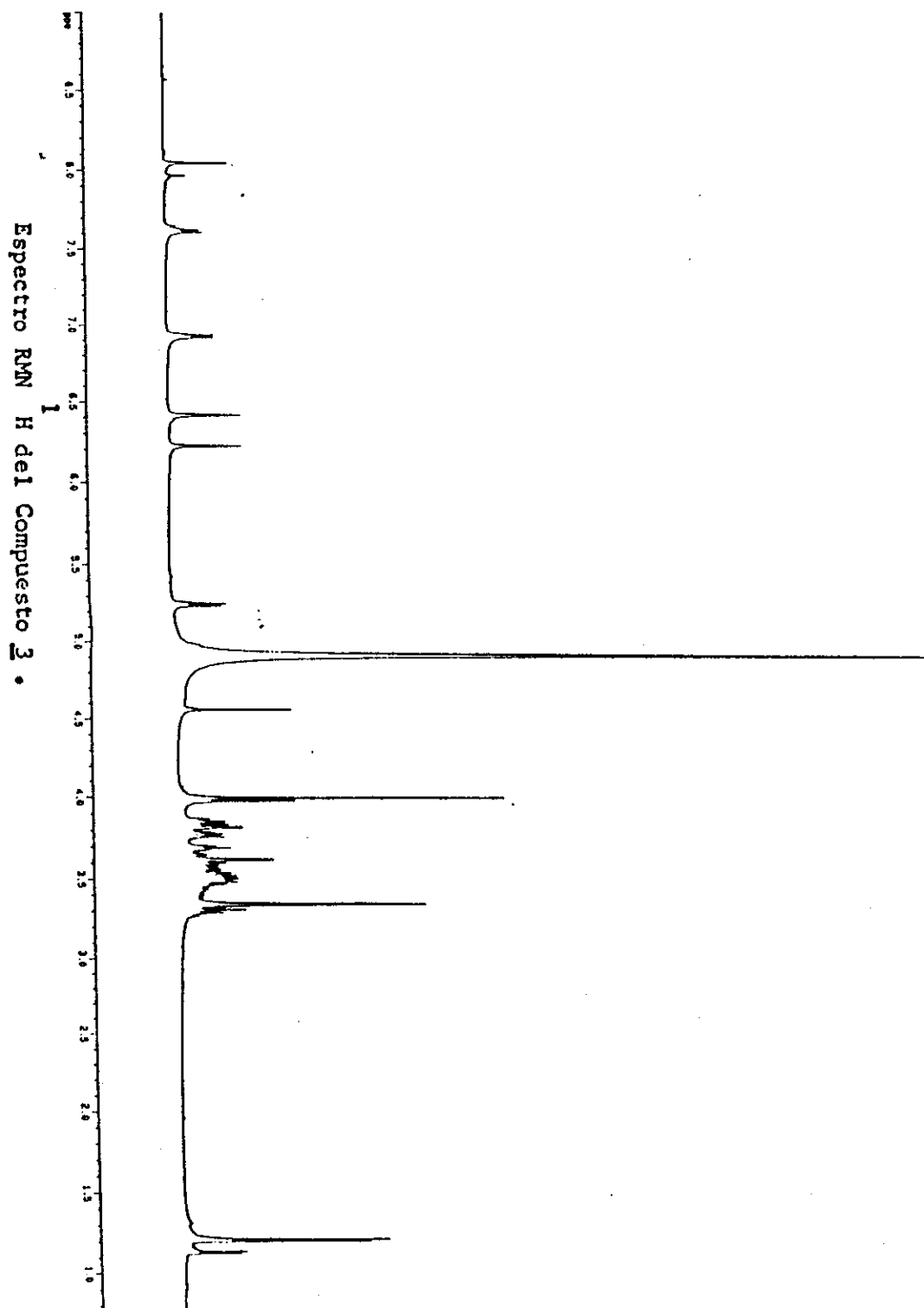
ANEXO 10.2 ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DE LOS COMPUESTOS 1 A 4.

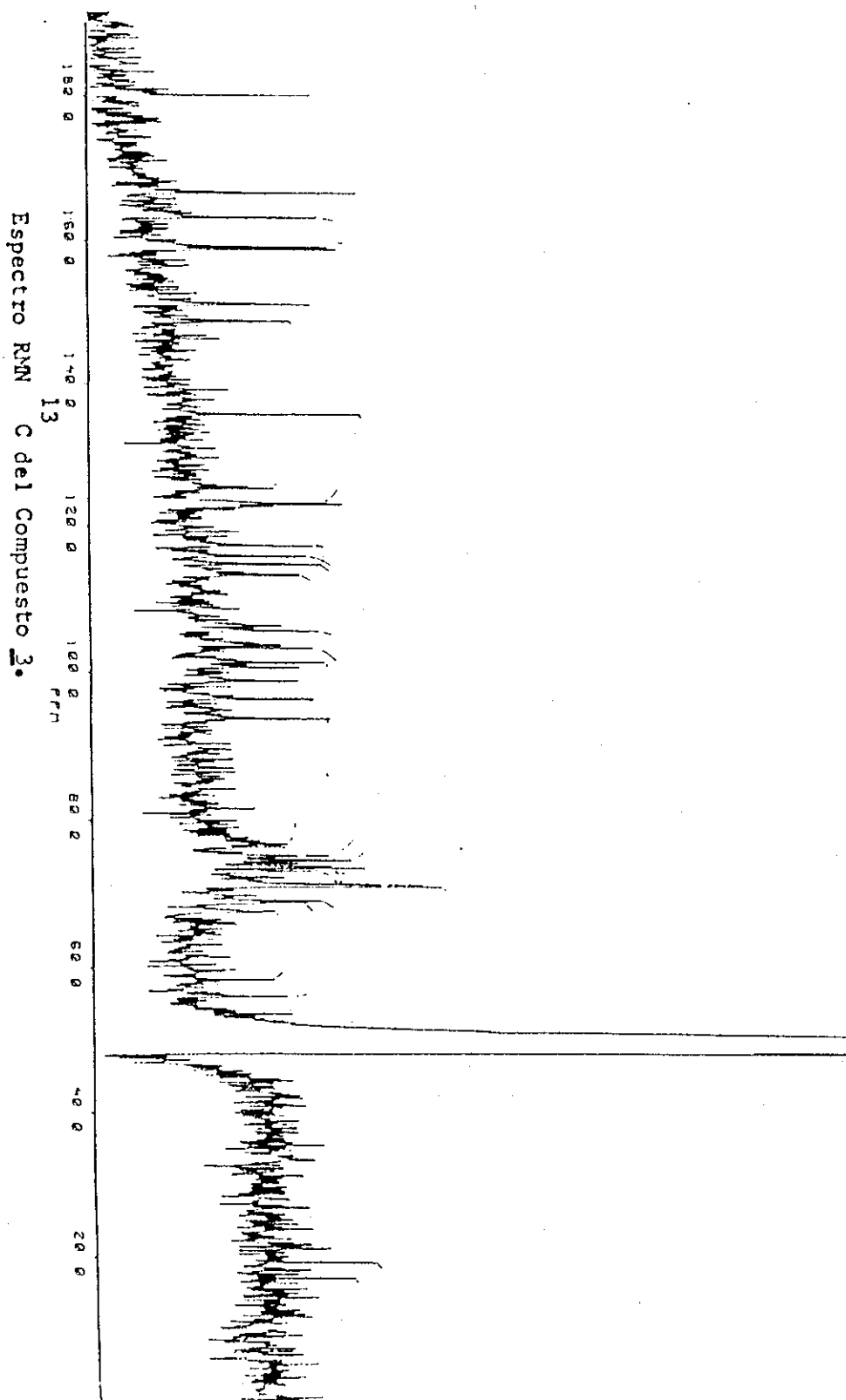


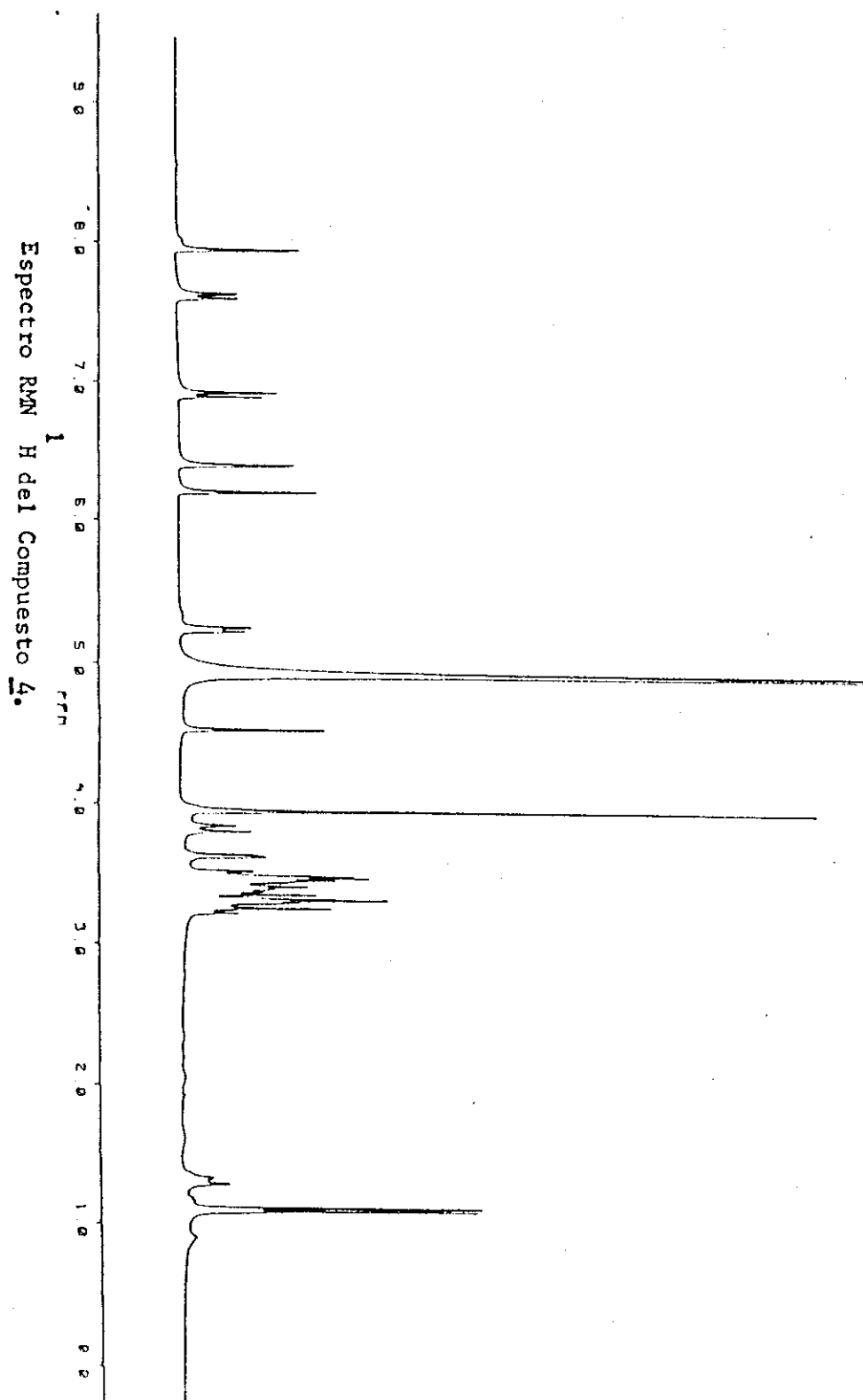




RECORDED  
DATE

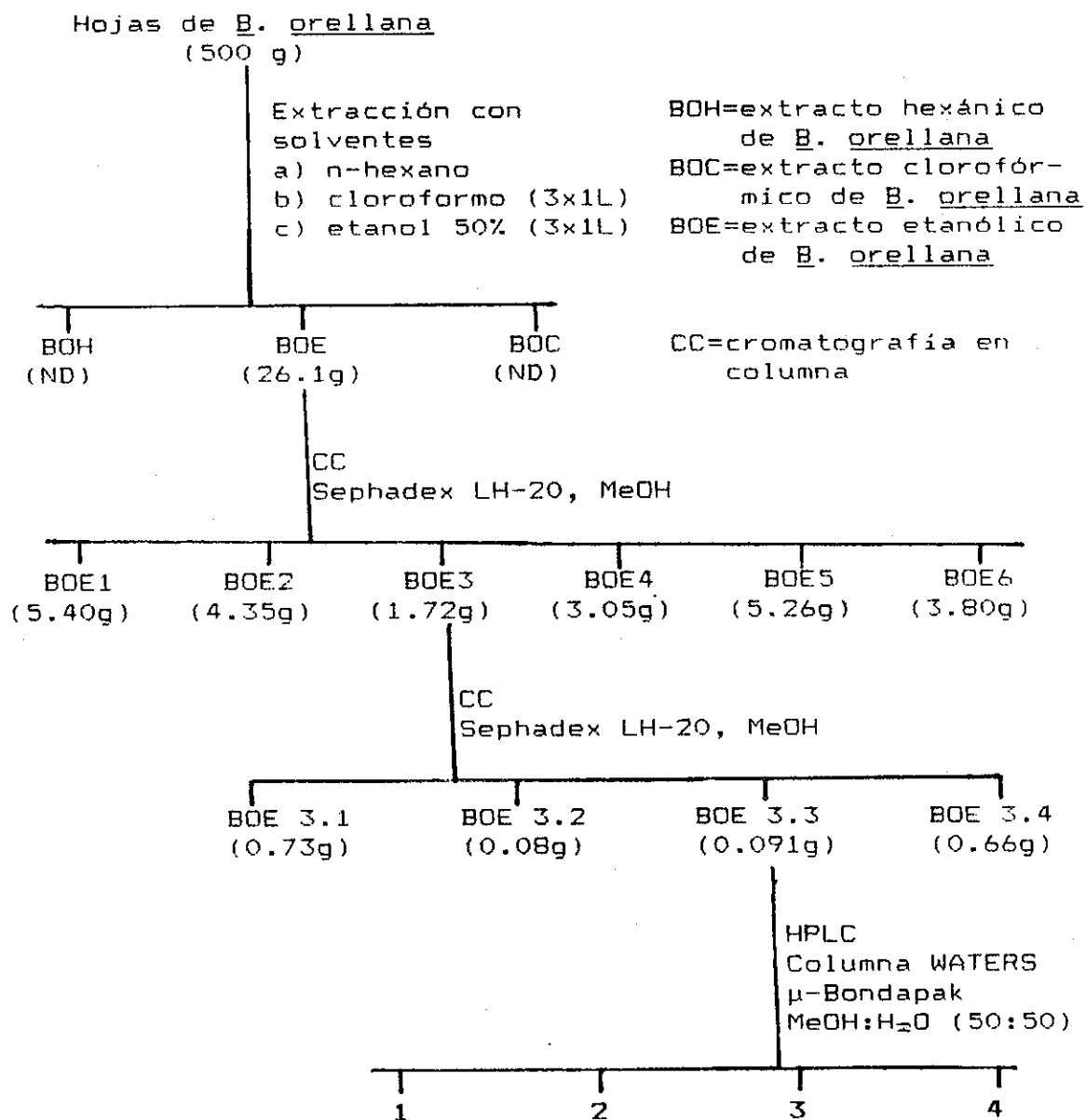








## 10.3 DIAGRAMA DE FLUJO.



### ANEXO 10.3 DESCRIPCION GENERAL DE LAS TECNICAS DE SEPARACION QUE SE UTILIZARAN.

En todo trabajo de investigación sobre productos naturales es preciso extraer cuidadosamente los componentes del vegetal en estudio para enseguida aislar y purificar los compuestos presentes en los extractos obtenidos. Seguidamente, estos compuestos puros se analizan con técnicas espectroscópicas y métodos químicos, lo que permite obtener las estructuras químicas correspondientes.

Los métodos cromatográficos son los procedimientos separativos mas utilizados. Cromatografía es la distribución selectiva de los componentes de una mezcla entre dos fases: una móvil (gas o líquido) y una fija o estacionaria (líquido o sólido).

#### 10.2.1 Cromatografía de Permeación en Gel (CGP).

También se conoce como Cromatografía de Exclusión Molecular. Separa según el tamaño molecular. Para ello se emplean como fase estacionaria geles hinchados que presentan huecos bien definidos (28). Estos geles hinchados pueden ser polimeros o silicageles modificados, los cuales efectúan una separación selectiva de acuerdo al peso molecular; entre ellos puede mencionarse el Sephadex y el Fractogel (28).

Las razones de la separación son la dependencia, respecto al tamaño y la forma, de la velocidad de difusión de partículas en solución así como el efecto de tamizaje condicionado por el tamaño de poro del material de relleno (28).

##### 10.2.1.1 Sephadex

La fase estacionaria mas utilizada en la CGP es el Sephadex, nombre comercial con el que se conoce. El Sephadex es un gel formado por muchos glóbulos en cadena, preparado por uniones cruzadas de dextran con epíclorohidrina. Es insoluble en todos los solventes (agua, soluciones salinas, solventes orgánicos, soluciones alcalinas y débilmente ácidas). La fuerza mecánica del Sephadex depende del número de enlaces cruzados que presente.

Tiene además grupos ácidos como  $-\text{COOH}$  y  $-\text{OH}$  (Figura 5) (29).

En la separación con Sephadex intervienen varios factores: uno de ellos es el tamaño del poro; algunas moléculas son tan pequeñas que quedan retenidas dentro de los poros del gel mientras que las otras mas grandes no caben y pasan de largo. Por lo tanto las moléculas grandes eluirán primero y luego las pequeñas. El segundo factor, son los grupos  $-\text{COOH}$ , los cuales retendrán los compuestos aromáticos por interacciones de nube electrónica. Por último el eluyente o fase móvil que se utilice, ya que éste arrastrará primero aquellas moléculas que sean mas afines con él. Como puede verse en la separación con Sephadex ocurre al mismo tiempo dos tipos de cromatografía, filtración por gel y cromatografía de adsorción (Figura 6) (30).

En el comercio pueden encontrarse varios tipos de Sephadex, que se diferencian por el tamaño del poro, por ejemplo Sephadex LH-20 y LH-60 (Cuadro 3) (29).

Gel	Rango de pH	$\phi$ aprox. del glóbulo húmedo	P.M. de mol separadas	Comentarios	Comentario específicos
Sephadex LH-20	2-13	depende del solvente	$10^2-10^3$	Los geles Sephadex están basados en uniones cruzadas de Dextran. Están diseñados para solventes orgánicos. La separación ocurre por filtración en gel y/o cromatografía de adsorción, dependiendo del solvente.	Separa lípidos, esteroides, terpenos, terpenoides y flavonoides glicosídicos.
Sephadex LH-60		depende del solvente	103-104	Igual que el anterior	Análogo a LH-20 pero con un límite de exclusión más alto

Cuadro no. 3. Diferencias entre Sephadex LH-20 y LH-60 (29).

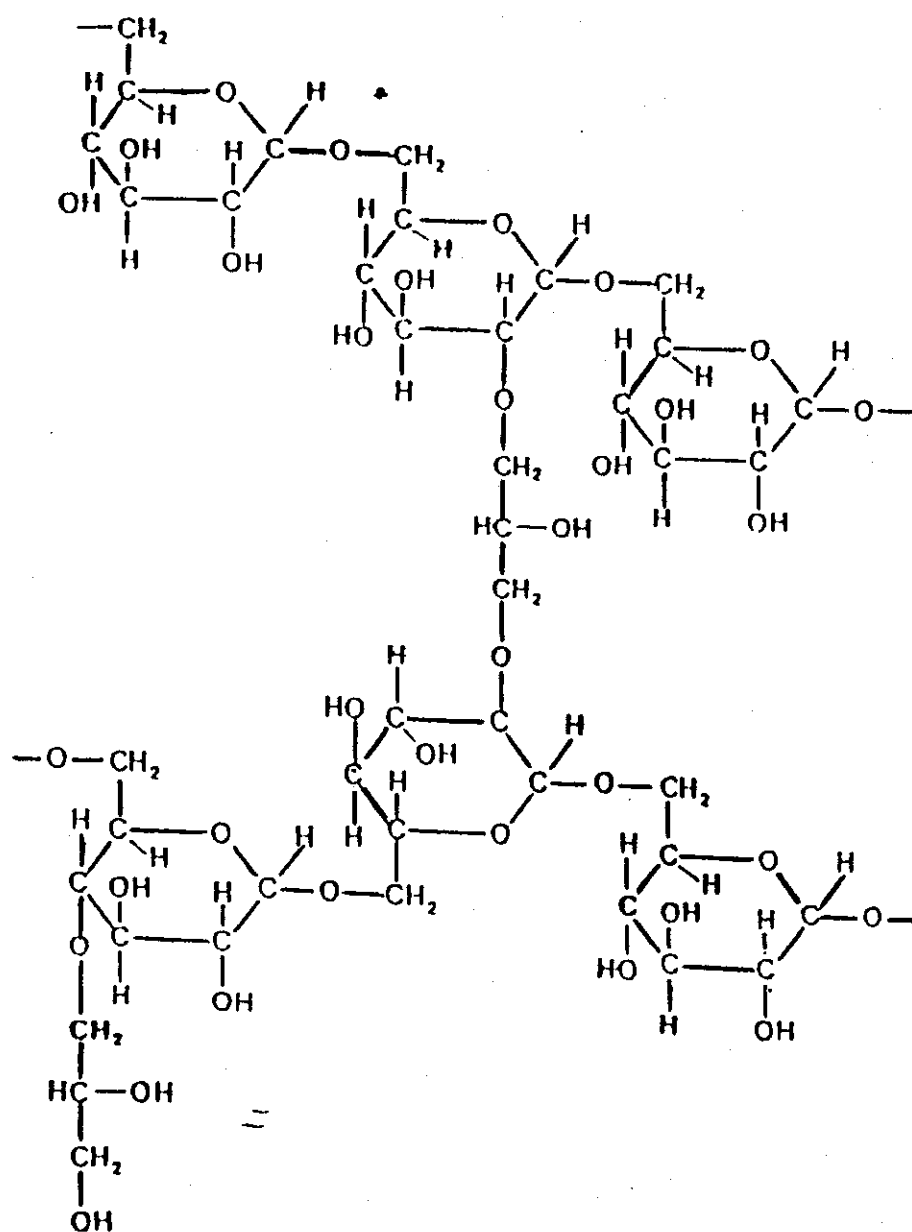


Figura 2. Estructura parcial de Sephadex (29).

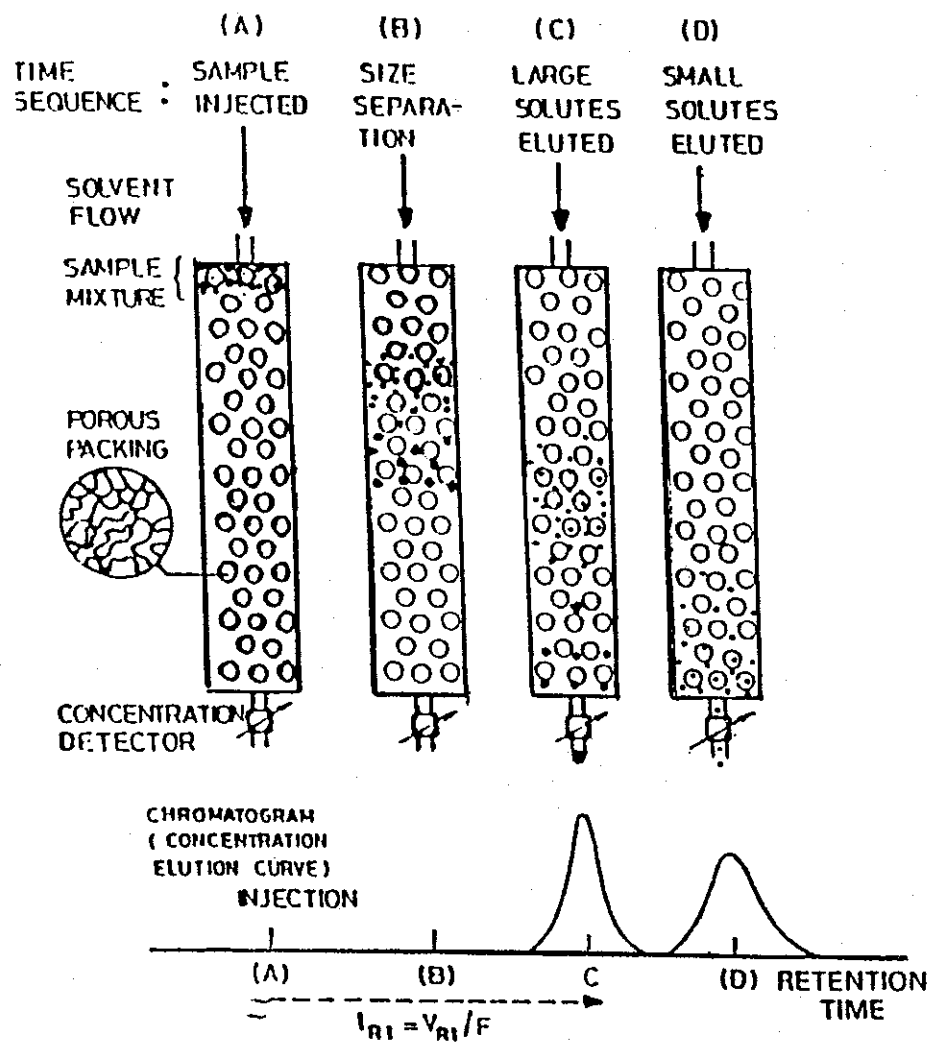


Figura 3. Ilustración del principio de la Cromatografía de Exclusión Molecular (29).

### 10.2.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Este tipo de cromatografía se fundamenta en general en la distinta afinidad de las sustancias por una fase estacionaria y una fase móvil, por el adsorbente y el eluyente (30).

La sustancia disuelta a separar se aplica sobre una placa de capa fina, esta es arrastrada por la fase móvil, se fija a la fase estacionaria por un tiempo determinado, es arrastrada de nuevo, y así sucesivamente. De esta manera es posible separar también las sustancias de afinidad parecida por ambas fases: aunque las diferencias sean pequeñas, conducen a eluciones distintas si actúan el suficiente número de veces. Los principios básicos en que se fundamentan las distintas afinidades son, el principio de adsorción y de partición (30).

En la adsorción, las sustancias disueltas en la fase móvil se acumulan (se adsorben) en la superficie de un adsorbente, por ejemplo sílica gel (30).

La partición aparece por la distinta solubilidad en dos fases inmiscibles (30).

## ANEXO 10.3 DESCRIPCION GENERAL DE LOS MICROORGANISMOS CONTRA LOS CUALES SE VERIFICARA ACTIVIDAD FARMACOLOGICA POSITIVA.

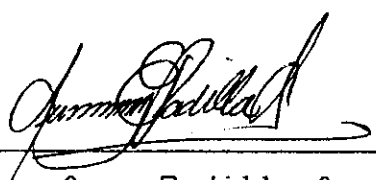
### 10.3.1 *Candida albicans*

Forma parte de la microbiota de la piel, mucosas y tracto gastrointestinal. Es capaz de producir levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas. Como parte de la microbiota normal, el microorganismo crece como una levadura con brotes; las hifas se producen sólo durante la invasión de tejidos. No se conoce con certeza la regulación de la morfogénesis de *C. albicans*; la producción de hifas *in vitro* de *C. albicans* se logra luego de incubar durante 90 minutos en suero a 37°C. Esta reacción se manifiesta por la aparición de un tubo germinal, el cual es un apéndice elongado que crece hacia afuera y tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble del largo de la célula levaduriforme (31).



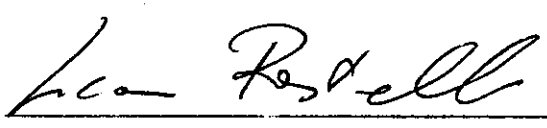
---

Br. Johanna Chew de Campos  
Tesisista



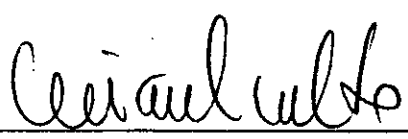
---

Licda. Aura Padilla Arreaga  
Asesora de Tesis



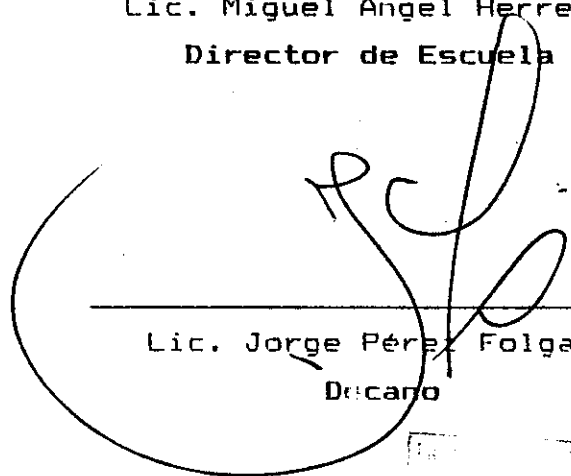
---

Dr. Luca Rastrelli  
Consultor de Tesis



---

Lic. Miguel Angel Herrera  
Director de Escuela



---

Lic. Jorge Pérez Folgar  
Decano

