

**Determinación de la Actividad Biocida de cinco plantas del género *Acalypha*
(*A. guatemalensis*, *A. arvensis*, *A. polystaquia*, *A. indica* y *A. pseudoalopecuroides*)**

Informe Final de Tesis

Presentado Por:

Mayra Ofelia Jiménez Navas

Previo a optar el título de

Química Farmacéutica

Guatemala, Mayo de 2005

INDICE

No. Página

1. Resumen	1-2
2. Introducción	3-4
3. Antecedentes	5-6
4. Justificación	7
5. Objetivos	8
6. Hipótesis	9
7. Materiales y Métodos	
7.1 Universo de trabajo	10
7.2 Recursos	10-12
7.3 Procedimiento	12-17
7.4 Tamizaje Fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro	18-23
7.5 Diseño de investigación	23-24
8. Resultados	25-32
9. Discusión de resultados	33-36
10. Conclusiones	37
11. Recomendaciones	38
12. Referencias	39-41
Anexos	42-44

1. RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó con el propósito de contribuir al estudio biológico y fitoquímico de las plantas medicinales utilizadas popularmente en Guatemala, por lo que resultó de interés seleccionar estas cinco especies del género *Acalypha* (*Acalypha arvensis*, *Acalypha pseudoalopecuroides*, *Acalypha guatemalensis*, *Acalypha indica* y *Acalypha polystaquia*) conocidas popularmente como hierba del cáncer.

Las plantas recolectadas, se secaron en secadores solares a la sombra. Se obtuvieron los extractos etanólicos mediante la técnica de percolación y concentración.

En la investigación se evaluó la actividad biocida y se caracterizaron los metabolitos secundarios de las cinco plantas en estudio *A. indica*, *A. guatemalensis*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. arvensis* y *A. polystaquia*.

Los resultados demostraron actividad positiva para *A. polystaquia*, *A. arvensis* y *A. guatemalensis* contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a una concentración de 1mg/ml Y *A. arvensis*, *A. guatemalensis*, *A. polystaquia* y *A. pseudoalopecuroides* contra *Cryptococcus neoformans* ATCC C13 a una concentración de 1mg/ml y 0.5mg/ml, respectivamente. Ninguna de las

especies presentaron actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

A través de ensayos macro y semimicro y cromatografía en capa fina se realizó la caracterización fitoquímica, en el cual se identificaron los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de *A. indica*, *A. guatemalensis*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. arvensis* y *A. polystaquia*, éstos fueron: flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos y cardenólidos.

2. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de nuevas alternativas para el tratamiento de diferentes enfermedades puede encontrarse no solamente en fármacos sintetizados en el laboratorio si no que en la biodiversidad de plantas que se encuentran en un país o región, donde la naturaleza es una excelente fuente de materias primas para el descubrimiento de nuevas moléculas que pueden actuar como tratamientos alternativos y para la elaboración de nuevos medicamentos.

El interés mundial por las plantas como fuente principal para el descubrimiento de nuevos medicamentos es ocasionado por los compuestos o metabolitos secundarios que están presentes en ellas, ya que estos compuestos químicos extraordinariamente diversos pueden tener actividades biológicas importantes tales como antimicrobianos, antitumorales, diuréticos, analgésicos, antiespasmódicos, entre otros.

Los estudios sobre la diversidad biológica de un lugar para el descubrimiento de nuevos fármacos consiste en detectar una planta que no haya sido estudiada previamente, evaluar su actividad mediante bioensayos, determinado e identificando los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica y por ende terapéutica.

Estudios realizados reportan que en la base de datos NAPRALERT el extracto etanólico de *A. guatemalensis* posee actividad antimicrobiana, por lo que surge el interés de evaluar otras especies de este género como:

(*A. rvensis*, *A. polystaquia*, *A. indica*, *A. pseudoalopecuroides*) para determinar el poder inhibitorio de éstas.

3. ANTECEDENTES

La actividad biocida se define como: " La capacidad que posee un fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos ". Generalmente los compuestos que poseen dicha actividad vienen a tener un gran interés a nivel mundial, ya que con ellos se puede controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos.

Se han realizado investigaciones de la actividad antimicrobiana del género *Acalypha*, principalmente de la especie *A guatemalensis* en el cual se hace referencia que dicha especie poseen actividad biocida. Las publicaciones muestran que esta planta verdaderamente posee esta actividad, por otro lado en la base de datos NAPRALERT reporta que esta especie posee dicha actividad. (12.5,12.6,12.7,12.8,12.9,12.10,12.11)

Las especies del género *Acalypha* pertenecen a la familia Euphorbiaceae. Son arbustos o árboles que después de cortados expiden jugo lechoso , con hojas alternas o raramente opuestas, con estípulas, generalmente simples y cuando son compuestas, siempre palmeadas y nunca pinnadas. Flores regulares, unisexuales monoicas como en *Euphorbia* o dioicas como en *Mercurialis*; perianto generalmente de cinco piezas, pero en algunos géneros también hay pétalos y en otros falta totalmente el periantio; de uno a numerosísimos estambres de anteras con dos (algunas veces 3-4) tecas, con deshiciencia normalmente longicida, rara vez poricida; en las flores femeninas es frecuente la presencia de un pistiloidio (ovario no funcional); ovario súpero, generalmente consistente en tres carpelos

soldados, de tres cavidades con 1 ó 2 óvulos en cada cavidad, sobre placentas axilares; estilos libres o unidos en forma variable. Fruto generalmente esquizocarpo, algunas veces drupa; en cierto número de géneros, las semillas tienen carúncula, como en *Euphorbia*, *Jatropha* y *Ricinus*, normalmente tienen abundante esdospermo. (12.28)

Es una familia predominantemente tropical, este género cuenta con más de 400 especies de plantas, al menos 31 especies se encuentran en Guatemala tales como Huehuetenango, Chimaltenango, Quiché, Sacatepéquez, Sololá y Quetzaltenango. En nuestro país son conocidas comúnmente como hierba del cáncer y se les atribuye múltiples propiedades medicinales. (12.4)

Los usos que se le han atribuido a estas plantas son para afecciones gastrointestinales, diuréticas, para tratar afecciones de la piel, reumatismo, pielonefritis, resfrío, heridas, llagas, dolores del cáncer, pies cansados, dolor de cabeza y menstrual. (12.4)

Para la determinación de la actividad biocida se utilizará el método descrito por Mitscher *et al.* El procedimiento a realizarse consiste en una distribución homogénea del compuesto en el agar. Por lo que la actividad se determinará por el crecimiento de bacterias, hongos, levaduras inoculadas en la superficie de los medios. (12.24,12.24,12.26)

Según las fuentes bibliográficas indicadas en la revisión en la base de datos NAPRELERT, solo existen estudios sobre la actividad farmacológica *in vitro* de la *A. guatemalensis*.

4. JUSTIFICACIÓN

La población guatemalteca ha utilizado las plantas medicinales desde la antigüedad con el propósito de aliviar diversas afecciones. Actualmente el uso de la medicina natural ha resurgido y tomado auge para tener otras alternativas terapéuticas por lo que resulta de interés evaluar a través de estudios fitoquímicos y biológicos la actividad que se les atribuye a dichas plantas, para ofrecer a la población un tratamiento accesible para las enfermedades infecciosas ya que éstas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en nuestro país.

Estudios encontrados en la base de datos NAPRALERT muestran que a través de ensayos biológicos se determinó que el extracto etanólico de *A. guatemalensis* posee actividad antibacteriana. Por esta razón es necesario realizar una comparación con otras especies del mismo género para verificar si todas poseen esta característica.

Estudios como el presente pretenden valorar, investigar, conservar y desarrollar los recursos naturales de Guatemala como fuente de nuevos fármacos y productos fitoterapéuticos que puedan combatir infecciones causadas por microorganismos que se han vuelto resistentes a los fármacos actuales, ya que por ser un país con una biodiversidad de plantas aún se desconoce el potencial que pueden tener las especies nativas para beneficio de la población.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL:

Contribuir al estudio de plantas, para dar nuevas alternativas terapéuticas en enfermedades infecciosas causadas por microorganismos.

5.2 ESPECIFICOS:

5.2.1 Evaluar la actividad biocida del extracto etanólico de las cinco plantas del género *Acalypha* (*A. guatemalensis*, *A. indica*, *A. arvensis*, *A. polystaquia*, *A. pseudoalopecuroides*).

5.2.2 Comparar el poder inhibitorio de la *A. guatemalensis* contra las otras cuatro especies.

5.2.3 Caracterizar los extractos etanólicos mediante tamizaje fitoquímico.

6.HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los cinco extractos etanólicos de *Acalypha* estudiadas posee actividad biocida.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

7.1.1 Población: Cinco especies de *Acalypha* conocidas popularmente como Hierba del Cáncer.

7.1.2 Muestra: Extracto etanólico de *A. guatemalensis*, *A. arvensis*, *A. polystaquia*, *A. indica* y *A. pseudoalopecuroides*.

7.2 RECURSOS:

7.2.1 Humanos:

Investigador:

-Br: Mayra Ofelia Jiménez Navas

Asesora

- Licda: Sully Cruz.

Colaborador:

- Lic: Armando Cáceres

7.2.2 Institucionales:

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales y Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Laboratorio Farmaya S.A, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Facultad de Agronomía, Universidad del Valle de Guatemala, OEA/AICD "Desarrollo de cultivo de plantas medicinales y producción de fitoterápicos".

7.2.3 Materiales y equipo para ensayos microbiológicos:

Autoclave
Cajas de Petri descartables
Cajas de Petri "cuadriplate"
Tubos de ensayo con tapón rosca
Campana de Flujo laminar
Incubadora
Balanza analítica
Material de laboratorio en general

7.2.4 Materiales y equipo para tamizaje fitoquímico:

Material Vegetal seco (< 10% de humedad), molida o picada,
Perfectamente identificada.
Evaporador rotatorio.
Bomba de vacío.
Percolador.
Vasos de precipitar.
Erlenmeyer.
Desecadora.
Cristalería y material de laboratorio en general.
Balanza analítica.

MEDIOS DE CULTIVO:

Agar Mueller Hinton
Caldo Tripticasa soya
Agar Sabouraud

MICROORGANISMOS:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC C13
Larvas de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Anopheles albimanus</i>	
Nauplios de <i>Artemia salina</i>	

REACTIVOS:

Disolventes para extracciones (etanol al 95%).

Hexano

Cloroformo

Metanol

7.3 PROCEDIMIENTO:**7.3.1 Obtención de los extractos:****7.3.1.1 Preparación de la materia seca vegetal.**

Obtener la planta a estudiar debidamente identificada, secarla y molerla.

Rotular la planta molida con nombre, fecha y parte.

Pesar 400 g de la planta si es densa (corteza, rizoma, semilla, pesar 100 g si son hojas.

7.3.1.2 Llenado del percolador:

- Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón no muy grande, de manera que sirva de filtro. Cortar un pedazo de papel filtro de forma circular y colocarlo cubriendo el fondo del percolador.
- Tapar la punta del percolador con un tapón plástico.
- Agregar la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y cubrir con etanol al 95%.
- Chequear que no queden burbujas y si las hay, hace presión con una espátula para desaparecerlas.
- Agregar el resto de material vegetal seco y cubrirla nuevamente con etanol al 95%, repetir el paso anterior.
- Rotular el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha y peso. Dejar reposar por 12-24 horas para que reaccione.
- Retirar el tapón plástico y dejar gotear hasta que salga todo el disolvente.
- Agregar el disolvente recuperado a la materia en extracción en el percolador, repetir esta operación cinco veces antes de comenzar a concentrar en rotavapor.
- Pasar el disolvente recogido al balón del rotavapor para concentrar.

7.3.1.3 Concentración en rotavapor

- Encender el baño María y llevar la temperatura a 40 ± 1 centígrados.
- Engrasar todas las bocas esmeriladas y armar el rotavapor según el instructivo específico.
- Succionar la solución obtenida del percolador (alcohol más planta).
- Conectar la bomba de vacío y el rotador e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a consistencia semisólida.
- Verter el extracto concentrado en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.
- Colocar en una desecadora durante 7-15 días.
- Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente taradas y rotulados.

- Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4 grados centígrados.

7.3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO

6.3.2.1 Preparación del Agar-Planta

- Preparar tubos con 9.0 ml Mueller Hinton.
- Esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 1 ml de la solución del extracto disuelto. Este debe tener una concentración de 10 mg /ml. La concentración final que se obtiene es de 1 mg / ml.
- Agitar y verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

7.3.2.2 Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 ml de agar Mueller Hinton inclinado, incubar a 36°C por 24 horas.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 ml de caldo Trypticasa Soya, incubar a 36°C por 48 horas.
- Diluir 0.05 ml de la suspensión anterior en 4.95 ml de agua destilada estéril (dilución 1: 100).
- Sembrar en cajas de Petri según la planta a utilizar.

* utilizar *M. smegmatis* y *C. neoformans* sin dilución.

7.3.2.3 Demostración de la actividad antibacteriana

- Inocular en las cajas con Agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36°C por 24 horas.
- Utilizar como control negativo 9 mL de Agar Mueller Hinton mezclado con 1 mL de etanol al 50 %.

7.3.2.4 Interpretación de resultados

- Si hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad negativa.
- Si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad positiva.
- Presencia de microorganismos fuera de la inoculación = contaminación.

7.3.2.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Preparar cajas cuadrilate con las siguientes diluciones del extracto:

- 3.6 mL de Agar + 0.4 ml de la solución de extracto = 1.0 mg / ml.
- 3.8 mL de Agar + 0.2 ml de la solución de extracto = 0.5 mg / ml.
- 3.9 mL de Agar + 0.1 ml de la solución de extracto = 0.25 mg / ml.
- Un cuadrante con 4.0 ml de Agar como control negativo.

Inocular tres estrías en cada uno de los cuadrantes e incubar a 36°C por 24 horas.

Realizar la lectura es interpretar según el paso de arriba.

7.3.3 TAMIZAJE ANTIMICÓTICO IN VITRO

7.3.3.1 Preparación de medio de cultivo para hongos levaduriformes

- Preparar tubos con 9.0 ml de Agar Mueller Hinton.
- Esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.0 ml del extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg /ml.
- Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

7.3.3.6 Inoculación de levaduras en placa

- Preparar cajas con Agar - Planta.
- Inocular con asa la suspensión de levaduras en cada sección según la plantilla.
- Incubar a 36°C durante 48 horas.
- Para el control negativo, sembrar por estrías la levadura en una caja con Agar Sabouraud.

7.3.3.7 Lectura e interpretación de resultados

Hongos levaduriformes

- Observar el crecimiento de la levadura en el medio:
- Crecimiento positivo = no actividad.

- Crecimiento negativo = inhibición o actividad antilevadadura.
- Para evaluar la concentración inhibitoria mínima (CIM), repetir la prueba con cantidades decrecientes del extracto vegetal (1:10, 1:50 y 1:100).

7.3.4 TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA

7.3.4.1 Cultivo de larvas de *Aedes aegypti*

- Colocar en un vaso de precipitar 200 ml del agua del chorro y dejar reposar por 48 horas.
- Agregar 40 mg de huevecillos de *A. aegypti*.
- Incubar por 24 horas a temperatura ambiente.

7.3.4.2 Determinación de la actividad larvicida.

- Pesar 1 mg del extracto a ensayar y disolver con 1 ml de agua de chorro reposada. En la microplaca agregar por triplicado: 100 μ l del extracto disuelto + 100 μ l de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.

Control negativo: 100 μ l de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.

- Incubar a temperatura ambiente (25-28°C) en un lugar oscuro durante 24 horas.
- Contar en el estereoscopio o microscopio el número de larvas muertas y determinar la CL_{100} (concentración letal al 100 %).

7.3.4.3 Interpretación:

La prueba de tamizaje es positiva si todas las larvas están muertas. Si el porcentaje de larvas muertas es del 100 por ciento calcular la CL_{100} , para ello repetir la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg / ml.

7.3.5 CITOTOXICIDAD CON *Artemia salina*

7.3.5.1 Preparación del agua de mar

- Disolver 35 gramos de sal de mar en un litro de agua destilada.
- Marcar en el vaso de precipitar el volumen de agua.
- Hervir por 30 minutos y completar el volumen que se evaporó según la marca.

-Filtrar y refrigerar hasta el momento de usar, es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

7.3.5.2 Cultivo de *A. salina*

-Colocar en un vaso de precipitar 200 ml de agua de mar y airear por una hora.

-Colocar el agua en la pecera y agregar 40mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).

-Incubar por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar los nauplios (larvas) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).

7.3.5.3 Determinación de la citotoxicidad

-Pesar 0.004 gramos del extracto a ensayar y disolver con 2 ml de agua de mar. Agregar por triplicado en un microplaca. 100 μ l del extracto disuelto + 100 μ l de agua de mar con 10-15 nauplios.

-Control negativo: 100 μ l de agua de mar con 10-15 nauplios.

-Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.

-Contar en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

7.3.5.4 Interpretación

-Calcular el porcentaje de camarones muertos:

-Sumar el número de camarones muertos en los tres pozos (X)

-Sumar el número total de camarones en los tres pozos (Y)

-Dividir X dentro de Y y multiplicarlos por 100

-Si el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50 por ciento, repetir la prueba utilizando concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg/ml. Obtener los valores de X y Y en cada dosis y determinar el valor de DL₅₀ con el programa de computadora Finney (DOS).

-Si el porcentaje es menor del 50 por ciento la citotoxicidad es mayor de 1mg/ml.

7.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO A TRAVÉS DE ENSAYOS MACRO Y SEMIMICRO:

Se realizan ensayos macro y semimicro en los que se evalúa la formación de precipitado y complejos coloreados. Se utilizan técnicas cromatografía en capa fina (CCF) convencionales para la caracterización fitoquímica.

7.4.1 Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: Pesar 1 g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego añadir 25 ml de metanol a 60°C. Filtrar con papel Whatman No 1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2N. La solución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

- Tubo 1: Agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's.
- Tubo 2: Agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff.
- Tubo 3: Agregar 5 gotas del reactivo de Wagner.
- Tubo 4: Testigo.

Usar como estándar soluciones al 1 por ciento de atropina y papaverina. Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

Cromatografía en capa fina: Pesar 1 g de material vegetal seco y molido, agregar 1 ml de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v) y extraer con 5 ml de metanol. Colocar en baño maría a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10 µl).

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1).

Detección: Reactivo de Dragendorff.

7.4.2 Investigación de flavonoides y antocianinas:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10ml de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 ml de metanol al 80 por ciento, filtrar y dividir en 5 tubos:

- Tubo 1: Agregar 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- Tubo 2: Agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).
- Tubo 3: Agregar 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (pruebas para leucoantocianinas).
- Tubo 4: Agregar magnesio metálico y 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado.
- Tubo 5: Testigo.

Evaluar reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

Cromatografía en capa fina: Extraer 1 g de material vegetal seco y pulverizado con 10 ml de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0,05 por ciento en metanol (10 µl).

Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol ácido acético-agua (40:10:50).

Detección: Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG).

Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

Solución 1: solución metanólica al 1 por ciento de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).

7.4.3 Investigación de antraquinonas:

Prueba de Borntrager: extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de etanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar en baño maría (60°C). Disolver el residuo con 30 ml de agua destilada y filtrar. Extraer con 10 ml de benceno. A la fase bencénica añadir 5 ml de solución de test de amonio y

agitar. Observar cambios de color en la fase alcalino (color rojo y rosado: positivo).

Prueba de Borntrager modificado: calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de hidróxido de potasio alcohólico 0.5N y 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento y calentar 10 minutos en baño de maría a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10 ml de benceno. A la capa bencénica adicionar 5 ml de solución de prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Cromatografía en capa fina: extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 ml de metanol en baño maría (60°C) por 5 minutos. Filtrar y aplicar 10 microlitros en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: solución al 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas (10 µl).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).

Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento.

Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365 nm.

Antronas y antralonas: zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm.

7.4.4 Investigación de cumarinas:

Ensayos macro y semimicro: medir 5 ml de extracto vegetal metanólico. Agregar 1 ml de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5 N. Observar bajo luz UV a 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

Cromatografía en capa fina: A un 1 g de material vegetal adicionar 10 ml de metanol y calentar 30 minutos en baño maría. Filtrar y evaporar hasta 1 ml. Aplicar 20 µl en una cromatoplaque de silicagel 60 f₂₅₄. Utilizar como estándar canela en metanol al 1 por ciento. Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento. UV 365 nm fluorescencia azul o verde.

7.4.5 Investigación de cardenólidos y bufadienólicos:

Presencia de lactonas insaturadas: extraer 10 g de material vegetal con 30 ml de etanol al 80 por ciento y filtrar. Colocar tres manchas del

extracto (0.1,0.2,0.3 ml) sobre un papel filtro. Secar y agregar unas gotas del reactivo de Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 por ciento.

Presencia de azúcares 2-desoxigenadas: evaporar 10 ml del extracto etanólico o metanólico, eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Secar el residuo y agregar 3ml de reactivo de Séller-Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2 ml de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. Observar la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo).

Cromatografía en capa fina: a 1 g de material vegetal agregar 20 ml de etanol al 50 por ciento y mantener en reflujo durante 15 minutos. Dejar enfriar y filtrar, el filtrado se trata con ácido acético glacial. Extraer en 3 porciones de 15 ml de diclorometano. Los extractos se filtran sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporan. Disolver con 1 ml de diclorometano/etanol (1:1) y aplicar 30-50 μ l en la cromatoplaqueta de silicagel 60F₂₅₄. Estándar digoxina 5 mg/2ml de metanol (20 μ l).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100: 13.5:10) acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8).

7.4.6 Investigación de saponinas:

Prueba de espuma:

- Tubo 1: 100mg de material vegetal pulverizado y seco.
- Tubo 2: 2 ml de control de saponinas (0.5%).
- Tubo 3: 2 ml de agua.

A cada tubo se le adiciona 10 ml de agua destilada. Calentar en baño de maría (60°C) durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 segundos. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos. Observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

Cromatografía en capa fina: 2 g de material vegetal seco, se extraen con 10 ml de etanol al 70 por ciento con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5 ml y proceder a aplicar 25-40 μ l en una cromatoplaqueta de silicagel 60F₂₅₄. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 μ l).

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40).

Detección: reactivo de sangre. Zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

(Reactivo de Liebermann-Burchard: UV 365 o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides).

(Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas).

(Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico zonas azules, violetas, amarillentas).

7.4.7 Investigación de principios amargos:

Cromatografía en capa fina: calentar 1 g de material vegetal con 10 ml de metanol en baño de maría a 60°C por 10 minutos. Evaporar y filtrar a 2 ml. Aplicar en la cromatoplaca. Estándar: artemisina al 1 por ciento en metanol (20 µl).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo-metanol (95:5).

Detección vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafes-rojas, azules-verdes.

(Reactivo de Liegermann-Buchard: UV 365 nm: gris, café, VIS: café oscuro, gris).

7.4.8 Investigación de taninos:

Ensayos macro y semimicro: extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 ml de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y evaporar a sequedad. Añadir 25 ml de agua caliente al residuo y agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 1 ml de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y filtrar. Adicionar 3 ml del filtrado a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: testigo.
- Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v).
- Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10 por ciento).
- Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración.

Con cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol, negro-azulado: pirogalol.

7.4.9 Investigación de glicósidos cianogénicos:

Prueba de Guignard: colocar 2 a 5 g de material vegetal pulverizado en un erlenmeyer de 125 ml y humedecer con agua, adicionar 1 ml de cloroformo. Aparte, introducir una tira de papel Whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente secar: La tira de papel húmedo insertarla en el erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar a una distancia de 1 cm de la muestra. Doblar el papel y tapar el erlenmeyer con un corcho. Calentar en baño de maría a 37 °C durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo- café).

7.4.10 Investigación de aceites volátiles:

Cromatografía en capa fina:

Método A: extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de diclorometano agitando por 15 minutos. Filtrar y evaporar en baño de maría (60°C) a sequedad.

Disolver en 1 ml de tolueno y aplicar 20-50 µl en cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄.

Método B: pesar 10-50 g de material vegetal y destilar con arrastre de vapor por 1 hora. Recolectar el aceite esencial en xileno. Diluir la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y aplicar 5 µl (1:10) en cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄.

Estándar: solución de tolueno 1:30 de metanol, timol, eugenol y linalool (3 µl).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, vanillina-ácido sulfúrico. Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

7.5 Diseño de la investigación:

7.5.1 Se realizó un estudio no probabilístico a conveniencia, utilizando estadística no paramétrica, si presento crecimiento positivo hay actividad y si presento crecimiento negativo no hay actividad, realizando cuatro réplicas por especie y luego se determino la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la actividad bactericida y

antifúngica , cuatro replicas para la CL_{50} de la actividad citotóxica y CL_{100} para actividad larvicida. Las plantas seleccionadas para este estudio son conocidas popularmente como Hierba del cáncer, algunas con pocos estudios realizados.

El análisis estadístico se hizo por medio de la prueba de hipótesis de una variable binomial con un nivel alfa de 0.10.

En cuanto a la determinación de alcaloides, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, cardenólidos, bufadienólicos, principios amargos, taninos, glicósidos cianogénicos y aceites volátiles se realizó por medición de Rf, ensayos macro y semimicro de reacciones de coloración y precipitación.

8. RESULTADOS

8.1 Rendimiento de las plantas en estudio:

En la tabla No. 1 se observan las cantidades de material vegetal seco, la cantidad de extracto obtenido y el porcentaje de rendimiento de cada planta.

Tabla No. 1

Planta	Peso (g)	Extracto (g)	% de rendimiento
<i>A. indica</i>	136.8	13.5885	9.93
<i>A. arvensis</i>	150.0	3.7253	2.48
<i>A. pseudoalopecuroides</i>	150.0	9.4978	6.33
<i>A. guatemalensis</i>	200	24.9663	12.48
<i>A. polystaquia</i>	150.0	8.0993	5.39

8.2 Determinación de la actividad contra bacterias, levaduras, crustáceos y larvas:

8.2.1 Fase tamizaje

Se determinó la actividad de cada uno de los extractos etanólicos obtenidos, contra las bacterias gram (+): (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) gram (-) : (*Escheichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*) , hongos levaduriformes : (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*). Tabla No. 2

Tabla No. 2

Actividad antibacteriana de las plantas en estudio en el procedimiento de tamizaje.

Especie	Parte	A	B	C	D	E	F	G	H	P
<i>A. indica</i>	Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	---
<i>A. arvensis</i>	Hoja	-	-	-	-	+	-	+	-	0.062
<i>A. pseudoalopecuroides</i>	Hoja	-	-	-	-	-	-	+	-	0.062
<i>A. guatemalensis</i>	Hoja	-	-	-	-	+	-	+	-	0.062
<i>A. polystaquia</i>	Hoja	-	-	-	-	+	-	+	-	0.062

Organismos ensayados: Bacterias Gram (+) (A: *Staphylococcus aureus*; D: *Bacillus subtilis*) Bacterias Gram (-) (B: *Salmonella typhi*; E: *Pseudomonas aeruginosa*; C: *E. coli*) Levaduras (F: *Candida albicans*; G: *Cryptococcus neoformans*) C: *Mycobacterium smegmatis*. P: probabilidad estadística.

Referencias: (+) = No hay crecimiento o actividad positiva, (-) = Si hay crecimiento o actividad negativa

Cuando un microorganismo fue inhibido o no en su crecimiento, se consideró que el extracto tenía actividad positiva (+) o negativa (-), respectivamente. Según se observa en la tabla anterior, las especies *A. arvensis*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* tienen actividad positiva contra los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Cryptococcus neoformans*. Estos mismo extractos no presentaron actividad contra el resto de los microorganismos en estudio.

8.2.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):

Está determinación se realizó con los extractos que presentaron actividad positiva en la fase de tamizaje. Los resultados se observan en la tabla No. 3

Tabla No. 3

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de la Actividad antibacteriana de las plantas que fueron positivas en el ensayo anterior

Especie	Parte	Concentración Mínima inhibitoria (mg/ml)	
		E	G
<i>A. arvensis</i>	Hoja	1	1
<i>A. pseudoalopecuroides</i>	Hoja	NE	0.5
<i>A. guatemalensis</i>	Hoja	1	1
<i>A. polystaquia</i>	Hoja	1	1

Organismos ensayados: E: *Pseudomonas aeruginosa*; G: *Cryptococcus neoformans*
NE: no ensayado por no presentar actividad en la fase de tamizaje.

Se observa que los extractos etanólicos de *A. arvensis*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* inhibieron el

crecimiento de los microorganismos contra los que se habían evaluado en la fase de tamizaje.

8.2.3 Determinación de la actividad larvicida:

Esta prueba se realizó con los extractos etanólicos contra larvas de los mosquitos *A. aegypti* y *A. albimanus* de 24 horas de vida, mediante un ensayo en placa y por triplicado. Se estableció que la actividad positiva era considerada si el extracto en estudio provocaba la muerte del 100% de las larvas presentes en los pozos de la placa. Se estableció que la Concentración Letal (CL_{100}) es mayor de 1 mg/ml. Ver tabla No.4

Tabla No. 4

Actividad larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus* de las cinco especies en estudio en mg/ml

Especie	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albimanus</i>
<i>A.. indica</i>	>1	>1
<i>A.. arvensis</i>	>1	>1
<i>A.. pseudoalopecuroides</i>	>1	>1
<i>A.. guatemalensis</i>	>1	>1
<i>A.. polystaquia</i>	>1	>1

Concentración Letal CL 100 para cada especie

8.3 Determinación de la actividad citotóxica contra *Artemia salina*:

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en el bioensayo contra *A. salina* de las especies en estudio.

Se observó que los extractos etanólicos presentan actividad citotóxica menor a 2mg/ml, se realizó nuevamente la prueba utilizando diferentes

concentraciones de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml, para obtener a través del programa Finney la concentración letal media (CL_{50}).

Tabla No. 5

Actividad citotóxica de las cinco especies en estudio contra Nauplios de *Artemia salina*

Especie	No. nauplios muertos por dosis			Dosis Letal DL_{50} mg/ml	Intervalo de confianza LCS-LCI al 95%
	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25 mg/ml		
<i>A. indica</i>	6	3	1	0.79	0.346-0.628
<i>A. arvensis</i>	5	4	3	0.99	0.134-0.478
<i>A. pseudoalopecuroides</i>	5	4	2	0.91	1.652-0.036
<i>A. guatemalensis</i>	4	3	1	1.30	7.649-0.500
<i>A. polystaquia</i>	5	3	2	1.05	0.261-0.334

8.4 Tamizaje Fitoquímico:

A través de ensayos macro y semimicro y la técnica de cromatografía en capa fina se encontraron los metabolitos secundarios presentes en las hojas de los extractos etanólicos de *A. polystaquia*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. indica*, *A. guatemalensis*, *A. arvensis*, así como también las diferentes fases móviles que se utilizaron y métodos de detección: Ver tablas No. 6-15

Tabla No. 6
Alcaloides

Especie	Ensayo	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mayer • Dragendorff • Wagner • Cromatografía en capa fina: Estándar de papaverina y atropina 	• Turbidez	Positivo
<i>A. arvensis</i>		• Precipitado	Positivo
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			Negativo
<i>A. guatemalensis</i>		• Ninguna fluorescencia	Negativo
<i>A. polystaquia</i>		• Anaranjado	Rf 0.54, 0.32

Fase móvil: Tolueno-Acetato de etilo-dietilamina. (14:4:2)

Revelador: Reactivo de Dragendorff

Tabla No. 7
Flavonoides

Especie	Ensayo	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • HCl 2 N FeCl₃ HCl (concentrado) Magnesio+HCl • Cromatografía en capa fina • Estándares: Acid. clorogénico Quercetina Rutina Naringenina 	<ul style="list-style-type: none"> • Coloración verde en todas las plantas • Zonas verdes a 365 nm • Amarilla • Anaranjado • Anaranjado • Amarillo 	<ul style="list-style-type: none"> • Positiva para todas las plantas • Rf 0.81, 0.88, 1; 0.88, 0.99,1; 0.88,0.97,1; 0.88,0.97,1;0.99 • 0.82 • 0.99 • 0.99 • 1
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico- ácido acético glacial-agua. (20:2.2:2.2:5.4)

Revelador: Reactivo de productos naturales

Tabla No. 8
Antocianinas

Especie	Ensayo	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía en capa fina • Estándares: Rojo de sudán Azul de metileno 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorescencias Violeta y roja únicamente para la <i>A. indica</i> • Zonas Rojas • Zonas Azules 	Rf 0.95 y 0.56 . 0.91 y 0.55 0.35
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Fase móvil: n-Butanol-ácido acético glacial-agua. (8.2:4)

Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico

Tabla No. 9
Antraquinonas

Especie	Ensayo	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de Bornträger • Cromatografía de capa fina • Estándar Hojas de sen 	<ul style="list-style-type: none"> • Coloración rojo • Fluorescencia Rojo Amarillo • Rojo 	<ul style="list-style-type: none"> • Positiva para todas las plantas • Rf : 0.81,0.82,0.79,0.81,0.82 0.84,0.30,0.77 • 0.83
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua. (20:3.4:2.6)

Revelador: KOH al 5%

Tabla No. 10
Cumarinas

Especie	Ensayo	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • KOH 0.5N • Cromatografía en capa fina 	<ul style="list-style-type: none"> • Coloración verde • Fluorescencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Azul a 365
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			

<i>A. polystaquia</i>	<ul style="list-style-type: none"> Estándares: 	azul o verde a 365 nm	nm para todas las plantas Rf: 0.079,0.36,0.067 y 0.43,0.067,0.067 67, 0.43
	Cumarina	Azul y verde	

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo. (18.6:1.4) . Revelador: KOH al 5%

Tabla No. 11

Saponinas

Especie	Ensayos	Reacción	Resultados
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> Prueba de espuma Cromatografía en capa fina Estándar: Colesterol 	<ul style="list-style-type: none"> Presencia de espuma Fluorescencia violeta y amarilla Violeta 	<ul style="list-style-type: none"> Positivo Rf: 0.82 y 0.88,0.82 y 0.91, 0.81 y 0.91, 0.87, 0.91 0.78
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Fase móvil: Cloroformo-metanol-agua. (6.4:5:2)

Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico

Tabla No. 12

Principios Amargos

Especie	Ensayos	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	Cromatografía en capa fina	Fluorescencia violeta verde	Rf 0.86,0.89,0.63,0.87,0.87 0.95,0.95,0.95,0.94,0.95
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua. (15.4:3:1.6)

Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico al 5%

Tabla No. 13

Cardenólidos

Especie	Ensayos	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> Cromatografía en capa fina Estándar de digoxina 	<ul style="list-style-type: none"> Fluorescencia Verde Azul Café Amarillo Azul 	<ul style="list-style-type: none"> Rf : 0.59,0.12,0.41,0.54,0.35 0.69,0.58,0.60,0.59 0.94, 0.91 0.93, 0.91 0.64
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua. (25:3.4:2.5)

Revelador: Tricloruro de antimonio

Tabla No. 14
Taninos

Especie	Ensayos	Reacción	Resultado
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatina al 1% • Gelatina- sal • FeCl₃ al 10 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitado • Precipitado • Cambio de color o Precipitado 	Negativo para todas las plantas
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Tabla No. 15
Aceites volátiles

Especie	Ensayos	Reacción	Resultados
<i>A. indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía en capa fina Estándares: <ul style="list-style-type: none"> • Eugenol • Linalool • Timol 	<ul style="list-style-type: none"> • Color azul únicamente en la <i>A. indica</i> • Amarillo • Azul • Rojo 	Rf : <ul style="list-style-type: none"> • 0.41 • 0.50 • 0.38 • 0.61
<i>A. arvensis</i>			
<i>A. pseudoalopecuroides</i>			
<i>A. guatemalensis</i>			
<i>A. polystaquia</i>			

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo. (93:7)

Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico al 5%

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La obtención de los extractos etanólicos de las hojas de las especies de *Acalypha* se realizó a través de concentración por medio del método de percolación, presentándose un rendimiento mayor de extracto de 12.48% para la especie *A. guatemalensis*, un 9.93% para *A. indica*, 6.33% *A. pseudoalopecuroides*, 5.39% *A. polystaquia* y 2.33% para *A. arvensis*. El rendimiento del extracto etanólico depende de varios factores tales como: procedimiento para la extracción, época de corte, sistema de cultivo, época del año y grado de humedad de la planta. Estos factores influyeron en los porcentajes de rendimiento en todas las especies en estudio.

El ensayo *in vitro* para evaluar la actividad contra bacterias y levaduras determinó que las especies de *A. arvensis*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* presentaron actividad positiva contra los microorganismos *Pseudomona aeruginosa* y *Criptomococcus neoformas*, las otras dos especies del género *Acalypha*, *A. indica* y *A. pseudoalopecuroides* presentaron actividad positiva contra *C. neoformans* en la fase de tamizaje, encontrándose que poseen significancia estadística ya que su valor P fue de 0.062.

Las especies que presentaron actividad significativa en la fase de tamizaje, se les determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) utilizando diferentes concentraciones de los extractos y enfrentándolos a los microorganismos en los que presentaron actividad positiva, y se determinó que *A. polystaquia*, *A. arvensis* y *A. guatemalensis* presentaron actividad contra *P. aeruginosa* a una concentración de 1mg/ml, *A. arvensis*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* contra *C. neoformans* a una concentración de 1mg/ml y *A. pseudoalopecuroides* a una concentración de 0.5mg/ml, por lo que se evidenció que las especies de *Acalyphas* poseen actividad contra bacterias Gram negativas y hongos levaduriformes a concentraciones mínimas.

Se comparó el poder inhibitorio de *A. guatemalensis* con las tres especies que presentaron actividad, donde se estableció que efectivamente estas especies inhibieron los microorganismos que *A. guatemalensis* inhibe a diferentes concentraciones.

En la determinación de la actividad larvicida de las cinco especies evaluadas se estableció que ninguna de las especies vegetales presentó actividad con ninguna de las dos especies los mosquitos ensayadas.

Al evaluar la actividad citotóxica contra *Artemia salina* se determinó que todas las especies presentaron actividad citotóxica a una concentración letal media (CL_{50}) de 0.79, 0.91, 1.30, 0.99 y 1.05mg/ml para *A. guatemalensis*, *A. polystaquia*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. indica* y *A. arvensis* respectivamente.

Todas las especies presentaron metabolitos secundarios tales como flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos y cardenólidos.

Se emplearon diferentes fases móviles y reactivos para la detección de los metabolitos secundarios, encontrándose que las fases que permiten mejores resultados en el tamizaje fitoquímico fueron las siguientes:

- Alcaloides
Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (14:4:2)
Detección: Reactivo de Dragendorff UV-365 nm
- Flavonoides
Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (20:2.2:2:2:5.4)
Detección: Reactivo de productos naturales UV-365nm
- Antocianinas
Fase móvil: n-butanol-ácido acético glacial-agua (8:2:4)
Detección: Vainillina-ácido sulfúrico VIS
- Antraquinonas
Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (20:3.4:2.6)
Detección: solución etanólica de hidróxido de sodio al 5 %
- Cumarinas
Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (18.6:1.4)
Detección: solución etanólica de hidróxido de sodio al 5 %
- Saponinas
Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (6.4:5:2)
Detección: Vainillina-ácido sulfúrico VIS

- Principios amargos

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (15.4:3:1.6)

Detección: Vainillina-ácido sulfúrico VIS

- Cardenólidos

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (25:3.4:2.5)

Detección: Tricloruro de antimonio VIS

- Aceites volátiles

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7)

Detección: Vainillina-ácido sulfúrico VIS

10. CONCLUSIONES

- 10.1 *A. arvensis*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* presentaron actividad biocida positiva en la fase de tamizaje.
- 10.2 La Concentración mínima inhibitoria (CIM) es 1mg/ml para *A. arvensis*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* y 0.5mg/ml para *A. pseudoalopecuroides* contra *Cryptococcus neoformans*.
- 10.3 Los extractos etanólicos de *A. polystaquia*, *A. arvensis* y *A. guatemalensis* tienen actividad positiva contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIM 1mg/ml).
- 10.4 Ninguno de los extractos etanólicos de las cinco especies en estudio tienen actividad larvicida contra las larvas de *Aedes aegypti* y *A. albimanus*.
- 10.5 Todos los extractos etanólicos de las cinco especies en estudio presentaron actividad citotóxica contra los nauplios de *Artemia salina*.
- 10.6 Los metabolitos secundarios identificados en las hojas de las cinco especies de *Acalypha* son: flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos y cardenólidos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar ensayos biocidas similares a los del presente estudio, con extractos de diferente polaridad de las plantas con actividad biocida positiva.
- 11.2 Evaluar la actividad farmacológica de los extractos de las plantas con el propósito de validar las propiedades medicinales que se les atribuyen popularmente.
- 11.3 Determinar cuál de las fracciones de los extractos con actividad positiva es la más efectiva contra los microorganismos estudiados.
- 11.4 Continuar con estudios fitoquímicos para determinar los compuestos responsables de la actividad.

12- REFERENCIAS

- 12.1. Anderson JE, Gotees CM & McLaughlin. 1991. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2: 107-111.
- 12.22. Brancato, FP & Goldings NS. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *J. Mycol.* 45: 848-863.
- 12.3. Burlingame EM & Reddish GP. 1973. Laboratory Methods for testing fungicides used in treatment of epidermophytoses. *J. Lab. Clin. Med.* 14: 649-653.
- 12.4. CÁCERES, A. *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Editorial Universitaria. 1996.P. 200-1.
- 12.5. CÁCERES, A. *et al.* 1991. Plants Used In Guatemala for the Treatment of Respiratory Diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. P. 193,197,200.
- 12.6. CÁCERES, A. *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. P. 263,270, 272,273.
- 12.7. CÁCERES, A. *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*. P. 277,279,281.
- 12.8. CÁCERES, A. *et al.* 1987. Screening of Antimicrobial Activity of Plants Popularly used in Guatemala for the Treatment of Dermatomucosal Diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. P. 223,228,233,234.
- 12.9. CÁCERES, A. *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *Journal of Ethnopharmacology*. P. 31,33,34.
- 12.10. CÁCERES, A. *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62: 195-202.
- 12.11. CÁCERES, A. *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62: 195-202
- 12.12. CYTED. Actividad antiprotozoaria in vitro. 1993. Manual de Técnica de Investigación. Bogotá, Proyecto X-1, s/p.
- 12.13. CYTED. 1993. Manual de Técnica de Investigación. Bogotá, Proyecto X-1, s/p.

- 12.14. CHARIANDY, MC. *et al.* 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *J. Ethnopharmacol.* 64: 265-270.
- 12.15. GEORGE H.M, LAWRENCE. Taxonomy of Vascular Plants.
- 12.16. GIRÓN, L. *et al.* 1991. Etnobotanical Survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology.* P. 173,180,186.
- 12.17. GUTIERRES, M. *et al.* 2002. New Antimicrobial Cycloartane Triterpenes from *Acalypha communis*. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy.* P. 872-875.
- 12.18. JAKI, B. *et al.* 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine, shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biol.* 37: 138-143.
- 12.19. KAGAN, J. *et al.* 1983. The phototoxicity of some 1, 3-butadienes and related thiophenes against larva of the mosquito *Aedes aegypti* and of the fruit fly *Drosophyla melanogaster*. *Insecta. Sci. Appl.* 4:377-381.
- 12.20. MARADUFU A, LUBEGA R & DORN F. 1978. Isolation of (5-E)-ocinonea mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. *Lloydia* 41: 181-183.
- 12.21. MEYER BN, FERRIGNI NR & PUTNAM JI. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta medica* 45: 31-34.
- 12.22. MICHAEL A, THOMPSON CG & ABRAMOVITZ M. 1956. *Artemia salina* as a test organism bioassay. *Science* 123: 464.
- 12.23. MISHRA, SK. *et al.* 1987. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *J. Indust. Microbial.* 2: 267-276.
- 12.24. MITSCHER L, *et al.* Antimicrobial agents higher plants. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia.* 35. P. 157-166.
- 12.25. MITSCHER LA, DARKER S & GOLLAPUDI A. 1987. A modern look at folkloric use anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 5: 1025-1041.
- 12.26. MITSCHER *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia* 35: 157-166.
- 12.27. SOLIS PN *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta medica* 59: 250-252.
- 12.28. STANDLEY PAUL. *Flora de Guatemala. Parte VI.* Fieldiana: Botany. Vol 12.24. Chicago Natural History Museum. December 27, 1949. P. 25-42.
- 12.29. SM *et al.* 1994. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 5. Vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia* 65: 273-274

- 12.30. THANGAM T & KATHIRESAN K. 1997. Mosquito larvicidal activity of mangrove plant extracts and synergistic activity of *Rhizophora apiculata* with pyrethrum against *Culex quinquefasciatus*. *Int. J. Pharmacog.* 35: 69-71.
- 12.31. UGAZ, OLGA LOCK. Investigación Fitoquímica. Editorial fondo 1994. Pontificia Universidad Católica del Perú. Segunda edición. P 114-120 y 146-147.
- 12.32. WAH SAM T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In. Colígate FM & Molineux RJ. *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination.* Boca Raton, CRC Press
- 12.33. WAGNER, H. *et al.* 1984. *Plant Drug Analysis.* Berlin- Heidelberg. Springer-Verlag. Pp 5-6, 51-53, 125-127, 145-147, 163-164, 195-197, 225-226, 269-270.
- 12.34. ZARRAUG, IMA. *et al.* 1988. Evaluation of Sudanese plant extracts as mosquito larvicides. *Int. J. Crude Drug Res.* 26: 77-80.

13. ANEXOS

13.1 Clasificación Botánica de las cinco especies en estudio *A. indica*, *A. guatemalensis*, *A. polystaquia*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. arvensis* (Hierba del Cáncer).

Reino	Plantae
Subreino	Embryobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Euphorbiales
Familia	Euphorbiaceae
Género	<i>Acalypha</i>
Especie	<i>indica, guatemalensis, polystaquia, pseudoalopecuroides, arvensis</i>

13.2 Descripción botánica:

13.2.1 *Acalypha arvensis*.

Planta anual erecta o ascendente, pequeña de 50 cm de altura o menos, ramas simples, tallos alargados, protuberancias en la parte inferior, separados o glabros y pubescentes en las partes jóvenes. Hojas: membranosas, peciolas de 2-3.5 cm de largo, romboides-ovaladas o romboides-lanceoladas, de 3-7 cm

de largo, aguda o obtusa, obtusa en la base, palmeadas-nervadas, aserradas, con vellosidades sobre ambas superficies. Espiga: pedunculadas-delgadas, androginas, pistilos superiores, 1.5-2.5 cm de largo, 10-13 mm. Anchas, flores con pocos estambres, espigas inferiores con estambres de 2 mm. Frutos bracteados de 5mm de ancho, 4-7 lóbulos intermedios, lóbulos triangulares ovalados, algunas veces pelos en la punta de la glándula. Cápsula de 2mm, ancha, pilosa.

13.2.2 *Acalypha guatemalensis*.

Planta herbácea, usualmente es perenne o anual, erecta o ascendente, algunas veces de un metro de largo pero usualmente es mas corta, ramas simples, en su mayor parte erecta, cuando es joven es pubescente. Hojas: peciolo de 3 cm de largo, usualmente cortas, redondo-ovalado o romboide-ovalado de 4-7 cm de largo, agudo, obtuso usualmente ancho en la base, membranosas, 5 nervios, delgados y largos y venas un poco densas y pubescentes, después glabras. Flores: monoicas, en su mayor parte sus espigas son androginas, terminales o auxiliares, generalmente son numerosas, de 4-5 cm de largo o menos, muy densas, pocas flores, pedunculadas. Estambres en las espigas cortas. Fruto: con pistilos bracteados de 5mm de ancho, 5-7 lobulos intermedio, 1-2 flores, lóbulos lanceolados. Ovario rojo purpura, capsula tuberculada de 3 mm de diámetro, ovoide, liso de 2 mm de largo.

13.2.3 *Acalypha polystachya*:

Planta anual erecta, tallo suculento de un metro de alto, simple y luego fistuloso, puberulento cuando joven. Hojas: peciolo delgado de 4-12 cm de largo, ovalada de 10 cm de largo y 6-9 cm de ancho, base redonda, fina y

serrada, piloso delgada sobre ambas superficies o glabrosos, algo pálido por debajo, palmeadas de 3-5 cm nervios. Flores: monoicas, estambres en las espigas auxiliares de 4cm de largo o menos, delgados, densos, pistilos en mayor parte en la espigas terminales, frutos de 15 cm de largo y 1 cm de ancho, densos y mas abajo con interrupciones frecuentemente, pistilos bracteados de 9-11 partes cerca de la base, en segmentos casi separados, una flor, ovarios glabroso, cápsula de 4-5 cm de diámetro, semillas ovoides de 3 mm de largo.

12.3.3 *Acalypha pseudoalopecuroides*:

Planta anual, de 50 cm de alto o menos, erecta, usualmente con numerosas extensiones en las ramas tronco denso piloso y glandular, frecuentemente con vellosidades en la base. Hojas: delgadas pecioladas de 1-2 cm de largo y 1.5-3 cm de ancho, redonda, 5 nervios en la base, esparcidos o densas vellosidades sobre ambas superficies, glabradas, punticuladas. Flores: monoicas, estambres en las espigas terminales de 1 cm de largo, delgadas, pedunculadas; pistilos unisexuales, pocas flores; pistilos bracteados en la superficie, ovario simple, capsula pubescente de 2.5 cm, semillas de 1.5 cm de largo.

13.3.5 *Acalypha indica*:

Planta anual de 50 cm del alto o menos, ramas delgadas, tallos escasamente pubescentes, glabrosos. Hojas: largas, peciolos, cortas o usualmente obtusos redondeando la base, glabras cerca de los cinco años, nervios en la base; espigas auxiliares, androginosas, solitarias o germinadas, en su mayoría son cortas; estambres de 1 cm de largo o menos, 1-4 pistilos bracteados; ovario corto , esparcido; Cápsula de 2 mm de ancho; semillas anchas ovoides, 1.5 mm de largo.