

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

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO Y SUS PARTICIONES (HEXÁNICA, CLOROFÓRMICA,  
ACETATO DE ETILO Y ACUOSA) DE HOJAS DE  
*Cornutia pyramidata* L. (JOROBTE)”**



RUTH YARSENY MOLINA GONÓN

Química Farmacéutica

Guatemala, Octubre de 2005.

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

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO Y SUS PARTICIONES (HEXÁNICA, CLOROFÓRMICA,  
ACETATO DE ETILO Y ACUOSA) DE HOJAS DE  
*Cornutia pyramidata* L. (JOROBTE)”**

Informe de Tesis



Presentado por:

RUTH YARSENY MOLINA GONÓN

Para optar al título de  
Química Farmacéutica

Guatemala, Octubre de 2005.

# ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	4
4. Justificación.....	17
5. Objetivos.....	18
6. Hipótesis.....	19
7. Materiales y métodos.....	20
8. Resultados.....	37
9. Discusión.....	45
10. Conclusiones.....	48
11. Recomendaciones.....	49
12. Referencias.....	50
13. Anexos.....	56

## ACTO QUE DEDICO

A DIOS Por ser templanza, consuelo y una luz en mí camino. Gracias.

A MI PADRES Las personas que más influido en mi vida, a mi Papá Ramiro Molina (†), por su espíritu generoso, alegre, valiente y aventurero, por su ejemplo de vida, pero sobretodo por su amor y apoyo incondicionales. A mi Mamá Marta Gonón de Molina, por su fortaleza, generosidad, infinita paciencia y amor.

Gracias a ambos, no pude pedir mejores padres.

A MIS HERMANOS Iris, Noemí, Edwin y Emmanuel, por su cariño, apoyo incondicional, confianza y respaldo, ahora más que nunca, gracias.

A MI ABUELITA Cruz (Ma Pita), por las bendiciones que a través de sus oraciones recibo de Dios.

A MIS SOBRINOS Cynthia, Fernanda, Diego, Mimi, María, Adriana, Lucía y Ramiro, por las risas, los sueños y la esperanza.

A MIS AMIGAS y AMIGOS Especialmente Ana Cely, Ada, Brenda, Carmen, César, Claudia<sup>3</sup>, Erica, Floralba, Mayra<sup>2</sup> y Virginia, por el apoyo y afecto que va mucho más allá de lo que exigía la amistad. “El mejor método para superar obstáculos es el método del equipo”, para mis amigos y compañeros de promoción: Gracias equipo.

“Quien ha visto la Esperanza, no la olvida. La busca bajo todos los cielos y entre todos los hombres, y sueña que un día va a encontrarla de nuevo”.

Octavio Paz, El laberinto de la soledad.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de CCQQ y Farmacia.

“Los hombres sin ideales son cuantitativos; pueden apreciar el más y el menos, pero nunca distinguen lo mejor de lo peor”. José Ingenieros, en El hombre mediocre. Gracias por los ideales y las herramientas para hacerlos realidad.

A el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT); Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología; Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB), Proyecto “Caracterización de Extractos de Tres Plantas Nativas Mesoamericanas con Actividad Biocida”; Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR); Herbario BIGU; Jardín Botánico, Centro de Estudios Conservacionistas (CECON); Proyecto Flora Regional OEA: “Proyecto de aprovechamiento de la flora regional como fuente de fármacos anticáncer, antiparasitarios y antifúngicos”; Laboratorio Farmaya, S.A.; Departamento de Entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

Por su generosa ayuda en la realización de esta investigación.

A mi asesora Lic. Sully Cruz.

Por su valioso asesoramiento y amistad.

A mi co asesor Lic. Armando Cáceres.

Por su apoyo y generosas enseñanzas tanto a nivel personal como profesional.

A mi revisora Dra. Amarillis Saravia

Por su asesoramiento y colaboración.

## **MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA**

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayén	Vocal IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	Vocal V

# 1. RESUMEN

Los productos naturales como agentes terapéuticos representan el 50 por ciento de las drogas de uso clínico en países desarrollados, en Guatemala especialmente en el área rural representan casi la única alternativa terapéutica. El presente estudio fue realizado con el objeto de contribuir al estudio fitoquímico y biológico de las plantas medicinales de uso popular en Guatemala a través de la evaluación de la actividad biocida en el extracto etanólico de las hojas de *Cornutia pyramidata* L. y sus particiones obtenidas por polaridad creciente.

*C. pyramidata* es una Verbenaceae popularmente conocida en Guatemala como Jorobté, Loto'o che, Hoja de Zope, a esta especie popularmente se le atribuyen propiedades antirrábicas y en menor medida anticancerígenos, es usada comúnmente en el tratamiento contra gastritis, fiebre, asma, crisis nerviosas y dolores corporales<sup>4, 7, 22</sup>.

La planta fue recolectada en un lugar silvestre (inmediaciones del Puente Montecristo en San Miguel Panam, Suchitepéquez, 400 msnm) y se procedió a obtener el extracto etanólico mediante percolación y posterior concentración del mensturo en rotavapor a temperatura controlada y presión reducida. La obtención de las particiones del extracto etanólico de *C. pyramidata* se consiguió por medio de partición líquido-líquido, lográndose las particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa.

Empleando un método de difusión en agar se evaluó la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones, los resultados demostraron actividad positiva en el extracto etanólico de *C. pyramidata* contra *Mycobacterium smegmatis* y *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0.5 mg/mL, la partición acetato de etilo presentó bioactividad contra *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *M. smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* a una concentración de 0.5 mg/mL, en tanto que las particiones clorofórmica y acuosa indicaron actividad positiva contra *S. aureus* a una concentración de 1 mg/mL.

En la determinación de la actividad contra hongos filamentosos se evidenció que todas las particiones de las especies en estudio presentaron actividad a una concentración de 1 mg/mL contra *Aspergillus flavus*. Tanto el extracto etanólico, como las particiones fueron inactivos contra larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*; mientras que el extracto etanólico, partición clorofórmica y acuosa fueron citotóxicos contra nauplios de *Artemia salina*, siendo la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 0.91 mg/mL para los dos primeros y 0.79 mg/mL para la partición acuosa.

Estudios complementarios demostraron actividad del extracto etanólico de las hojas de *C. pyramidata* contra *Cryptococcus neoformans* a dosis de 0.25 mg/mL y contra *Epidermophyton floccosum* a 0.50 mg/mL. El tamizaje de la actividad contra *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum* demostró actividad a dosis de 100 µg. El extracto etanólico no demostró actividad contra líneas celulares de cáncer (H-460, MCF-7, SF-268).

A través de ensayos macro y semimicro y cromatografía en capa fina se realizó la caracterización fitoquímica. Se determinó que las particiones de la especie vegetal que demostraron bioactividad positiva presentaron metabolitos secundarios tales como: Alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides y principios amargos.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace varios miles de años<sup>24</sup>. Recientemente la utilización de la medicina tradicional ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una alternativa económicamente viable para poblaciones de países en desarrollo<sup>2</sup>. Es necesario el estudio científico del potencial terapéutico de los extractos vegetales utilizados en la medicina popular y más importante aún valorar su inocuidad<sup>25</sup>.

En los últimos veinte años ha habido un resurgimiento de la investigación de productos naturales para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas de interés farmacéutico. El reino vegetal representa un enorme potencial de moléculas para ser descubiertas, ya que se estima que más del noventa por ciento de las especies vegetales no han sido aún exhaustivamente estudiadas. Siendo este el caso de *C. pyramidata* (Jorobté), planta silvestre que crece normalmente en bosques densos o zonas húmedas, a dicha especie comúnmente se le atribuyen propiedades antirrábicas y en menor medida anticancerígenos, siendo también empleada en el tratamiento contra gastritis, fiebre, asma, crisis nerviosas y dolores corporales<sup>4, 7, 22</sup>.

Con frecuencia la investigación de los productos naturales se orienta a la búsqueda de una sola actividad biológica específica lo que no permite identificar otras posibles actividades de importancia<sup>54</sup>. Es necesario someter a los extractos de plantas medicinales a ensayos donde sea posible identificar el verdadero potencial biológico de los mismos<sup>5</sup>. Este análisis permite detectar actividades biológicas que pueden ser muy diversas, dar información toxicológica inicial, orientar sobre otras pruebas biológicas que deben de efectuarse con el material de estudio y guía el fraccionamiento químico del extracto según la actividad biológica de las fracciones<sup>61</sup>.

Tomando en cuenta lo antes expuesto y considerando que no existen hasta el momento estudios fitoquímicos ni farmacológicos sobre esta especie medicinal, resulta interesante su investigación en la búsqueda de sus constituyentes para seleccionar los extractos más activos.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Descripción de la especie seleccionada:

##### 3.1.1. Nombre científico:

*Cornutia pyramidata* L. <sup>66-69</sup>

##### 3.1.2. Sinónimos:

*Hosta pyramidata* A.; *H. latifolia* HBK; *Cornutia latifolia* Moldenke in Fedde; *C. grandifolia* Schauer; *C. grandifolia* var. *intermedia* Moldenke; *C. grandifolia* var. *normalis* (Kuntze) Moldenke; *C. grandifolia* var. *quadrangularis* Moldenke; *C. grandifolia* var. *strokii* Moldenke; *C. latifolia* (Kunth) Moldenke; *C. lilacina* Moldenke; *C. lilacina* var. *velutina* Moldenke; *C. pyramidata* L. var. *isthmica* Moldenke; *C. latifolia* f. *alba* Moldenke <sup>66-69</sup>.

##### 3.1.3. Nombres comunes:

Loto'o che, Palo cuadrado, Azulejo, Penda azul, Flor lila, Hoja de zope, Lat-che, Xolte' xnuk, Joro'kté, Jorobté (Guatemala); Tzultesnuk, Matasano (Honduras); Cucaracha (Nicaragua); Palo de vidrio, Bwa kasav (República Dominicana) <sup>22, 28, 37, 45, 48, 49, 55, 66-69, 72</sup>.

##### 3.1.4. Clasificación taxonómica de la especie <sup>28, 34, 37</sup>:

3.1.4.1. **Reino:** Plantae

3.1.4.2. **Subreino:** Tracheobionta

3.1.4.3. **División:** Magnoliophyta.

3.1.4.4. **Clase:** Magnoliopsida (Dicotiledónea).

3.1.4.5. **Subclase VI:** Asteridae.

3.1.4.6. **Orden III:** Lamiales.

3.1.4.7. **Familia:** Verbenaceae.

3.1.4.8. **Género:** *Cornutia*.

3.1.4.9. **Especie:** *Cornutia pyramidata* L.

##### 3.1.5. Descripción botánica <sup>66-69</sup>:

Árboles pequeños o arbustos altos aromáticos, 2-12 m de alto, el tronco mide en algunas ocasiones 15 cm. de diámetro, ramas y ramitos erguidos, cuadrangulares y cuando jóvenes densamente pubescentes (pelos cortos).

Hojas opuestas, simples generalmente ovadas o ampliamente elípticas, 8-28 cm. de largo (incluyendo el pecíolo) y 4.5-15 cm. de ancho, ápice agudo o acuminado, base largamente decurrente sobre el pecíolo, margen entero o repando a levemente dentado, verde grisáceo en el haz, vellosidades punteado-glandulares blanquecinas en el envés.

Inflorescencia panículas piramidales de 11-25 (-40) cm. de largo y 4-12 (-16) cm. de ancho, mayormente terminal, los pedicelos y pedúnculos tetragonales de las cimas son densamente pubescentes, brácteas inconspicuas.

Flores heteróstilas; cáliz cupuliforme (pateliforme en el fruto) en la antesis, 1.5-3 mm de largo, ápice entero, truncado o tetradentado con los dientes poco profundos, densamente pubescente; corola hipocrateriforme, curvada o recta, azul o morada (a veces reportada con un punto amarillo en los lobos), tubo 7-11 mm de largo y 2-4 mm de largo, más corto que el lado abaxial del tubo; labio inferior con un solo lobo grande de 3-7 mm de largo; el ovario es pubescente, 2 estambres fértiles, exertos y de 4-6 mm de largo en las formas de estilo corto, en la boca de la corola y de 2-3 mm de largo en las formas de estilo largo, el estilo es corto-pubescente 2 estaminodios, incluidos; estilo de 5-8 mm de largo en las formas de estilo corto e incluido y de 10-13 mm de largo en las formas de estilo corto y exerto, estigma pequeño, desigualmente bilobado. En la *C. pyramidata* el tubo de la corola es más recto, estrecho y menos dilatado que en la *C. grandifolia*, y el labio inferior de la corola normalmente no mide más de la mitad de lo que mide el tubo. Tiene solamente dos estambres fértiles.

Fruto drupáceo subgloboso, 0.4-0.7 mm de diámetro, pubescentes o puberulentos, con exocarpo carnoso y endocarpo duro, azul, morado o negro, pireno con cuatro semillas.

### **3.2. Hábitat y distribución geográfica:**

Esta planta crece entre matorrales en zonas húmedas o en bosques densos de segundo crecimiento a una altitud entre los 100 y 1300 - 1500 m sobre el nivel del mar, ha sido reportada en Alta Verapaz (Cahabón), Chimaltenango, Chiquimula, El

Progreso, Escuintla, Guatemala, Izabal, Petén, Quetzaltenango Sácatepequez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez, Zacapa; así como también en México, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá e Indias Occidentales<sup>22, 28, 37, 45, 48, 49, 55, 66-69, 72</sup>.

### **3.3. Usos etnomédicos:**

Comúnmente se le atribuyen propiedades antirrábicas y en menor medida anticancerígenos, también es usada en el tratamiento contra gastritis, fiebre, asma y dolores corporales<sup>4,7,22</sup>. La decocción de la raíz se emplea en crisis de nervios<sup>70</sup>.

### **3.4. Composición química y actividad biológica:**

Según la revisión bibliográfica realizada no se encontró información que indique los componentes de *C. pyramidata* y la actividad biológica de los extractos de esta planta<sup>7, 68-70</sup>, aunque estudios preliminares realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia han demostrado que ésta especie posee actividad biocida (Cáceres, A. datos no publicados). Trabajos de tesis realizados en el Escuela de Química Biológica evaluaron la actividad del extracto etanólico de *C. pyramidata* contra *Sporothrix schenckii*<sup>27</sup> y la actividad moduladora *in vitro* sobre la vía clásica y la vía alterna del sistema de complemento<sup>14</sup>, resultando en ambos casos inactivo.

Cornutinas A-L, diterpenoides del tipo neoclerodano fueron identificados en *C. grandifolia* var. *intermedia*<sup>16, 35</sup> (ver 3.1.5).

### **3.5. Farmacología experimental:**

No se han realizado estudios previos para determinar la actividad farmacológica de *C. pyramidata*<sup>7</sup>.

### **3.6. Estudios realizados:**

En 1999 se publicó un artículo sobre la medicina etnobotánica de los mayas yucatecos en el cual se menciona que la decocción de las hojas de *C. pyramidata* es utilizada en el tratamiento de asma y fiebre<sup>4</sup>. De acuerdo a la revisión realizada en Octubre del 2002 en la base de datos NAPRALERT sobre la actividad biológica, farmacológica y fitoquímica no se encontraron estudios previos sobre dicha especie<sup>7</sup>.

### **3.7. Extracción y Caracterización Química:**

Cuando se realizan investigaciones para buscar o confirmar una actividad biológica es importante la determinación de los constituyentes químicos de la planta.

El escrutinio fármaco químico constituye el marco de referencia convencional para el estudio de los principios activos de plantas medicinales. Este enfoque se enmarca en la extracción y fraccionamiento bioguiado el cual consiste en la preparación de extractos crudos, fracciones obtenidas a partir de dichos extractos y la evaluación de su bioactividad.

**3.7.1. Extracción:** Para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar.

La extracción para tamizaje consiste en realizar una extracción con disolventes con diferentes polaridades, generalmente diclorometano o hexano, éter o etanol y agua<sup>12</sup>. Debido a la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rotavapor) hasta alcanzar un estado de miel. En el caso de los extractos acuosos se suele concentrar por medio de liofilización. En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar.

**3.7.1.1. Esquema extractivo:** Puede definirse como una liberación extractiva fraccionada mediante un gradiente de polaridad ascendente. En el proceso de escogencia de un disolvente determinado es necesario considerar aspectos relacionados con la selectividad, facilidad de manipulación, precio, seguridad y riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental. Mediante el uso de este diseño se pretende aprovechar la selectividad y especificidad de los disolventes extractores utilizados.

**3.7.2. Tamizaje fitoquímico:** Permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de las extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés, éste se fundamenta en la reacción selectiva de grupos funcionales específicos con reactivos capaces de formar complejos visualizables por el desarrollo de coloraciones características o por la formación de precipitados. Para el análisis fitoquímico preliminar se usan técnicas macro o micrométricas en tubo o capa fina y para el análisis fitoquímico definitivo y elucidación estructural se recurre a técnicas de cromatografía en papel, capa fina

(CCF, TLC por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography) o columna, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases, espectroscopia infrarroja, análisis de espectroscopia de masas, técnicas de refracción y cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (MNR), etc., pero en todos los casos se recomienda un fraccionamiento bioquímico <sup>12, 60, 61, 65</sup>.

La cromatografía en capa fina es un método simple y eficiente. Este método sirve para identificar las drogas vegetales, sus extractos y tinturas. La respuesta reactiva de estándares conocidos de grupos funcionales particulares se utiliza frecuentemente como medio de comparación.

**3.7.3. Fraccionamiento de extractos:** Todos los procesos de separación involucran la división de la mezcla en un número discreto de fracciones. Se refiere a la separación de metabolitos de mezclas de naturaleza química compleja, para obtener fracciones de compuestos afines, con características y propiedades similares. La mayor parte de los métodos de fraccionamiento aprovechan la naturaleza química de los compuestos que se van a separar, específicamente las diferencias en polaridad y acidez-alcalinidad. El fraccionamiento de extractos crudos vegetales implica la utilización de métodos altamente especializados, esto se hace con el propósito de optimizar recursos y técnicas y aumentar la eficiencia de las metodologías. El tipo de fraccionamiento depende de la muestra individual y del objetivo de la separación <sup>13</sup>. Por lo regular, primero se divide en fracciones y posteriormente se procede al análisis de las éstas para determinar que fracción contiene el compuesto deseado, para luego determinar su bioactividad.

**3.7.3.1. Partición líquido-líquido:** Este método se fundamenta en las diferencias de los coeficientes de reparto de los metabolitos extraídos entre dos líquidos inmiscibles (uno polar y otro apolar). Esta técnica constituye un método de fraccionamiento grueso, que permite obtener extractos selectivamente caracterizables y con una mayor especificidad en lo que a grupos funcionales se refiere.

### **3.8. Evaluación de la actividad biocida:**

La actividad biocida se refiere a la capacidad de una sustancia para causar la muerte en determinados organismos, es detectada por medio de una serie de ensayos biológicos *in vitro*.

Esta serie de ensayos biológicos (bioensayos), es decir, fase de pretamizaje es útil para dar una idea preliminar de las potencialidades de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro de especies vegetales. Las técnicas utilizadas en la fase de pretamizaje pueden tener distintos grados de dificultad en la medida en que se identifican con mayor claridad las potencialidades de las especies en estudio, son relativamente sencillas siempre que no involucren animales; además son baratas, rápidas, reproducibles y permiten evaluar un número grande de muestras.

Estos bioensayos han sido empleadas exitosamente en un sinnúmero de estudios realizados alrededor del mundo<sup>3, 15, 18, 19, 41, 43, 44, 46, 47, 75</sup> y sin ir más lejos en Guatemala, propiamente en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia para evaluar la actividad biocida de distintas plantas de uso popular en el país<sup>31</sup>.

La actividad biocida abarca un amplio espectro de organismos, pero con fines prácticos nos remitiremos a la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica), larvicida y citotóxica en las especies vegetales.

### **3.8.1. Ensayo para evaluar la actividad citotóxica contra *Artemia salina***

**(camarón salino):** Por lo general el término citotóxico es empleado para describir la actividad tóxica de un compuesto aislado en células tumorales *in vitro*.

*A. salina* (también llamado camarón amarillo) es un pequeño crustáceo que vive en aguas hipersalinas y salobres, actúa como un indicador natural de la presencia de toxicidad en estas fuentes. Las larvas (nauplios) de este crustáceo son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas por lo que son útiles para medir la potencial citotoxicidad de una sustancia y se utiliza para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y sensible, aunque es una prueba útil no es selectiva para ninguna molécula química. Este organismo también es empleado como indicador en estudios ambientales, tamizaje de toxinas *ambientales* y en el tamizaje de toxinas naturales.

El primer reporte de su uso como organismo de prueba aparece en 1956, el procedimiento fue descrito por Michael *et al.*, y posteriormente fue adaptado por Meyer *et al.*, como un útil bioensayo en la investigación

de productos naturales <sup>18, 43, 44</sup>. En 1993, Solís y un grupo de investigadores propusieron un nuevo ensayo en microplacas para evaluar citotoxicidad contra *A. salina*, el cual mostró resultados comparables al método de tubo de ensayo publicado previamente, este ensayo requiere pequeñas cantidades del extracto y facilita el ensayo de gran número de muestras y diluciones <sup>17, 64</sup>.

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* es utilizado comúnmente para determinar la actividad antitumoral de las fracciones de extractos, a pesar de no representar un medio eficaz para la predicción de la actividad antitumoral *in vivo*. Además es útil como prueba de pretamizaje en la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, antimicrobianas y/o plaguicidas debido a la pequeña cantidad de muestra requerida para su realización, rapidez, bajo costo, simplicidad, y facilidad para evaluar gran número de plantas, así también por la sensibilidad demostrada por *A. salina* ante pequeñas cantidades de extractos vegetales. El método tiene importante correlación con la actividad anti *T. cruzi*, aunque su correlación con otras actividades no ha sido bien estudiada.

Este bioensayo es aplicable para detectar fitotoxicidad en plantas que contienen cumarinas, ya que detecta la presencia de compuestos bioactivos en extractos, guía el fraccionamiento químico y se inicia con la caracterización biológica de un compuesto aislado <sup>71, 75</sup>. La realización del bioensayo a lo largo del fraccionamiento asegura que todo el esfuerzo se orienta hacia los compuestos activos, que frecuentemente están presentes en concentraciones de menos de un miligramo por kilogramo de planta seca.

El ensayo se realiza sobre larvas del crustáceo, de no más de 24 horas de "nacimiento" y toma aproximadamente 24 horas más la evaluación de los resultados. Los ensayos se realizan sobre agua de mar natural o artificial en presencia de la luz, a una temperatura máxima de 30°C. En número de 10 a 15 nauplios se depositan en los pocillos de una placa a la cual se le agrega el extracto a evaluar. Los extractos son evaluados a distintas concentraciones, 10, 100 y 1000 ppm, con el fin de encontrar la dosis letal media, que es la concentración en la que el 50% de las larvas mueren por efecto del extracto. Si el porcentaje de muertos es mayor del 50 por ciento se procede a calcular la DL<sub>50</sub>, que representa

la dosis a la cual se presentará el 50 por ciento de nauplios muertos con un límite de confianza del 95 por ciento. Este valor puede calcularse ya sea por la fórmula:  $DL_{50} = (0.79 h R/n)$  o bien por medio de un gráfico se traza según el número acumulado de sobrevivientes con el número de muertos en el mismo eje (número de animales versus dosis logarítmica). Algunos factores que afectan la reproducibilidad de la prueba son la edad de la larva, la temperatura, la composición salina del medio <sup>75</sup>.

Esta prueba ha demostrado tener buena correlación ( $p = 0.036$ ) con la citotoxicidad, así como la prueba de inhibición de la tumefacción de la papa. Esta última prueba y la citotoxicidad contra *A. salina* son reportadas como las más adecuadas par el pretamizaje de sustancias antitumorales <sup>3</sup>.

**3.8.2. Tamizaje antimicrobiano:** La actividad antimicrobiana es empleada para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Es indispensable en la evaluación de la actividad antimicrobiana conocer y controlar las condiciones de laboratorio del modelo microbiano, tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro* <sup>64</sup>.

Factores como la composición y el pH del medio, el método de extracción, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo y los microorganismos utilizados en la prueba pueden hacer variar los resultados, por lo que es difícil establecer un método estandarizado para el estudio de la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales <sup>56</sup>.

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en dos fases: tamizaje y concentración mínima inhibitoria. Este último procedimiento se realiza únicamente con los microorganismos cuyo procedimiento fue inhibido por el extracto en la primera fase. Se evalúa si hubo crecimiento, una completa supresión del crecimiento es requerida para declarar que el extracto es activo. Los extractos que son activos deben ser probados nuevamente para confirmar los resultados, para evitar confusiones en la interpretación de resultados provocadas por probable contaminación durante la preparación del medio de cultivo

deben colocarse dos cajas de control positivo por lote de pruebas <sup>46</sup>. Adicionalmente, para los casos en los que hubo crecimiento es posible evaluar de nuevo la actividad a distintas concentraciones.

Generalmente la medición de la actividad antimicrobiana se realiza por medio del método de difusión o el método de dilución. La selección del método depende de las necesidades del investigador, las cuales han hecho que los métodos sufran modificaciones con el fin de optimizar las técnicas empleadas y por consiguiente obtener resultados confiables.

**3.8.2.1. Método de dilución en agar:** Se basa en el crecimiento exponencial de bacterias susceptibles inoculadas en superficie o profundidad en los medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y esta basado en el método descrito por Mitscher *et al*, <sup>46-47</sup>. En este método una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua.

El método de dilución se emplea para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, es decir, la CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible, esta prueba puede ser en caldo (tubo) y en agar (placa) <sup>12</sup>. Se ha utilizado principalmente para determinar los valores de CIM de un extracto, aceite esencial o sustancia pura, así como para el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana <sup>56</sup>, además permite evaluar la CIM usando diluciones decrecientes del extracto.

El método de dilución es el único método para determinar el mínimo de concentración bactericida (CMB). El CMB es determinado por subcultivos de los tubos con inhibición en un plato de agar o en medio líquido, cuando el microorganismo no crece, la muestra es un microbicida <sup>52</sup>. La dilución en medio líquido es la técnica más complicada pero, también la más precisa. Se interpreta como resultado positivo, la ausencia del crecimiento de microorganismo.

El método de dilución sólido, es parecido al método de dilución en líquido. Este método es rápido y la CIM de un producto puede ser determinada contra seis microorganismos a la vez <sup>46</sup>. Este método permite la inoculación de aproximadamente 20-25 microorganismos en platos estandarizados <sup>56</sup>. El método de Mitscher L. *et al.*, <sup>47</sup> establece la cantidad de muestra necesaria, la cual no debe ser mayor de 1 mg de muestra en 1 mL del medio de cultivo. Las muestras activas son reensayadas a una concentración de 0.1 mg/mL.

Las ventajas de este método son su simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad de estandarizar y procesar gran cantidad de muestras, además ofrece la posibilidad de usarlo en el estudio de antimicrobianos solubles en agua o muestras insolubles como aceites esenciales, además pueden ser sembrados hasta seis microorganismos en una caja de Petri <sup>56</sup>.

**3.8.2.2. Método de difusión:** Este procedimiento se basa en el descrito por Bauer -Kirby y es usado para evaluar la actividad antibacteriana vegetal <sup>12</sup>. Se utiliza un disco, agujero o cilindro como reservorio en el agar, el cual contiene la muestra a ensayar, luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición).

El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedios o susceptibles para cada agente antimicrobiano. Este método es frecuentemente utilizado en investigación, pero tiene la desventaja de ser poco creíble en casos en los cuales la muestra se difunde con dificultad en el medio debido a la inexistente relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana lo cual fue demostrado por Pellecuer *et al* <sup>52,56</sup>.

Este método no requiere dispersión homogénea en agua del extracto a evaluar, la cantidad de muestra utilizada en el tamizaje es pequeña y permite probar cinco a seis compuestos

contra varios organismos, además es el más conveniente para el tamizaje preliminar de sustancias puras (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.). Los resultados se evalúan de la siguiente manera:

- Crecimiento a lo largo de la estría: actividad negativa.
- No hay crecimiento a lo largo de la estría: actividad positiva, indica inhibición.
- Luego se compara con los métodos de dilución <sup>56</sup>.

**3.8.2.3. Microorganismos:** Los microorganismos a emplearse para la detección de la actividad antimicrobiana deben ser en la medida de lo posible estándar, pertenecientes a colecciones confiables o bien ser cepas comerciales internacionalmente reconocidas que para estos fines son proveídas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC). En Guatemala se han usado también cepas provenientes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (FCCQQF), del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) o del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta.

**3.8.3. Actividad antifúngica:** Los procedimientos son similares a los antibacterianos. Las pruebas se complican por ciertas características de los hongos, como dimorfismo y requerimiento de crecimiento por tiempo prolongado. El crecimiento de hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar.

Hay tres métodos para pruebas de susceptibilidad con antifúngicos, dilución en caldo y difusión en agar, todos se basan en los mismos principios de los utilizados para agentes antibacterianos. Para detectar la actividad antilevadura se usa una modificación del método de dilución para antibióticos, que determina la susceptibilidad de los cultivos frente a discos de papel secante impregnados con preparaciones vegetales. Para investigar la fitoquímica de los compuestos activos puede usarse una técnica bioautográfica que combina TLC y difusión en agar <sup>12</sup>.

**3.8.4. Actividad insecticida:** Consiste en evaluar la actividad de los extractos vegetales para matar larvas de insectos de importancia médica en un medio micrométrico líquido, en este caso larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

Se ha encontrado que la efectividad de las plantas para matar a las larvas depende de las dosis aplicadas, la parte de la planta utilizada así como la especie de mosquito que se utiliza. Existen aproximadamente 3200 especies de mosquitos, siendo *Anopheles* y *Aedes*, vectores de dos de las más importantes enfermedades en el mundo, paludismo y dengue, respectivamente, por lo que en el pasado han sido probados compuestos naturales puros con actividad larvicida, como una alternativa contra dichas enfermedades <sup>6</sup>.

Las larvas pertenecientes a *Anopheles* y *Aedes*, al igual que las demás especies de mosquitos pasan por cuatro fases de mudas denominadas estadio, las formas que adquieren cada una de estas fases se llaman "instars" o estadios y son morfológicamente similares excepto por el incremento secuencial del tamaño.

El objeto de este ensayo es determinar la actividad contra larvas, es un método simple y rápido. El método a utilizar es una adaptación del usado por Agrochemical Division of CIBA-GEIGY A.G. y el laboratorio del Profesor Hostettmann en Suiza, para probar extractos crudos, fracciones y compuestos puros <sup>38</sup>.

El método en tubo consiste en colocar los huevos de *A. aegypti* en un disco de papel filtro, para cada serie de prueba de una pequeña pieza de papel filtro que contiene los huevos es cortada e incubada por 24 horas con agua del grifo. Esta agua debe haber reposado 72 horas antes de eliminar el cloro.

Las larvas empiezan a ser visibles después de unas pocas horas y después de 24 horas (esta representa el II estadio) que es la forma como son utilizadas para las pruebas <sup>20</sup>. Los extractos lipofílicos son disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y los extractos polares o acuosos son solubilizados en agua destilada, posteriormente son llevados a una concentración del 1 por ciento con agua del grifo. Se colocan 10-15 larvas en el pozo que contiene la solución de prueba, la microplaca es colocada en un lugar oscuro.

En el tamizaje preliminar las muestras son probadas a una concentración de 500 ppm y solamente las que presenten un 100 por ciento de mortalidad son ensayadas a otras diluciones. La concentración letal 100 por ciento (mínimo de concentración en el que todas las larvas están muertas, CL<sub>100</sub>) se determina luego de 30 minutos y después de 24 horas. La estimación es hecha exponiendo la microplaca contra una fuente de luz, las larvas vivas pueden ser vistas moviéndose, mientras que las muertas caen al fondo o están suspendidas en la interfase aire-agua,

## **4. JUSTIFICACIÓN**

Los productos naturales, principalmente de origen vegetal, han sido la principal fuente de agentes terapéuticos de la humanidad durante siglos, constituyendo su uso una costumbre profundamente arraigada en las raíces culturales de los pueblos. Este tipo de productos representa el cincuenta por ciento de las drogas de uso clínico en países desarrollados, en Guatemala especialmente en el área rural representan casi la única alternativa terapéutica.

Actualmente el estudio de las plantas medicinales ha ganado importancia, la actividad biocida de los extractos de plantas y productos naturales ha expuesto el potencial de las plantas como una fuente de agentes

terapéuticos. Los países en vías de desarrollo enfocan sus programas de investigación principalmente en la obtención de medicamentos a partir de los diferentes compuestos extraídos de plantas medicinales autóctonas que no han sido estudiadas. Siendo este el caso de la *C. pyramidata* (Jorobté) que es comúnmente usada en la medicina tradicional, además estudios preliminares realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia han demostrado que ésta especie posee actividad biocida (Cáceres, A. datos no publicados).

Tomando en cuenta lo anterior y el hecho de que la medicina natural tradicional es ampliamente utilizada por la población guatemalteca, sin tener estudios científicos previos que avalen su uso, se hace necesario realizar estudios sobre ellas con el objeto de contribuir a la investigación científica para comprobar las propiedades que se les atribuye y aún más importante valorar su inocuidad en beneficio de la población con menos acceso a los recursos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. General:**

**5.1.1.** Contribuir al estudio fitoquímico y biológico de las plantas medicinales de uso popular en Guatemala.

### **5.2. Específicos:**

**5.2.1.** Obtener particiones con disolventes de diferente polaridad a partir del extracto etanólico de hojas de *C. pyramidata*.

**5.2.2.** Evaluar la actividad biocida de las particiones de diferente polaridad de *C. pyramidata*.

**5.2.3.** Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la partición responsable de la actividad biocida de *C. pyramidata* a través del tamizaje fitoquímico.

## **6. HIPÓTESIS**

Al menos una de las particiones del extracto etanólico de hojas de *C. pyramidata* posee actividad biocida y un patrón fitoquímico característico.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Universo:

#### 7.1.1. Población:

Extracto etanólico de *C. pyramidata* L. (hoja).

#### 7.1.2. Muestra:

Particiones obtenidas por partición con disolventes de diferente polaridad del extracto etanólico de *C. pyramidata*.

### 7.2. Recursos:

#### 7.2.1. Humanos:

- ✦ Investigadora: Bachiller Ruth Yarseny Molina Gonón.
- ✦ Asesora: Licenciada Sully Cruz.
- ✦ Co Asesor: Licenciado Armando Cáceres.

#### 7.2.2. Materiales:

**7.2.2.1. Institucionales:** Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Departamento de Farmacología, Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB), Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR), Herbario BIGU,

Biblioteca y Jardín Botánico, Centro de Estudios Conservacionistas, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Biblioteca Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala; Biblioteca Universidad del Valle, Laboratorio FARMAYA S.A.; Departamento de Entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Proyecto IIQB: “Caracterización de Extractos de Tres Plantas Nativas Mesoamericanas con Actividad Biocida”, Proyecto OEA/AICD: “Desarrollo de cultivo de plantas medicinales y producción de fitoterapéuticos”, Proyecto Flora Regional OEA: “Proyecto de aprovechamiento de la flora regional como fuente de fármacos anticáncer, antiparasitarios y antifúngicos”.

#### **7.2.2.2. Organismos de Experimentación:**

Larvas de de *A. aegypti* y *A. albimanus*

Nauplios de *A. salina*

<i>Aspergillus flavus</i>	CCQQ	A75
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	6051
<i>Candida albicans</i>	ATCC	10231
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CCQQ	C 13
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC	607
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	27853
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC	14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	25923

#### **7.2.2.3. Materiales y equipos :**

Percolador de vidrio.

Rotavapor.

Balanza semianalítica y balanza analítica.

Bomba de vacío.

Desecadora.

Campana de extracción de gases.

Refrigeradora.

Liofilizador.

Ampollas de decantación.

Cámaras de revelado.

Asperjador.  
Lámpara de luz UV/VIS.  
Cromatofolios de Silicagel 60F<sub>254</sub>.  
Incubadoras.  
Autoclave.  
Campana de flujo laminar.  
Vórtex.  
Cajas de Petri descartables simples y cuadrilate.  
Cristalería y material de laboratorio en general.  
Asa de nicromo.  
Campanillas de Durham de 5 mm de diámetro.  
Viales de 3 mL.  
Puntas amarillas y azules (Tips).  
Estufa eléctrica.  
Fuente de luz artificial.  
Pecera pequeña con doble división sin llegar al fondo (área cerrada y área abierta).  
Cámara de Neubauer.  
Microplacas.  
Estereoscopio.

#### **7.2.2.4. Reactivos:**

Sal marina (biocristales de sal marina).  
Agua destilada.  
Disolventes: Hexano, Cloroformo, Acetato de etilo, Etanol al 95 por ciento, Metanol.  
Reactivos para tamizaje fitoquímico.

#### **7.2.2.5. Medios de cultivo**

Agar Mueller Hinton.  
Caldo Trypticase Soya.  
Agar Sabouraud.

### **7.3. Procedimiento:**

#### **7.3.1. Selección de la planta.**

### **7.3.2. Revisión bibliográfica.**

**7.3.3. Obtención del material vegetal:** La planta fue observada en el Jardín Botánico, Centro de Estudios Conservacionistas, Ciudad de Guatemala y recolectada en su lugar de crecimiento silvestre (en las inmediaciones del Puente Montecristo en San Miguel Panam, Suchitepéquez, 400 msnm), fue identificada por el Ingeniero Agrónomo Mario Véliz del Herbario BIGU de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala quedando un ejemplar depositado en el mismo (BIGU 26826).

### **7.3.4. Secado y Molienda de la planta:**

La planta se lavó, escurrió y secó a la sombra. La molienda de la planta seca se realizó utilizando un tamiz No. 5 para disminuir el tamaño de partícula. Se pesaron 106.4 g de la planta molida y rotularon con nombre, fecha y parte.

### **7.3.5. Obtención del extracto etanólico por percolación con alcohol 95°<sup>20</sup> :**

#### **7.3.5.1. Llenado del percolador:**

- Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón adecuado, 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 por ciento.
- Verificar que no queden burbujas y si las hay, hace presión con una espátula para desaparecerlas.
- Agregar el resto de material vegetal seco y cubrir nuevamente con etanol al 95 por ciento, 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.
- Pasar el disolvente recogido al balón del rotavapor para concentrar.

#### **7.3.5.2. Concentración en rotavapor**

- Encender el baño María y llevar la temperatura a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- 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 rotavapor 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 tarados y rotulados.
- Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a  $4^\circ\text{C}$ .
- Calcular el rendimiento del extracto y guardar a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **7.3.6. Obtención del extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, acuoso a partir de partición líquido-líquido:**

- Disolver 15 g de extracto etanólico con actividad biocida de *C. pyramidata*. en etanol al 70 por ciento, realizar una partición líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad (hexano, cloroformo, acetato de etilo, agua).
- Eliminar los disolventes por destilación a presión reducida con el fin de concentrar el extracto (ver concentración en rotavapor). El extracto acuoso será sometido a liofilización.

#### **7.3.7. Actividad antimicrobiana *in vitro* <sup>20</sup>:**

##### **7.3.7.1. Preparación del Agar-Planta:**

- Preparar tubos con 9.0 mL Mueller Hinton.
- Esterilizar, dejar enfriar a  $50^\circ\text{C}$  y agregar 1 mL de la solución del extracto disuelto, el cual 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.

#### **7.3.7.2. 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 Tripticasa 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). Utilizar *M. smegmatis* y *C. neoformans* sin dilución.
- Sembrar en cajas de Petri según la planta a utilizar.

#### **7.3.7.3. Demostración de la actividad antibacteriana:**

- Inocular en las cajas con Agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos (ver inciso 6.2.2.) 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 %.

#### **7.3.7.4. 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.

#### **7.3.7.5. Determinación de la CIM:**

- Preparar cajas cuadriplate con las siguientes diluciones del extracto:
  1. mL de Agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg / mL.
  2. mL de Agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg / mL.
  3. mL de Agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg / mL.
  4. 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 e interpretar según el procedimiento descrito en el inciso 6.3.7.4.

### **7.3.8. Tamizaje antimicótico *in vitro* <sup>20</sup>:**

#### **7.3.8.1. Preparación de medio de cultivo para hongos filamentosos (ver inciso 6.2.2.):**

- Preparar tubos con 13.5 mL de Agar Sabouraud.
- Esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 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.

#### **7.3.8.2. 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 usar.

#### **7.3.8.3. Preparación de inóculo de hongos filamentosos:**

- Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para extracción de esporas) con los siguientes ingredientes:

Dextrosa	0.6 g
NaSO <sub>4</sub>	0.3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
Peptona	0.3 g
Agar - Agar	6.0 g

- Agregar a 300 mL de agua, disolver, verter 10 mL en tubos con tapón rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar a 25 °C por 48 horas para descartar contaminación.

- Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27 °C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).
- Agregar a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de un agitador de vidrio.
- Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar durante un minuto en vórtex y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- Llevar la suspensión a 100 esporas/  $\mu\text{L} = 1 \times 10^5$  esp. / mL (aproximadamente 10 esporas / cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

#### **7.3.8.4. Preparación del inóculo para hongos levaduriformes:**

- Sembrar la cepa en una caja con Agar Sabouraud e incubar a 36 °C por 48 horas.
- Tomar un inóculo del cultivo fresco, sembrar 5 mL de caldo Tripticasa Soya e incubar 24-48 horas. Tomar con una pipeta estéril 0.5 mL y suspender en 4.5 mL de solución salina estéril (dilución 1:10).

#### **7.3.8.5. Inoculación de hongos filamentosos en placa:**

- Utilizando campanillas de Durham de 5 mm de diámetro abrir cuatro agujeros en las cajas con Agar Planta en forma equidistante.
- Tomar 30  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27 °C por 14 días.
- Hacer cuatro repeticiones de la misma forma, usar una caja con Agar Sabouraud como control negativo.

#### **7.3.8.6. 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.

#### **7.3.8.7. Lectura e interpretación de resultados:**

#### **7.3.8.7.1. Hongos filamentosos:**

- Medir el diámetro de la colonia del hongo en milímetros.
- Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas de control.
- Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75 por ciento.

#### **7.3.8.7.2. Hongos levaduriformes:**

- Observar el crecimiento de la levadura en el medio:
- Crecimiento positivo = no actividad.
- Crecimiento negativo = inhibición o actividad antilevadura.
- Para evaluar la CIM, repetir la prueba con cantidades decrecientes del extracto vegetal (1:10, 1:50 y 1:100).

### **7.3.9. Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad citotóxica contra *A. salina*<sup>20</sup>:**

#### **7.3.9.1. Preparación del agua de mar:**

- Disolver 35 g 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.

#### **7.3.9.2. Cultivo de *A. salina*:**

- Colocar en un vaso de precipitar de 200 mL del agua de mar y airear 30 ó 60 minutos
- Colocar el agua en la pecera y agregar 40 mg 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).

### **7.3.9.3. Determinación de la citotoxicidad:**

- ♣ Pesar 0.004 g del extracto a ensayar y disolver con 2 mL de agua de mar. Agregar por triplicado en una microplaca: 100  $\mu$ L del extracto disuelto + 100  $\mu$ L de agua de mar con 10-15 nauplios.
- ♣ Control negativo: 100  $\mu$ L de agua de mar + 100  $\mu$ L de agua de mar con 10-15 nauplios.
- ♣ Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
- ♣ Contar en el estereóscopo o microscopio 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.

### **7.3.9.4. Interpretación:**

7.3.9.4.1. 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, multiplicarlos por 100.

7.3.9.4.2. Si el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50 por ciento, repetir la prueba utilizando de 1.0, 0.5 y 0.25 mg / mL. Obtener los valores de X e Y en cada dosis y determinar el valor de  $DL_{50}$  con el programa de computadora Finney (DOS).

7.3.9.4.3. Si el porcentaje es menor al 50 por ciento la citotoxicidad es mayor de 1 mg / mL.

### **7.3.10. Tamizaje de la actividad larvícida <sup>20</sup>:**

#### **7.3.10.1. Cultivo de larvas de *A. 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.

#### 7.3.10.2. Determinación de la toxicidad:

- Pesar 1 mg del extracto a ensayar y disolver con 1 mL de agua de chorro reposada. En la microplaca agregar por triplicado: 100  $\mu$ L del extracto disuelto + 100  $\mu$ L de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.
- Control negativo: 100  $\mu$ 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 estereóscopo o microscopio el número de larvas muertas y determinar la CL<sub>100</sub> (concentración letal al 100 %).

**7.3.10.3. 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<sub>100</sub>, para ello repetir la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg / mL.

#### 7.3.11. Tamizaje Fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro <sup>23, 42, 65, 71, 74.</sup>

La caracterización fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones *C. pyramidata* se realiza por medio de cromatografía en capa fina y ensayos macro y semimicro.

En la CCF las fracciones son cromatografiadas con las fases móviles adecuadas y caracterizadas por medio de valores R<sub>f</sub> y coloraciones obtenidas luego de asperjar con reveladores específicos, mientras que los ensayos macro y semimicro son utilizados para la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de la muestra por medio de la formación de precipitados y complejos coloreados.

##### 7.3.11.1. Investigación de alcaloides:

- i. **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 al 60°C. Filtrar con papel Whatman No. 1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante dividirla en cuatro 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.

ii. **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 60F<sub>254</sub>, 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.

↗ Identificación: Zonas de color naranja (visible).

#### 7.3.11.2. Investigación de flavonoides y antocianinas:

i. **Ensayos macro y semimicro:** Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL 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 3-5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

↗ Tubo 3: Agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño 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.

- ii. **Cromatografía en capa fina:** Extraer 1 g de material vegetal seco y pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño María a 60 °C. Filtrar la solución y aplicar en una placa de sílica gel 60F<sub>254</sub>. 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).
- ✓ Solución 1: Solución metanólica al 1 por ciento de difenilborilxietilamina (NP).
  - ✓ Solución 2: Solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).
- ↻ Identificación: Fluorescencia intensa en UV a 365 nm.

#### 7.3.11.3. Investigación de antraquinonas:

- i. **Prueba de Börntrager:** 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, rosado: positivo).
- ii. **Prueba de Börntrager modificado:** Calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento y calentar 10 minutos en baño 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).
- iii. **Cromatografía en capa fina:** Extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño María a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y aplicar 10 microlitros en la cromatoplaque de sílica gel 60 F<sub>254</sub>.
- ↻ Estándar: Solución al 0.1 por ciento en metanol de Antraquinonas (10 microlitros).

- ☛ Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).
- ☛ Detección: Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 ó 10 por ciento.
- ☛ Identificación:
  - ✓ Antraquinonas: Zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV a 365 nm.
  - ✓ Antronas y antralonas: Zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV a 365 nm.

#### 7.3.11.4. Investigación de cumarinas:

- i. 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).
- ii. Cromatografía en capa fina:** A 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 sílica gel 60 F<sub>254</sub>. 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 ó 10 por ciento.
  - ☛ Identificación: Fluorescencia azul o verde a 365 nm UV.

#### 7.3.11.5. Investigación de saponinas:

- i. Prueba de espuma:**
  - ☛ Tubo 1: 100 mg 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 María a 60°C durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30-40 segundos. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos. Observar la formación de capa de espuma. Si una capa

de espuma mayor de 3 cm. persistente en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas

ii. **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 microlitros en una cromatoplaca de sílica gel 60 F<sub>254</sub>.

↗ Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 microlitros).

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

↗ Detección: Reactivo de sangre. Zonas hemolíticas en fondo rojo.

↗ (Reactivo de Liebermann-Burchard: UV 365 nm 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.

#### 7.3.11.6. Investigación de principios amargos:

i. **Cromatografía en capa fina:** Calentar 1 g de material vegetal con 10 mL de metanol en baño 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 (visible).

↗ Reactivo de Liebermann-Buchard: UV 365 nm: Gris, café; VIS: Café oscuro, gris.

#### 7.3.11.7. Investigación de taninos:

i. **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 4-5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v). Observar la formación de precipitado o flocos evidentes.
- ↗ Tubo 3: Agregar 4-5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10 por ciento). Observar la formación de precipitado o flocos evidentes.
- ↗ Tubo 4: Agregar 3-4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v). Observar coloración negro-azulado tipo pirogalol, coloración grisácea-negro tipo catecol.

#### **7.3.11.8. Investigación de aceites volátiles:**

##### **i. 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 María (60°C) a sequedad.
  - i. Disolver en 1 mL de tolueno y aplicar 25-50 microlitros en cromatoplaqueta de silicagel 60 F<sub>254</sub>.
- ↗ 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 concentrado 1:10 y aplicar 5 microlitros (1:10) en cromatoplaqueta de sílica gel 60 F<sub>254</sub>.
- ↗ Estándar: Solución de tolueno 1:30 de metanol, timol, anisaldehído, acetol, 1,8-cineol (3 microlitros).
- ↗ Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7).
- ↗ Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina – ácido sulfúrico.
- ↗ Identificación: Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

#### **7.4. Diseño de investigación:**

Se realizó un estudio no probabilístico a conveniencia en el cual se determinará la actividad biocida (citotóxica, antimicrobiana y larvicida) del extracto etanólico de las hojas de *C. pyramidata* y sus particiones obtenidas por polaridad creciente (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa), esta especie fue seleccionada ya que no tiene estudios realizados.

Para la realización de la actividad bactericida y antifúngica se utilizó estadística no paramétrica con criterio de positividad visual (si presentó crecimiento homogéneo hay actividad negativa, ausencia de crecimiento hay actividad positiva) realizando cuatro réplicas por extracto y posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM). Se determinó la actividad citotóxica contra *A. salina* y la actividad larvicida contra mosquitos de *A. aegypti* y *A. albimanus*, para evaluar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) citotóxica y la concentración letal al 100% (CL<sub>100</sub>) para la actividad larvicida de los extractos se realizaron cuatro réplicas de ensayo.

La determinación de alcaloides, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos, taninos y aceites volátiles se realizó por medición de R<sub>f</sub>, ensayos macro y semimicro de reacciones de coloración y precipitación.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Rendimiento de la planta en estudio y sus particiones:**

En las tablas No. 1 y No. 2, se observan la cantidad del extracto obtenido y de cada partición derivada (en gramos) y el porcentaje de rendimiento de cada uno.

**Tabla No. 1**

**Rendimiento del proceso de obtención del extracto etanólico de *C. pyramidata***

<b>Peso (g)</b>	<b>Extracto (g)</b>	<b>Porcentaje de rendimiento (%)</b>
106.4	14.6653	13.7832

**Tabla No. 2**

**Rendimiento del proceso de partición del extracto etanólico de *C. pyramidata***

<b>Partición</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Porcentaje de rendimiento (%)</b>
Hexánica	1.6803	16.7748
Clorofórmica	2.6751	26.7061
Acetato de etilo	0.3280	3.2745
Acuosa	3.2893	32.8378

De las particiones obtenidas, la partición acuosa resultó ser la que tiene mayor porcentaje de rendimiento con un 32.83 por ciento, mientras que la de acetato de etilo fue la de menor rendimiento con 3.27 por ciento.

**8.2. Determinación de la actividad contra bacterias, levaduras y hongos:**

**8.2.1. Fase de tamizaje:**

Se determinó la actividad del extracto etanólico obtenido y sus particiones derivadas, contra las bacterias gram (+): *B. subtilis* y *S. aureus*, las bacterias gram (-): *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*; los hongos levaduriformes: *C. albicans* y *C. neoformans*, el hongo filamentoso: *A. flavus*; así como la micobacteria: *M. smegmatis*. Tabla No. 3.

**Tabla No. 3**

**Actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones**

<b>Extracto /Partición</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>P</b>
Etanólico	+	-	+	-	-	-	-	-	+	0.062

Hexánica	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.062
Clorofórmica	+	-	-	-	-	-	-	-	+	0.062
Acetato de etilo	+	+	+	-	+	+	-	-	+	0.062
Acuosa	+	-	-	-	-	-	-	-	+	0.062

**Organismos ensayados:** A: *S. aureus*, B: *S. typhi*, C: *M. smegmatis*, D: *B. subtilis*, E: *P. aeruginosa*, F: *C. albicans* G: *E. coli*, H: *C. neoformans*, I: *A. flavus*. **Referencias:** (+)= No hay crecimiento o actividad positiva, (-): Si hay crecimiento o actividad negativa. **P:** probabilidad estadística.

Cuando un microorganismo fue inhibido o no en su crecimiento, se consideró que el extracto o la partición tenía actividad positiva (+) o negativa (-) respectivamente. Según puede observarse en la tabla anterior, la partición acetato de etilo es la que presenta actividad positiva contra el mayor número de microorganismos (*S. aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*), mientras que las particiones clorofórmica y acuosa y el extracto etanólico solamente presentaron bioactividad contra *S. aureus*, adicionalmente el extracto etanólico presentó actividad contra *M. smegmatis*. Estos mismos extractos no presentaron actividad contra los restantes microorganismos a los que se enfrentaron.

**8.2.2. Determinación de la CIM:** Esta determinación se realizó únicamente con el extracto etanólico y las particiones que presentaron actividad positiva en la fase de tamizaje. Los resultados se observan en la tabla No. 4.

**Tabla No. 4**

**Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (mg/mL) de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones**

Extracto / Partición	A	B	C	E	F	I
Etanólico	0.5	NE	0.5	NE	NE	1.0
Hexánica	NE	NE	NE	NE	NE	1.0
Clorofórmica	1.0	NE	NE	NE	NE	1.0
Acetato de etilo	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Acuosa	1.0	NE	NE	NE	NE	1.0

**Organismos ensayados:** A: *S. aureus*, B: *S. typhi*, C: *M. smegmatis*, E: *P. aeruginosa*, F: *C. albicans*. I: *A. flavus*. **Referencias:** NE: no ensayado por no presentar actividad en la fase de tamizaje.

El extracto etanólico y sus particiones evaluadas (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) para la determinación de CIM inhibieron el crecimiento de los microorganismos contra los que se habían evaluado en la fase de tamizaje.

**8.3. Determinación de la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*:**

**8.3.1. Fase de tamizaje:**

La actividad del extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones fue determinada según la letalidad de las muestras contra nauplios de *A. salina* de 48 horas de vida a los que se enfrentaron. En la fase de tamizaje se consideró que un extracto presentaba actividad positiva si era capaz de matar a más del 50 por ciento de los nauplios contra los que se evaluó. Este procedimiento se realizó por triplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los tres pozos de la prueba. Tabla No. 5

**Tabla No. 5**

**Tamizaje de la actividad citotóxica del extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones contra nauplios de *A. salina*.**

<b>Extracto / Partición</b>	<b>Pozo No.1 Muertos/Totales</b>	<b>Pozo No.2 Muertos/Totales</b>	<b>Pozo No.3 Muertos/Totales</b>	<b>Nauplios muertos (%)</b>
Etanólico	5/10	6/10	8/10	63.3
Hexánica	4/12	8/11	4/12	45.7
Clorofórmica	4/10	4/10	5/10	43.3
Acetato de etilo	6/10	6/10	7/10	63.3
Acuosa	6/10	8/10	6/10	66.7

Puede apreciarse en la tabla anterior, que el extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones acetato de etilo y acuosa presentaron actividad positiva en la fase de tamizaje, ya que presentaron un porcentaje de nauplios muertos de 63.3 por ciento para el extracto acuoso y la partición acetato de etilo, en tanto que la partición acuosa obtuvo un porcentaje del 66.7; estos valores fueron mayores del 50 por ciento, el cual era considerado como valor indicador de la actividad citotóxica positiva.

**8.3.2. Determinación de la DL<sub>50</sub> :**

Ya que el extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones acetato de etilo y acuosa mostraron actividad positiva contra las nauplios de *A. salina* en la fase de tamizaje, se procedió a determinar la dosis a la que el mismo extracto era capaz de matar al 50 por ciento de estos crustáceos. El procedimiento aplicado fue el mismo que se utilizó en la fase de tamizaje, pero empleando tres diferentes concentraciones de las muestras a evaluar (1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL), para obtener a través del programa Finney la DL<sub>50</sub>. Tabla No.6.

**Tabla No. 6**

**Determinación de la Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) del extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones contra nauplios de *A. salina*.**

Extracto / Partición	No. nauplios muertos por dosis			DL <sub>50</sub> mg/mL	Intervalo de Confianza LCS-LCI al 95 %
	1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL		
Etanólico	5	4	2	0.91	1.652-0.036
Acetato de etilo	5	4	2	0.91	1.652-0.036
Acuosa	6	3	1	0.79	0.346-0.628

#### 8.4. Determinación de la actividad larvicida:

Esta prueba consistió en confrontar el extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones contra las 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 sería considerada como tal, si la muestra a ensayar causaba la muerte del 100 por ciento de las larvas presentes en los pozos de prueba, de lo contrario se estableció que la CL<sub>100</sub> es mayor de 1 mg/mL, es decir, que la muestra no tiene actividad biocida contra éstas larvas. Tabla No. 7

**Tabla No. 7**

**Actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* del extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones en mg/mL\***

Extracto / Partición	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albimanus</i>
Etanólico	>1	>1
Hexánica	>1	>1
Clorofórmica	>1	>1
Acetato de etilo	>1	>1
Acuosa	>1	>1

\* Concentración Letal CL<sub>100</sub>.

#### 8.5. Tamizaje Fitoquímico:

Haciendo uso de ensayos macro, ensayos semimicro y cromatografía en capa fina se encontraron metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *C. pyramidata* y sus particiones obtenidas por polaridad creciente (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa). En las tablas No. 8-16 se exponen los metabolitos hallados, así como las fases móviles y métodos de detección empleados.

**Tabla No. 8**

**Alcaloides**

Extracto /	Mayer	Dragendorff	Wagner	CCF
------------	-------	-------------	--------	-----

Partición	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
Etanólico	Precipitación	Positivo	Turbidez	Positivo	Precipitación	Positivo	Zonas color naranja (VIS)	Naranja, Rf: 0.90
Hexánica		Positivo		Positivo		Positivo		Naranja, Rf: 0.90
Clorofórmica		Positivo		Positivo		Positivo		Naranja, Rf: 0.88.
Acetato de etilo		Negativo		Positivo		Positivo		Ausente
Acuosa		Positivo		Positivo		Positivo		Naranja, Rf: 0.88

**Revelador:** Dragendorff. **Fase móvil:** Tolueno - acetato de etilo - dietilamina (14:4:2). **Estándares:** Atropina, papaverina y reserpina; color naranja en visible.

**Tabla No. 9**  
**Antraquinonas**

Extracto /Partición	Prueba de Börntrager		CCF	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
Etanólico	Coloración rojo, rosado	Negativo	Zonas rojas en visible. Fluorescencia amarilla en UV a 365 nm.	Naranja Rf: 0.91.
Hexánica		Negativo		Naranja Rf: 0.91.
Clorofórmica		Negativo		Naranja Rf: 0.91.
Acetato de etilo		Negativo		Naranja
Acuosa		Negativo		Naranja

**Revelador:** Vainillina / ácido sulfúrico **Fase móvil:** Acetato de etilo – metanol - agua (25:4.3:3.3). **Estándares:** Sen, color rojo-verde (Rf: 0.41); bajo luz UV a 365 nm.

**Tabla No. 10**  
**Cumarinas**

Extracto /Partición	Ensayo macro	
	Reacción	Resultado
Etanólico	Coloración verde o azul bajo luz UV a 365 nm	Verde, Positivo.
Hexánica		Incoloro, negativo.
Clorofórmica		Verde, positiva
Acetato de etilo		Amarillo-verde, positivo.
Acuosa		Incolora, negativo.

**Revelador:** Hidróxido de potasio 0.5 N. **Estándares:** Cumarinas, color azul-verde bajo luz UV a 365 nm.

**Tabla No. 11**  
**Aceites volátiles**

Extracto /Partición	CCF
---------------------	-----

	Reacción	Resultado
Etanólico	Zonas rojas, cafés, azules y verdes en visible.	Negativo
Hexánica		Negativo
Clorofórmica		Negativo
Acetato de etilo		Negativo
Acuosa		Negativo

**Revelador:** Vainillina / ácido sulfúrico **Fase móvil:** Tolueno-acetato de etilo (93:7). **Estándares:** Eugenol, color naranja; linalool, color azul; timol, rojo; carvacrol, color azul-violeta.

**Tabla No. 12**  
**Antocianinas**

Extracto /Partición	CCF	
	Reacción	Resultado
Etanólico	Fluorescencia intensa en UV a 365 nm.	Amarillo, Rf: 0.74.
Hexánica		Negativo
Clorofórmica		Amarillo, Rf: 0.74.
Acetato de etilo		Amarillo, Rf: 0.74.
Acuosa		Amarillo, Rf: 0.75.

**Revelador:** Vainillina / ácido sulfúrico **Fase móvil:** n-butanol - ácido acético - agua (4:1:1). **Estándares:** Rojo de Sudán y azul de metileno; color rojo y azul en VIS.

**Tabla No. 13**  
**Saponinas**

Extracto / Partición	Test de espuma		CCF	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
Etanólico	Formación de espuma	Positivo	Zonas azules, violetas, amarillentas (VIS)	Amarillo, Rf: 0.7
Hexánica		Positivo		Violeta, Rf:0.8
Clorofórmica		Positivo		Violeta, Rf:0.8
Acetato de etilo		Positivo		Amarillo, Rf: 0.78.
Acuosa		Positivo		Amarillo, Rf: 0.81.

**Revelador:** Vainillina- ácido sulfúrico **Fase móvil:** cloroformo – metanol- agua (6.4: 5:2). **Estándares:** Solución de saponinas, color amarillo (Rf: 0.84); Colesterol: violeta (Rf: 0.85).

**Tabla No. 14**  
**Taninos**

Extracto / Partición	Gelatina al 1 % p/v		Gelatina-sal		Cloruro férrico al 1%	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
Etanólico	Presencia de	Negativo	Presencia de	Negativo	Pirogalol: Coloració	Negativo
Hexánica		Negativo		Negativo		Negativo

Clorofórmica	precipitados o floculos.	Negativo	precipitados o floculos.	Negativo	n negro azulado. Catecol: Coloración negro grisáceo.	Negativo
Acetato de etilo		Negativo		Negativo		Negativo
Acuosa		Negativo		Negativo		Negativo

**Gelatina al 1 %:** precipitado blanco, positivo. **Gelatina sal:** formación de precipitado, positivo.  
**Cloruro férrico al 1 %:** color azul a negro, positivo.

**Tabla No. 15**  
**Flavonoides**

Extracto / Partición	CCF	
	Reacción	Resultado
Etanólico	Intensa fluorescencia bajo UV a 365 nm.	Amarillo verde, Rf: 0.81.
Hexánica		Incolora, negativo.
Clorofórmica		Amarillo verde, Rf: 0.85.
Acetato de etilo		Amarillo verde, Rf: 0.85.
Acuosa		Amarillo verde, Rf: 0.84.

**Revelador:** NP/PEG. **Fase móvil:** Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial- agua (20:2.2:2.2:5.4). **Estándares:** Ácido clorogénico, color amarillo – verde (Rf: 0.73); Quercetina: color naranja (Rf: 0.70); todos bajo luz UV a 365 nm.

**Tabla No. 16**  
**Principios amargos**

Extracto / Partición	CCF	
	Reacción	Resultado
Etanólico	Zonas rojas – violetas, cafés – rojas, azules-verdes en visible.	Sin tratamiento: amarillo-verde, violeta azul. Con tratamiento: Naranja. Rf: 0.76.
Hexánica		Sin tratamiento: naranja-café, violeta azul. Con tratamiento: Naranja. Rf: 0.94.
Clorofórmica		Sin tratamiento: roja-naranja, violeta azul. Con tratamiento: Naranja. Rf: 0.93
Acetato de etilo		Sin tratamiento: amarillo –verde Con tratamiento: Naranja. Rf: 0.74.
Acuosa		Sin tratamiento: amarillo –verde Con tratamiento: Naranja. Rf: 0.73.

**Revelador:** Vainillina / ácido sulfúrico al 5 %. **Fase móvil:** Acetato de etilo – metanol - agua (15.4:3:1.6). **Estándares:** Naringenina, color naranja (Rf: 0.92).

## 9. DISCUSIÓN

La obtención del extracto etanólico de hojas de *C. pyramidata* se realizó por medio del método de percolación logrando un rendimiento del 13.78 por ciento, este resultado depende de factores tales como: La época de corte, grado de humedad del material vegetal, proceso de secado, el sistema de cultivo y el método de extracción. Es importante recordar que se trata de una especie silvestre, por su potencial terapéutico y posible producción comercial sería conveniente realizar estudios con ejemplares provenientes de distintos cultivares para evaluar el porcentaje de rendimiento en condiciones controladas.

La obtención de las particiones por orden creciente de polaridad del extracto etanólico de *C. pyramidata* se realizó por medio de partición líquido-líquido, obteniéndose las particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa; el rendimiento fue mayor para la partición acuosa (32.84 %), mientras que la partición obtenida con acetato de etilo fue la de menor rendimiento (3.27 %). La cantidad obtenida de extracto acuoso se debe a que la mayoría de los componentes presentes en esta partición presentan mayor afinidad por el agua, la fracción acetato de etilo fue la de menor porcentaje de rendimiento, sin embargo resultó ser la más importante de las analizadas, en cuanto a las diversas actividades biocidas evaluadas, lo cual implica que para su administración con fines terapéuticos es necesario considerar la dosis a la

que demostró tener actividad positiva en relación con la cantidad de materia vegetal a emplear para obtener las propiedades establecidas en el presente estudio.

El ensayo *in vitro* para evaluar la actividad contra bacterias, hongos levaduriformes y hongos filamentosos en la fase de tamizaje utilizó microorganismos que representaran los principales géneros y especies de microorganismos patógenos al hombre. Se determinó que el extracto etanólico, las particiones clorofórmica, acetato de etilo y acuosa presentaron actividad positiva en la fase de tamizaje contra *S. aureus*; el extracto etanólico y la partición acetato de etilo demostraron actividad biocida contra *M. smegmatis*, la partición acetato de etilo además tuvo actividad positiva contra *S. typhi*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Tanto el extracto etanólico como sus particiones presentaron actividad contra *A. flavus*. Estas determinaciones tienen significancia estadística, ya que su valor P fue de 0.062.

A los extractos que evidenciaron actividad significativa en la fase de tamizaje se les determinó la CIM, utilizando diferentes concentraciones de las muestras y evaluándolas contra los microorganismos a los que presentaron actividad positiva. El extracto etanólico presentó actividad biocida contra *M. smegmatis* y *S. aureus* a una concentración de 0.5 mg/mL, la partición acetato de etilo presentó bioactividad contra *S. aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* a una concentración de 0.5 mg/mL, en tanto que las particiones clorofórmica y acuosa indicaron actividad positiva contra *S. aureus* a una concentración de 1 mg/mL. En la determinación de la actividad contra hongos filamentosos se evidenció que todas las particiones de las especies en estudio presentaron actividad a una concentración de 1 mg/mL contra *A. flavus*. Los resultados antes presentados señalan que esta especie posee efectividad para inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos levaduriformes y hongos filamentosos, aunque a concentraciones relativamente altas.

Al evaluar la actividad citotóxica contra *A. salina* se determinó que el extracto etanólico, las particiones acetato de etilo y acuosa evidenciaron actividad citotóxica a una DL<sub>50</sub> de 0.91 mg/mL y 0.79 mg/mL respectivamente, propiedad vinculada con la presencia de compuestos con actividad tumoral. Los resultados de la evaluación larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus* mostraron que ninguno de los extractos evaluados posee actividad larvicida contra las dos especies de los mosquitos ensayados.

Los resultados obtenidos fueron comparados con los obtenidos en el Proyecto IIQB: "Caracterización de Extractos de Tres Plantas Nativas Mesoamericanas con

Actividad Biocida” y el Proyecto Flora Regional OEA: “Proyecto de aprovechamiento de la flora regional como fuente de fármacos anticáncer, antiparasitarios y antifúngicos” (datos no publicados), encontrándose resultados similares, salvo en el caso de *C. albicans* contra el extracto etanólico, que en el Proyecto Flora Regional presentó actividad a una concentración menor (0.25 mg/mL),

Aprovechando la participación del equipo de trabajo de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en el Proyecto Flora Regional OEA: “Proyecto de aprovechamiento de la flora regional como fuente de fármacos anticáncer, antiparasitarios y antifúngicos”, se enviaron muestras de los extractos de *C. pyramidata* para el análisis de actividad antiprotozo, anticáncer y antifúngica, encontrándose actividad biocida contra *T. cruzi* y *P. falciparum*, y no se encontró actividad contra *Leishmania mexicana*; el ensayo fue realizado en el INDICASAT, la dosis probada fue de 100 µg.

En el CIFLORPAN de la Universidad de Panamá se evaluó la actividad de las fracciones 836 a 841 del extracto de hojas de *C. pyramidata* contra las líneas celulares de cáncer MCF-7 (células de mama, H 460 (células de pulmón), SF 268 (células del sistema nervioso central), resultando inactivo.

En la Universidad Nacional de Rosario, Argentina se corrieron bioensayos contra hongos filamentosos encontrándose actividad moderada (0.5 mg/mL) contra *Epidermophyton floccosum*, y no se encontró actividad *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. neoformans* como hongos levaduriformes, y no se encontró actividad contra los siguientes hongos filamentosos: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*.

En el tamizaje fitoquímico se determinó que las particiones de la especie vegetal que demostraron bioactividad positiva presentaron metabolitos secundarios tales como: Alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides y principios amargos. Estos metabolitos secundarios caracterizados por medio de CCF pueden ser los responsables de la actividad biológica de las particiones y las propiedades farmacológicas atribuidas<sup>4, 7, 22</sup>, como en el caso de los flavonoides que a menudo son antiinflamatorios, antiespasmódicos, citostáticos y antibacterianos. Los alcaloides son reconocidos por su actividad sobre el sistema nervioso central y anticancerígena<sup>65</sup>.

Estudios realizados a *C. grandifolia* var. *intermedia*<sup>16, 35</sup> permitieron identificar y elucidar la presencia de compuestos diterpenoides del tipo neoclerodanos, llamado Cornutinas, que van desde el tipo A hasta L, debido a que la Flora de Guatemala

reconoce a *C. grandifolia* y *C. pyramidata* como especies diferentes es importante elucidar las moléculas responsables de la actividad biológica en *C. pyramidata*.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1. La partición obtenida a partir del extracto etanólico de mayor rendimiento fue la partición acuosa (32.84 %) y la de menor rendimiento fue la partición obtenida con acetato de etilo (3.27 %).
- 10.2. Tanto el extracto etanólico de las hojas de *C. pyramidata* y sus particiones obtenidas por polaridad creciente (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) presentaron al menos una actividad biocida positiva.
- 10.3. El extracto etanólico presentó actividad biocida contra *S. aureus* y *M. smegmatis* a una concentración de 0.5 mg/mL, las particiones clorofórmica y acuosa demostraron actividad contra *S. aureus* a una concentración de 1 mg/mL, la partición acetato de etilo presentó actividad contra *S. aureus*, *S. typhi*; *M. smegmatis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* a una concentración de 0.5 mg/mL.
- 10.4. El extracto etanólico y sus particiones presentaron actividad positiva contra *A. flavus* a una concentración de 1 mg/mL.
- 10.5. El extracto etanólico y las particiones acetato de etilo y acuosa de *C. pyramidata* presentaron actividad citotóxica contra los nauplios de *A. salina*, a una DL<sub>50</sub> de 0.91 mg/mL y 0.79 mg/mL respectivamente.
- 10.6. El extracto etanólico y sus particiones fueron inactivos contra las larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*, a las dosis ensayadas.

- 10.7.** Los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de la especie en estudio y sus particiones son: Alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides y principios amargos.

## **11. RECOMENDACIONES**

- 11.1.** Hacer estudios con ejemplares provenientes de distintos cultivares y ambientes, para evaluar el porcentaje de rendimiento en condiciones controladas.
- 11.2.** Evaluar la actividad farmacológica de los extractos de *C. pyramidata* con el objetivo de validar las propiedades medicinales (anticáncer, antipirética, analgésica, antiinflamatoria, broncodilatadora) que se le atribuyen popularmente.
- 11.3.** Realizar otras pruebas de citotoxicidad de las particiones que demostraron actividad, así como otras líneas de células de cáncer.
- 11.4.** Realizar el ensayo de la actividad insecticida en diferentes épocas del año y contra otros insectos dañinos al hombre.
- 11.5.** Continuar con la separación y elucidación del metabolito responsable de la actividad presente en las particiones que demostraron actividad biocida.
- 11.6.** Realizar estudios de actividad biológica con extractos obtenidos de otros órganos de la planta *C. pyramidata*.

## 12. REFERENCIAS

1. AHMED, M.S., *et al.* 2001. A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochem.* 58: 599-602.
2. AKERELE, O. 1988. Medicinal Plants and Primary Health Care: an agenda for action. *Fitoterapia.* 59: 355-363.
3. ANDERSON J.E., *et al.* 1991. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Anal.* 2: 107-111.
4. ANKLI, A., *et al.* 1999. Medical Ethnobotany of the Yucatec Mayan Healers: Consensus as a Quantitative Criterion. *Econ. Bot.* 53(2):144–160.
5. ANÓNIMO. 1991. Reunión anual de la Red Iberoamericana de Productos Naturales de uso medicinal. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Sao Paulo, Brasil. pp. 15-19.
6. BALANDRÍN, M., *et al.* 1993. Plant derived natural products in drug discovery and development, en Human medicinal agents from plants. Kinghorn, A., Balandrín, M. (Eds). American Chemical Symposium series 534, American Chemical Society, New York, USA. pp. 2-12.
7. BASE DE DATOS NAPRALERT.
8. BOIK, J. 1996. Cancer and Natural Medicine. USA. Oregon Medical Press. Minnesota, USA. pp. 5-14.
9. BOYD, M. y PAULL, K. 1995. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev .Res.* 34:91-109.
10. BRANCATO, F.P. y GOLDING N.S. 1953. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia.* (6)45: 848-863.
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. CÁCERES, A., *et al.* 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1ª. Edición. Guatemala, Guatemala. Editorial Universitaria. pp. 27-33.
13. CANNELL, R. 1998. Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation. Totowa, New Jersey, USA. Humana Press, Inc. pp. 4-5.
14. CASTILLO MARROQUÍN, C.R. 2003. Actividad moduladora del sistema del complemento de cinco plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de infecciones protozoarias intracelulares. Guatemala. 49. Tesis Licenciada en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica.
15. CHARIANDY, M.C., *et al.* 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. J. Ethnopharmacol. 64: 265-270.
16. CHEN, T.B., *et al.* 1992. Cornutin A and B: Novel diterpenoid repellents of leafcutter ants from *Cornutia grandifolia*. J. Org. Chem. 57:862-866.
17. CORDELL, G. A., *et al.* 1993. Novel strategies for the discovery of plant derived anticancer agents, en Human medicinal agents from plants, Kinghorn, A., Balandrín, M. (Eds). American Chemical Symposium series 534, American Chemical Society, New York, USA. pp. 191-204.
18. COX, P. A. y BALICK, M. J. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery. Scientific American, June. pp. 82-87.
19. CUTLER, S. 2000. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. Boca Ratón, Florida, USA. CRC Press LLC. pp. 17-23.
20. CYTED (PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO). 1993. Manual de Técnica de Investigación. Bogotá, Colombia. Proyecto X-1, s/p.
21. DE PAULA, J. y MARTINS, A. 2000. Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev. Cubana Plantas Med. 5(1):26-29.
22. DIESELDORFF, EP. 1977. Las plantas medicinales del Departamento de Alta Verapaz y Guatemala. Guatemala, Guatemala. Tipografía Nacional. pp. 40.
23. DOMÍNGUEZ, X.A. 1985. Métodos de Investigación Fitoquímica. 3a. reimpresión. México, México. Editorial Limusa, S.A. de C.V. pp. 31-32.
24. FARNSWORTH, N.R. 1985. La medicina moderna y las plantas: un encuentro entre la ciencia y el folklore. Foro Mundial Salud. 6: 89-94.

25. FARNSWORTH N.R., *et al.* 1989. Las plantas medicinales en la terapéutica. Bol. Of. Sanit. Panamer. 107: 314-329.
26. FIÓN EVANS, M.A. 2003. Recopilación de Plantas Medicinales Validadas Farmacológicamente por estudiantes asesoradas en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. pp. 19-25. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
27. GAITÁN FERNÁNDEZ, I.C. 2005. Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*. Guatemala. 49. Tesis Licenciada en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica.
28. GENTRY, A. H. 1996. A field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America. Chicago, USA. The University of Chicago Press. pp. 835.
29. GRIEVE, M. 1971. A Modern Herbal. Dover, New York, USA. pp. 19-21.
30. HERNÁNDEZ, I., *et al.* 1999. Estudio fitoquímico de la especie *Hibiscus elatus* S.W. Rev. Cubana Farm. 33(2):127-31.
31. HERNÁNDEZ, L., *et al.* 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. Revista Cubana Plantas Med. (2):44-47.
32. HOSTETTMAN, K., *et al.* 2001. Pharmaceutical Biology: Ethnobotanical and Bioprospective Effects on Drug Discovery in the Next Millenium. Phytochem. Supplement.: 1-92. 39: 15-32.
33. INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD. Jerarquía Taxonómica: Listado de especímenes de *C. pyramidata*. Costa Rica. Disponible en: [www.inbio.ac.cr](http://www.inbio.ac.cr)
34. INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. USA. Disponible en [www.itis.usda.gov/index.html](http://www.itis.usda.gov/index.html)
35. JENETT- SIEMS, K., *et al.* Cornutins C–L, neo-clerodane-type diterpenoids from *Cornutia grandifolia* var. *intermedia*. 2003. [Phytochem.](#) **64(3)**:797-804.
36. LOZAYA, X., *et al.* 1989. La medicina tradicional en México: Plantas Medicinales de México. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
37. MABBERLEY, D.J. 1987. The Plant Book. Cambridge, UK. Cambridge University Press. pp. 147, 633.

38. MADDIGAN, M.T. 1998. Brock: Biología de los microorganismos. 8ª. Edición. Madrid, España. Prentice Hall. pp. 15-16, 110-116.
39. MALONE, M.H. y ROBICHAUD, R.C. 1962. A Hippocratic Screen for Pure or Crude Drug Materials. Lloydia 24:320-332.
40. MARTÍNEZ, E., et al. 2001. Listados Florísticos de México: Región de Calakmul, Campeche, México. s/p.
41. MARTÍNEZ, M.J., et al. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Revista Cubana Plantas Med. 2(1): 12-14.
42. MEDINILLA, B.E. 2002. Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, Guatemala. pp. 27.
43. MEYER, B.N., et al. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. Plan. Med. 45: 31-34.
44. MICHAEL, A., et al. 1956. *Artemia salina* as a test organism bioassay. Science 123: 464.
45. MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Nomenclatura Data Base. USA. Disponible en [www.mobot.org](http://www.mobot.org)
46. MITSCHER, L.A., et al. 1987. A modern look at folkloric use anti-infective agents. J. Nat. Prod. 5: 1025-1041.
47. MITSCHER, L.A., et al. 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. Lloydia. 35: 157-166.
48. NATURALEZA DOMINICANA. La Flora Apícola de la República Dominicana: Nombres Vulgares de las Especies de Importancia Apícola. República Dominicana. Disponible en: [www.marcano.freeserves.com/nature/estudios/apicola/dicotsp.html](http://www.marcano.freeserves.com/nature/estudios/apicola/dicotsp.html)
49. NELSON, C. 1986. Plantas comunes de Honduras. Tegucigalpa, Honduras. Editorial Universitaria. pp. 438.
50. OVENDEN, S., et al. 2002. Spermine alkaloids from *Albizia adinocephala* with activity against *Plasmodium falciparum* plasmepsin II. Phytochem. 60: 175 -177.
51. PAYO HILL, A., et al. 2001. Tamizaje Fitoquímico Preliminar de especies del Género *Croton* L. Rev. Cubana Farm. 35 (3): 203-206.
52. PELLECUER, S., et al. 1976. Huiles Essentielles Bactericides et Fongicides. Revue de l'Institute Pasteur de Lyon. 9:135-159.
53. PINO ALEA, J. A. et al. 1997. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown. Rev. Cubana Farm. 30:1.

54. POMILIO, A.B. y MONGELLI, E. 2002. Etapas de Screening. Ciencia Hoy. 12:68.
55. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA MADRE Y MAESTRA. Arboretum Virtual PUCMM. República Dominicana. Disponible en [www.rsta.pucmm.edu.do/ciencias/arboretum](http://www.rsta.pucmm.edu.do/ciencias/arboretum)
56. RIOS J.L., *et al.* 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. J. Ethnofarmacol. 28: 127-149.
57. RIVERO LÓPEZ, M., *et al.* 1997. Actividad antifúngica in vitro del *Pinus caribaea* (pino macho). Revista Cubana Plantas Med. 2(1): 25-29.
58. RONDINA, R.V.D. y COUSSIO, J.D. Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales Argentinas (1). Rev. Invest. Agropec. (Serie 2) Biología y Producción Vegetal. 6 (2): 352-366.
59. SÁNCHEZ, C., *et al.* 1993. Bioensayo con *Artemia salina* para predecir la actividad antibacteriana y farmacológica. Rev. Méd. Panamá. 18:62-69.
60. SANDBERG, F. 1967. Pharmacological Screening of Medicinal Plants. Government, Colombo, Shrilanka. pp. 1-15.
61. SANDBERG, F. 1987. The Integrated Natural Products Research in the Development of Plant-derived Pharmaceuticals. Fitoterapia. 57: 309-313.
62. SHARAPIN, N., *et al.* 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 1ª. Edición. Colombia. CAB y CYTED. Pp. 247.
63. SHU, Y. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. J. Nat.Prod. 61: 1053-1071.
64. SOLÍS, P.N. *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). Plan. Med. 59: 250-252.
65. SOLÍS, P.N. *et al.* 2005. Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos (OEA/AICD/AE 089/03). pp. 43-65.
66. STANDLEY, PC & L.O. WILLIAMS. 1970. Flora de Guatemala. USA. Fieldana Botany. Parte 24. Volumen 9. pp. 196-197.
67. STANDLEY, PC & L.O. WILLIAMS. 1931. Flora of the Lancetilla Valley Honduras. USA. Field Museum of Natural History. Parte 24. Volumen 9. pp. 335-336.
68. STEVENS, W.D., *et al.* 2001. Flora de Nicaragua. Missouri, USA. Missouri Botanical Garden Press. Tomo III. pp. 2510.

69. TRAMIL. 1997. Farmacopea Caribeña. Santo Domingo, República Dominicana. Ediciones Emile Desormeaux. pp. 113.
70. TRAMIL: MEDICINAL PLANTS DATABASE. Republica Dominicana. Disponible en <http://funredes.org/tramil>
71. TREASE y W. EVANS. 1991. Farmacognosia. 13ª. Edición. México. Interamericana McGraw Hill. Pp. 261-280.
72. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Plants Database. USA. Disponible en: [http://plants.usda.gov/cgi\\_bin/topics](http://plants.usda.gov/cgi_bin/topics)
73. VARGAS, S. 1990. Plantas medicinales: la naturaleza como guardián de su salud. Mundo Gráfico, San José, Costa Rica. 55 p.
74. WAGNER, H., *et al.* 2001. Plant Drug Analysis. 2a. Edición. Berlin, Germany. Springer-Verlag Heidelberg. pp. 384.
75. WAH SAM T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In. Colegate FM & Molineux RJ. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. Boca Raton, CRC Press. pp. 441-456.
76. WILLIAMSON, E.M., *et al.* 1996. Pharmacological Methods in Phitotherapy Research: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Volume I. Chichester, England. John Wiley & Sons Ltd. pp. 20-22.
77. ZARRAUG, I.M.A., *et al.* 1988. Evaluation of Sudanese plant extracts as mosquito larvicides. Int. J. Crude Drug Res. 26: 77-80.

## 13. ANEXOS

### 13.1. Fotografías *C. pyramidata* :



### 13.2. Dibujo *C. pyramidata* L.:



Dibujo por Pancrace Bessa

### 13.3. Ficha para extractos:

No. del extracto \_\_\_\_\_

Identificación de la especie \_\_\_\_\_

Parte de la planta \_\_\_\_\_

Peso de la muestra (seca) \_\_\_\_\_ (g)

Extracto etanólico \_\_\_\_\_ (g) Rendimiento \_\_\_\_\_ (%)

Extracto hexánico \_\_\_\_\_ (g) Rendimiento \_\_\_\_\_ (%)

Extracto clorofórmico \_\_\_\_\_ (g) Rendimiento \_\_\_\_\_ (%)

Extracto acetato de etilo \_\_\_\_\_ (g) Rendimiento \_\_\_\_\_ (%)

Extracto acuoso \_\_\_\_\_ (g) Rendimiento \_\_\_\_\_ (%)

Características generales del extracto:

Color: \_\_\_\_\_

Olor: \_\_\_\_\_

Presencia de cristales: SI  NO

Fecha: \_\_\_\_\_

#### 13.4. Organismos de experimentación:

**13.4.1. A. aegypti:** Pertenece al orden Diptera, familia *Culicidae*, género *Anopheles*. El insecto adulto es de color negro con dibujos plateados en el tórax y patas. En su porción dorsal hay dos líneas longitudinales centrales y paralelas, y dos externas laterales que hacia delante se encorvan hacia dentro y atrás, con una ligera concavidad hacia fuera, las cuatro líneas están formadas por escamas plateadas y dan el aspecto de "lira" característico de la especie. Las patas posteriores presentan anillos blancos. La larva y pupa tienen sifón respiratorio corto. Los huevos son pequeños y negros, puestos aislados por encima del borde del agua, pues deben pasar cierto tiempo en seco y a espera de la llegada del agua.

Son antropófilos, las hembras pican al atardecer o en la noche, el ataque es silencioso y buscan los pies, tobillos o cuello. Es el agente etiológico de la fiebre amarilla, propaga el virus del grupo B de *Togavirus*

que se transmite después de 8 a 10 días de haber infectado al insecto, es también el agente causal del dengue (producido por un virus del género *Togaviridae*, subgénero *Flavivirus*).

**13.4.2. A. flavus:** Es un hongo de naturaleza ubicua y es un contaminante frecuente de laboratorio. El abundante micelio aéreo pulverizado es veloso y pigmentado a medida que produce conidias de color amarillo, marrón amarillento o verde. La inhalación de esporas o fragmentos de micelio, puede llegar a causar en algunas personas una respuesta de hipersensibilidad inmediata sin que exista una invasión en el cuerpo.

En individuos inmunodeprimidos puede observarse aspergilosis pulmonar de tipo grave o infección generalizada en pacientes que reciben tratamientos con antibióticos o corticosteroides.

**13.4.3. B. subtilis:** Bacteria claviforme pertenece a la familia de las Bacillaceae. Mide de 0.3 a 2.2 por 1.27 a 7.0  $\mu\text{m}$ , móvil con flagelos típicamente laterales, Gram positivo, tiene metabolismo aeróbico, es esporoformadora cuando su ambiente no favorece su viabilidad, sus esporas resisten al calor, la luz ultravioleta y la radiación gamma y una variedad de químicos tóxicos. Esta bacteria se encuentra comúnmente en el suelo, aire, agua salada e infusiones de material vegetal<sup>38</sup>.

Ocasionalmente es responsable de infecciones, particularmente respiratorias y oculares y raramente puede ser responsable de septicemias, sobretodo en prematuros. Es también causa de toxiinfecciones alimentarias y ha sido repetidamente aislado de las heces. Elabora una toxina, denominada sutisilina, cuyo mecanismo de acción consiste en la lesión de la membrana celular, sus propiedades patógenas son muy similares a los de la toxina delta producida por algunas cepas de estafilococos. Las infecciones por *B. subtilis* suelen responder al tratamiento con antibióticos B-láctamicos.

**13.4.4. E. coli:** Bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Considerada como el material biológico más utilizado en experimentación y es considerado de contaminación fecal.

Esta bacteria se encuentra en el tracto gastrointestinal de los mamíferos. La especie comprende varios grupos que se establecen según su actividad. Las especies de *E. coli* oportunistas producen infecciones sólo si abandonan en el colon. Otros grupos producen hasta el 90 % de las diarreas infantiles y la denominada diarrea del viajero, ésta última no es grave, pero la gastroenteritis aguda de los niños puede provocar la inflamación de la mucosa intestinal, dando lugar a deshidratación grave y heces purulentas.

**13.4.5. *C. albicans*:** Es un hongo levaduriforme que presenta levaduras ovaladas o globosas, gemantes con tamaños distintos, además puede presentar pseudomicelios y/o micelio verdadero, tanto en muestras clínicas como en los diferentes medios de laboratorio. Es un hongo de crecimiento rápido (24-48 horas) que crece perfectamente a 27-37 °C, tanto en medios micológicos (agar Sabouraud y agar Sabouraud con antibióticos) como en medios bacteriológicos (agar Sangre, agar chocolate o agar nutritivo).

Su colonia es de color crema, pastosa y lisa semejante a “gota de parafina”, que con el tiempo se va tornando rugosa y plegada. En algunas cepas, dentro del medio de cultivo se puede observar la presencia de raicillas que salen del reverso de la colonia, lo cual es bastante característico <sup>38</sup>. Cuando crece a 37°C produce hifas, tubos germinales y puede asimilar maltosa, galactosa, xilosa y fermenta la glucosa <sup>38</sup>.

Las especies del género *Candida* son miembros de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y mucosas, así pues, el riesgo de infección endógena está presente, siendo de hecho la micosis sistémica más común y de mayor incidencia en pacientes inmunodeprimidos pudiendo ocasionar infecciones oportunistas. Capaz de producir levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas en incubación, en suero humano a 37 °C, esta característica es muy útil en la diferenciación de *C. albicans* de otras especies del género.

**13.4.6. *C. neoformans*:** Es un hongo levaduriforme que no tiene fase micelial y en muestras clínicas se caracteriza por presentar las levaduras redondas

con una sola gemación y una cápsula de mucopolisacáridos visible con coloración de contraste con tintura china. Es de crecimiento rápido tanto a 25°C como a 37°C, crece en medios de cultivo sin inhibidores. Su colonia en agar Sabouraud es cremosa, ligeramente amarilla, brillante y mucoide <sup>38</sup>.

Los criptococos son pequeños, secos y fácilmente aerosolizados, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero se les encuentra sobretodo en los excrementos de las aves de corral, especialmente en palomas. Comúnmente se contrae la infección al inhalarlo. Por tanto, la puerta de entrada al organismo es el aparato respiratorio y la infección primaria es pulmonar.

Es el agente etiológico de Cryptococosis, micosis que puede ser subaguda o crónica con un foco primario a nivel pulmonar y posterior diseminación al sistema nervioso central produciendo meningitis casi siempre mortal <sup>38</sup>. La criptococosis pulmonar progresiva es muy similar a la tuberculosis. Desde los pulmones las levaduras pueden producir metástasis en casi cualquier órgano del cuerpo, invadiendo preferentemente el sistema nervioso central, particularmente en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida <sup>38</sup>.

**13.4.7. *M. smegmatis*:** Saprofito ambiental. Bacteria bacilar Gram positivo, aeróbica, unicelular, de crecimiento rápido, crece en medio MacConkey sin cristal violeta y es reductora de nitratos. Hasta hace poco se ha reportado como causante de enfermedad en humanos, sobretodo en enfermedades cutáneas y lesiones titulares.

Crece a la temperatura óptima de 37 °C en 3-5 días. Esta bacteria es utilizada en estudios genéticos y bioquímicos por su desarrollo rápido en medios de cultivo sencillos sin representar un riesgo sobre la estructura y función del genoma micobacteriano.

**13.4.8. *P. aeruginosa*:** Esta bacteria se encuentra comúnmente en el suelo y el agua; bacilo Gram negativo móvil debido a la presencia de flagelos polares. Produce un pigmento amarillo verdoso llamado fluoresceína, que es fluorescente, puede oxidar el gluconato y la glucosa en medio OF (Oxidativo/Fermentativo, por lo que se llama No Fermentador), también

produce gelatinasa y arginina dihidrolasa. Necesita amoníaco como fuente de nitrógeno y es capaz de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono. Crece fácilmente en medios de cultivo estándar a temperaturas de hasta 42°C. Es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades nosocomiales, convirtiéndose en el patógeno oportunista más importante de este género. Da lugar a infecciones del tracto urinario, infecciones por quemaduras y heridas, casos de septicemia, abscesos y meningitis.

**13.4.9. *S. typhi*:** Perteneciente al género *Salmonella*, posee aproximadamente 1700 serotipos. Es el agente causal de la fiebre tifoidea. Tolera concentraciones altas de bilis, característica que contribuye a su aislamiento e identificación.

El hombre es el único hospedero conocido de *S. Typhi*. La transmisión ocurre a través de alimentos o aguas contaminadas por individuos enfermos o portadores. La infección se caracteriza clínicamente por fiebre, cefalea, letargo, anorexia y malestar general. Las complicaciones incluyen: hemorragia severa, perforación intestinal, tromboflebitis, colecistitis o formación de abscesos.

El periodo de incubación varía entre 8 y 48 horas, la duración de los síntomas oscila entre 3 y 7 días. Los casos leves se tratan con dieta y limonada alcalina, no debe usarse antidiarreicos porque pueden transformar al paciente en portador crónico de salmonelas. Los casos graves deben hospitalizarse y tratarse con rehidratación intravenosa y ocasionalmente con antibióticos.

**13.4.10. *S. aureus*:** Cocco Gram positivo, inmóvil, mide de 0.8 a 1 mm de diámetro, no forma esporas, se divide en dos planos formando racimos irregulares de células. Pocas cepas producen cápsulas que aumentan la virulencia del microorganismo. En condiciones aerobias produce catalasa. Fermenta el manitol, lo que es útil en su diferenciación de *S. epidermidis*. Al incubarse en medio rico en ácidos grasos a 37 °C produce pigmento amarillo dorado compuesto por carotenos, otra característica importante es la producción de coagulasa.

La virulencia de *S. aureus* es relativamente baja, apareciendo estafilococia grave sólo cuando disminuyen las defensas del hospedero. El rasgo característico de la infección es la formación de abscesos en cualquier parte del cuerpo. Una de las enfermedades más importantes que causa es la neumonía estafilocócica por su alta tasa de normalidad. Se encuentran habitualmente en el aire, agua y piel (especialmente en zonas con pelo o vello) y la parte alta de la figura humana.

---

Ruth Yarseny Molina Gonón  
Autora

---

Licda. Sully Cruz  
Asesora

---

Lic. Armando Cáceres  
Co - Asesor

---

Licda. Lillian Irving Antillón, M.A.  
Directora

---

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Decano