

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, likely a conquistador, holding a staff. Above him is a coat of arms with a crown and a lion. The seal is surrounded by Latin text: 'UNIVERSITAS CONSPICUA CAROLINA AC' at the top and 'CETTERA PARS COAGTEMALITENSIS' at the bottom.

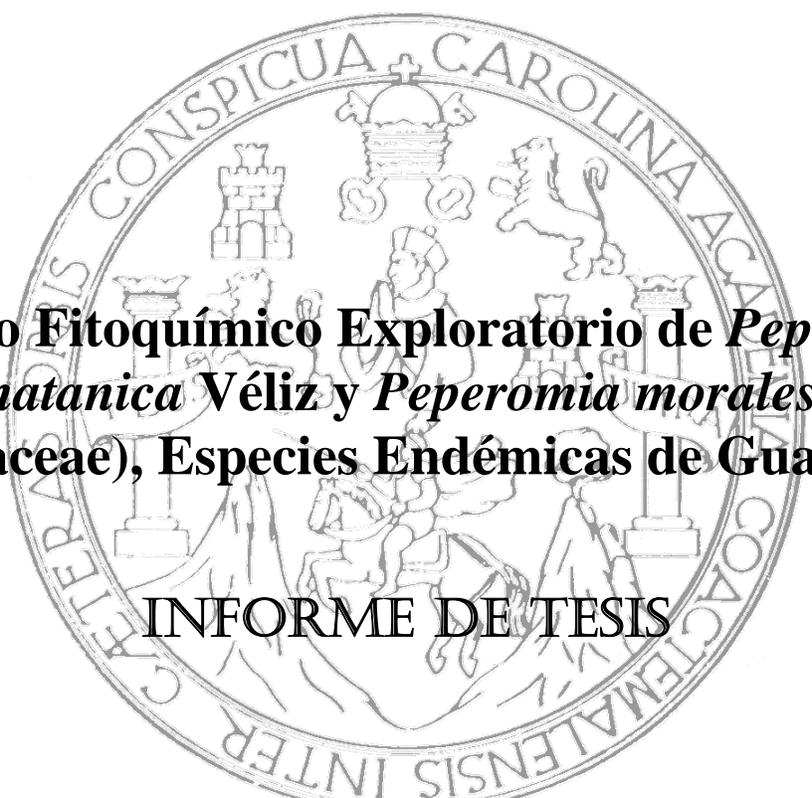
**Estudio Fitoquímico Exploratorio de *Peperomia
cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz
(Piperaceae), Especies Endémicas de Guatemala**

Ellen Yvette Aguilar Ovando

QUÍMICA

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2007

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, seated and holding a book. The figure is surrounded by various symbols, including a castle, a lion, and a cross. The Latin text "UNIVERSITAS CONSPICUA CAROLINA ACADÉMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Estudio Fitoquímico Exploratorio de *Peperomia
cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz
(Piperaceae), Especies Endémicas de Guatemala**

INFORME DE TESIS

Presentado por

Ellen Yvette Aguilar Ovando

Para optar al título de
QUÍMICA

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2007

JUNTA DIRECTIVA

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala

DECANO:	Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.
SECRETARIO:	Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto
VOCAL I:	Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.
VOCAL II:	Licda. Liliana Vides de Urizar
VOCAL III:	Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez
VOCAL IV:	Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso
VOCAL V:	Br. José Juan Vega Pérez

ACTO QUE DEDICO A

Mis padres Rommel y Ana María,
Mi hermana Krista,
Mi amigo Rodrigo,
Mis compañeros de estudios.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al Laboratorio del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas de la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala.

A la Municipalidad de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango.

A mis asesores Licda. Nohemi Orozco e Ing. Agr. Mario Véliz.

A todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	No. Pág.
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
III. Antecedentes.....	5
A. Familia Piperaceae.....	5
1. Género <i>Peperomia</i>	5
2. <i>Peperomia cuchumatánica</i> Véliz: morfología y hábitat.....	7
3. <i>Peperomia moralesii</i> Véliz: morfología y hábitat.....	8
B. Análisis de Metabolitos Secundarios en Material Vegetal.....	8
1. Técnicas Cromatográficas.....	9
2. Principales grupos de metabolitos secundarios.....	12
IV. Justificación.....	21
V. Objetivos.....	22
VI. Hipótesis.....	23
VII. Materiales y Métodos.....	24
A. Universo.....	24
B. Muestra.....	24
C. Recursos.....	24
1. Humanos.....	24
2. Materiales.....	24
D. Métodos.....	26
1. Procedimientos.....	26
2. Diseño de Investigación.....	37
VIII. Resultados.....	39
IX. Discusión de Resultados.....	44
X. Conclusiones.....	47
XI. Recomendaciones.....	48
XII. Referencias.....	49
XIII. Anexos.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

	No. Pág.
Tabla No. 1: Resultados del proceso de obtención, secado y molienda del material vegetal para los análisis de metabolitos secundarios.....	39
Tabla No. 2: Resultados de las Pruebas de Identificación de Metabolitos Secundarios en <i>Peperomia cuchumatana</i> Véliz.....	39
Tabla No. 3: Resultados de las Pruebas de Identificación de Metabolitos Secundarios en <i>Peperomia moralesii</i> Véliz.....	41
Tabla No. 4: Aceites volátiles identificados por análisis CGEM.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	No. Pág.
Figura No. 1: <i>Peperomia cuchumatana</i> Véliz.....	54
Figura No. 2: <i>Peperomia moralesii</i> Véliz.....	55
Figura No. 3: Cromatograma del aceite esencial de <i>Peperomia cuchumatana</i> Véliz.....	63
Figura No. 4: Cromatograma del aceite esencial de <i>Peperomia moralesii</i> Véliz.....	63
Figura No. 5: Meseta de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango.....	65
Figura No. 6: <i>Peperomia moralesii</i> Véliz.....	65
Figura No. 7: <i>Peperomia cuchumatana</i> Véliz.....	65
Figura No. 8: Proceso de secado de <i>Peperomia moralesii</i> Véliz.....	65
Figura No. 9: Proceso de secado de <i>Peperomia cuchumatana</i> Véliz.....	65
Figura No. 10: CCF de aceites volátiles.....	66
Figura No. 11: Ensayo de identificación de cumarinas por fluorescencia a 365 nm.....	66
Figura No. 12: Ensayos de flavonoides y antocianinas en <i>Peperomia cuchumatana</i> Véliz.....	66
Figura No. 13: Ensayos de flavonoides y antocianinas en <i>Peperomia moralesii</i> Véliz.....	66
Figura No. 14: CCF de principios amargos.....	66

I. RESUMEN

La investigación realizada es un estudio fitoquímico exploratorio a nivel cualitativo de dos especies vegetales pertenecientes al género *Peperomia*, *P. cuchumatana* Véliz y *P. moralesii* Véliz, las cuales son endémicas de Guatemala y de reciente descripción botánica.

A través de este estudio se determinó la presencia o ausencia, de diez grupos de metabolitos secundarios en ambas especies: triterpenos y esteroides, saponinas, taninos, alcaloides, aceites volátiles, flavonoides y antocianinas, antraquinonas, cumarinas, principios amargos y compuestos cardenólicos y bufadienólicos.

Para su realización se efectuó inicialmente una revisión bibliográfica sobre el género al que pertenecen estas plantas, sobre las especies analizadas y sobre estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados a otras especies del mismo género. Así mismo, se obtuvo información sobre los principales grupos de metabolitos secundarios y los ensayos para su determinación cualitativa.

Posteriormente se procedió a identificar el material vegetal *in situ* (basándose en caracteres morfológicos específicos), con asesoría del Ing. Agr. Mario Véliz, Coordinador General de la Unidad de Investigación del Herbario BIGU. El material necesario se colectó en su hábitat natural (en la meseta de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango), tras lo cual se secó y molió en condiciones de baja temperatura, para evitar la pérdida de componentes volátiles.

Finalmente se efectuaron pruebas cualitativas vía húmeda y cromatografías en capa fina acordes a cada grupo de metabolitos, además de cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas para la determinación de aceites volátiles.

Los resultados mostraron que ambas especies vegetales contienen flavonoides, cumarinas, antraquinonas, aceites volátiles y principios amargos distintos a sesquiterpenolactonas, y carecen (en concentraciones que puedan ser detectadas por los ensayos realizados) de taninos, esteroides, triterpenos, saponinas, alcaloides, compuestos cardenólicos y bufadienólicos.

Así mismo se observó que la especie *Peperomia cuchumatana* contiene un mayor número de aceites volátiles que *P. moralesii*, aunque en ambas el componente principal del aceite esencial (por su abundancia relativa) es el apiol.

Se determinó que la composición química de las especies analizadas es igual en cuanto a los grupos de metabolitos secundarios que presentan, pero difiere en los componentes específicos y sus proporciones. En relación con la composición química de otras especies del género reportadas en la literatura, las especies estudiadas presentan diferencias inclusive en los grupos de metabolitos presentes, ya que carecen de triterpenos y esteroides, componentes reportados en los documentos consultados (7,8).

II. INTRODUCCIÓN

El género *Peperomia* Ruiz & Pavon, de la familia Piperaceae, constituye un grupo grande de plantas conocidas por largo tiempo, esencialmente por aquellas especies ornamentales cultivadas comercialmente para tal fin. Además, en comunidades de países tropicales se emplean algunas especies del género en medicina tradicional, atribuyéndoseles efectos terapéuticos.

En la literatura se hallan reportados los resultados de análisis de tamizaje fitoquímico efectuados en algunas especies, tras haberse demostrado los efectos antiinflamatorio, antimicrobiano y cicatrizante de las mismas. Éstos señalan la presencia de compuestos como quinonas preniladas, esteroides, triterpenos y compuestos fenólicos, principalmente flavonoides; los cuales, se piensa, podrían explicar las actividades terapéuticas observadas. Sin embargo, aun no existen estudios concluyentes que atribuyan estas actividades terapéuticas a algún compuesto químico específico.

El proyecto de investigación que se presenta a continuación es un estudio preliminar –no experimental transeccional descriptivo– de la composición química (un tamizaje fitoquímico) en dos especies endémicas locales de Guatemala recientemente descritas, *Peperomia cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz. Debido a su reciente descubrimiento, aún no se les ha efectuado esta clase de estudio, con el que se podría determinar alguna utilidad particular en ellas, probablemente relacionada con las presentes en otras especies del género *Peperomia* ya conocidas, que brinde elementos que justifiquen su conservación, manejo y aprovechamiento racional.

Al mismo tiempo esta investigación contribuye al objetivo principal del Herbario BIGU, que consiste en el estudio y documentación de la diversidad florística de Guatemala, y al enriquecimiento de la base de datos de especies representativas de la flora de la región mesoamericana.

Para tal fin, se identificaron (basándose en caracteres morfológicos específicos) y colectaron ambas especies en su hábitat natural. Posteriormente se secaron y molieron todas las partes aéreas y raíz de las plantas.

Finalmente, se procedió al desarrollo de pruebas y análisis específicos (vía húmeda y por cromatografía en capa fina y de gases) para cada grupo de metabolitos secundarios

seleccionado, de acuerdo a la metodología descrita en el Manual de Operaciones de Tamizaje Fitoquímico del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales – LIPRONAT–, versión 2005. Los grupos investigados fueron: esteroides o triterpenoides, saponinas, aceites volátiles, alcaloides, flavonoides y antocianinas, antraquinonas, cumarinas, principios amargos y compuestos cardenólidos y bufadienólidos.

III. ANTECEDENTES

A. Familia Piperaceae

La familia Piperaceae pertenece a la División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Subclase Hamamelidae y Orden Piperales. Comprende 10 géneros, con aproximadamente 2000 especies, de las cuales, la gran mayoría pertenecen a cuatro géneros: *Piper*, *Peperomia*, *Lepianthes* y *Sarcorrhachis*. (1,2)

Los dos primeros son los más abundantes y al mismo tiempo, conocidos por su importancia a nivel económico, ya que al género *Piper* (que comprende cerca de 700 especies) pertenecen *Piper nigrum*, *P. officinarum*, *P. longum* y *P. cubeba* de las que se obtienen los distintos tipos de pimienta; mientras que al género *Peperomia* pertenecen muchas especies ornamentales. (1,2)

La familia está conformada por especies leñosas (pequeños arbustos aromáticos del género *Piper*), y herbáceas (del género *Peperomia*) de las regiones tropicales y subtropicales. Menos a menudo, se encuentran como arbustos o árboles y algunas veces lianas o epifitos¹. (2)

Poseen hojas alternas, raramente verticiladas, con o sin estípulas² y frecuentemente con epidermis más o menos silicificada. (2,3)

1. Género *Peperomia*:

Peperomia fue publicado como un género en 1794, por los españoles Hipólito Ruiz y Joseph Pavon, exploradores pioneros en Perú y Chile, quienes la asociaron con el género *Piper* (*Peperomia* proviene del griego *peperi*, pimienta, y *homoios*, parecido a) por su parecido a *Piper nigrum*. (4)

a) Descripción Botánica:

Pequeñas en su mayoría, hierbas perennes o raramente anuales, de erectas a postradas, generalmente epifitas y raramente terrestres; de hojas opuestas o verticiladas, usualmente gruesas y suculentas; flores muy pequeñas, verdes, en delgadas espigas solitarias o en grupos con brácteas³ orbiculares o elípticas; 2 estambres de filamentos cortos o ligeramente más largos que las brácteas; anteras oblongas-transversas o subglobosas; ovario

¹ Ver Anexo 1, página 52

sésil o contraído en su base, obtuso en el ápice; estigma no dividido, generalmente penicilado, terminal o lateral cerca del ápice; un óvulo, erecto a partir de la base de la célula; fruto diminuto con pericarpio delgado, casi seco y endospermo harinoso. (5)

b) Hábitat y Agricultura:

El género comprende unas 1,000 especies distribuidas por los trópicos y subtropicos de América. Todas se multiplican por esquejes, división de matas y por medio de hojas con un pequeño trozo de pecíolo. La utilización de calor de fondo es adecuada. En general requieren sustratos bien drenados y temperatura y humedad alta para un crecimiento adecuado. Les perjudican los riegos con aguas salinas. Soportan condiciones de luz algo bajas, aunque las especies o variedades matizadas son más exigentes en este aspecto. Son plantas cultivadas en maceta, generalmente en interiores. (6)

c) Usos Medicinales Atribuidos:

Las plantas del género *Peperomia*, son de uso frecuente como remedios tradicionales en algunas comunidades de distintos países, según su distribución. La literatura menciona sus efectos antiinflamatorio, cicatrizante, antiparasitario, y tranquilizante.

Por ejemplo, en la sierra norte del Perú se emplea el tallo subterráneo (cormo), molido y con agua, de *Peperomia scutellaefolia* R. et P., por aplicación tópica o por ingestión, para curar males cardíacos, úlceras estomacales y heridas externas de la piel. En la misma área también se reporta el uso de *P. galioides* Kunth, *P. nivalis* Miq., *P. flavamenta* Trel., *P. sp.*, *P. inaequalifolia*, *P. rubioides*, *P. verticillata* Dietr., *P. microphylla* H.B.K., *P. rotundata* H.B.K., y *P. scutellaefolia* R. et P. (7)

En Trinidad se emplean infusiones de *Peperomia emarginella* y *P. pellucida* como remedio para resfríos, influenza y fiebres. La primera, seca, se fuma para aliviar el asma.

En las Indias Occidentales Francesas se emplea *Peperomia glabella* como diurético y sudorífico, mientras que en Colombia se usa para tratar la conjuntivitis.

En Cobán, Guatemala, *Peperomia maculosa* y otras especies no identificadas se emplean para tratar indigestiones, dolores de estómago y en forma tópica como desinflamantes. *P. reflexa* se aplica machacada para aliviar dermatitis.

En las islas Guadalupe y Martinica *Peperomia trifolia*, *P. balbisii*, *P. humilis*, *P. vernouana*, *P. tenella* y *P. emarginella* son reconocidas como sudoríficos y empleadas en el tratamiento de malaria, otras fiebres y bronquitis. (8)

d) Composición Química Conocida y Farmacognosia:

Han sido demostrados los efectos: antiinflamatorio, antimicrobiano y cicatrizante, en algunas especies, pero aun no existen estudios concluyentes que atribuyan estas actividades terapéuticas a algún compuesto químico específico. Sin embargo, algunas podrían explicarse con la presencia de compuestos como: proctoriones (2-acilciclohexano-1,3-diona), quinonas preniladas, esteroides, triterpenos y compuestos fenólicos, principalmente flavonoides; reportados en especies como: *Peperomia proctorii*, *P. flavamenta* Trel., *P. galioides* Kunth, entre otras.

En particular, el efecto cicatrizante podría deberse a la presencia de flavonoides, como indican estudios realizados sobre la actividad cicatrizante de *Peperomia galioides* Kunth. (7)

2. *Peperomia cuchumatana* Véliz: morfología y hábitat

Hierba pequeña acaulescente⁴, de hasta 3 cm de alto, cuyas hojas crecen a partir del ápice de un corno globuloso de 0.5-2.5 cm de diámetro, ligeramente púrpura, en cuya base se originan numerosas raíces fibrosas. De pecíolos delgados (1 mm de diámetro), hipogeos, glabros, de 0.5-2.6 cm de largo; hojas orbiculadas u ovaladas-orbiculadas, acetabuladas⁵, de 2-8 mm de largo y 2-6 mm de ancho, con ápice obtuso, base redondeada, carnosas, glabras, peltadas⁶ a ¼ de la base, sin venación, color verde oscuro en el haz y verde amarillento en el envés. Inflorescencias como espigas simples, pauciflora, 11-29 mm de largo, 5-9 flores, brácteas ovaladas, glabras, peltadas cerca de la base, 0.4-0.5 mm de largo, filamentos o estambres que alcanzan los 0.3 mm de largo, anteras de hasta 0.2

mm, más anchas que largas, pistilos sésiles en depresiones del raquis, estrechamente ovoides, glabros; estigma sésil; frutos globosos-ovoides, negros, verrugosos, de hasta 1 mm. (Ver esquema en Anexo 2)

Florece de Julio a Septiembre. Se le encuentra a 3,600 msnm, en la pradera sub-alpínica al noroeste del Municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, Guatemala. Crece sobre suelo arcilloso, rico en piedra caliza cretácica y cuaternaria, acompañado de musgo. Se conocen, a la fecha, dentro del área cuatro localidades en las que se distribuye. (9)

3. *Peperomia moralesii* Véliz: morfología y hábitat

Hierba acaulescente de 8 a 20 cm de alto que se desarrolla a partir de rizomas tuberosos blancos de 2 a 7 cm de largo y 8-12 mm de diámetro, de los que derivan abundantes raíces fibrosas. Presenta 2-6 pecíolos frágiles de 5 a 20 cm de largo y 1 mm de diámetro; hojas orbiculares, carnosas y peltadas en la región media, de 1.5 a 4 cm de diámetro y 7-9 nerviaciones. Inflorescencias en espiga simple de 12 a 25 cm de largo con brácteas florales glabras de 1.4 mm de largo y 1 mm de diámetro, ovalmente lobuladas y apiculadas en el ápice; los filamentos del estambre miden 3 mm de largo y las anteras 0.3 mm de largo y 0.27 mm de ancho; los pistilos surgen de depresiones del raquis. Presenta ovario subsésil⁷, persistente y ligeramente verrugoso; estigma cónico y frutos ovoides de color verde oscuro de 1 mm de longitud. (Ver esquema en Anexo 2)

Florece de junio a septiembre. Crece a 3,700 msnm en suelo negro poco profundo y rocas, acompañado de hongos y musgo, bajo la protección de *Juniperus standleyi* (árbol) y *Abies guatemalensis* (árbol), en bosques de estas especies al noroeste del Municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, Guatemala. A la fecha, sólo se conocen dentro del área dos localidades en las que se distribuye. (9)

B. Análisis de Metabolitos Secundarios en Material Vegetal

Los *metabolitos secundarios* son todas aquellas sustancias que se producen en un organismo a partir de los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos), con funciones varias específicas y propias de los organismos en los que se encuentran. (10)

La importancia terapéutica de las plantas radica en la presencia de familias de compuestos químicos que poseen propiedades farmacológicas variadas, en las que se reconocen compuestos individuales conocidos como *principios activos*. (11)

El *tamizaje fitoquímico* es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos (metabolitos secundarios fundamentalmente) presentes en una planta, y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de los componentes químicos de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración que permitan la evaluación rápida, sensible, reproducible y de bajo costo de los mismos. Así mismo, puede hacer uso del análisis por cromatografía en capa fina. (12)

1. Técnicas cromatográficas:

a) Cromatografía en Capa Fina (CCF):

El análisis por *cromatografía en capa fina (CCF)* consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una *cromatoplaça*. Ésta se encuentra constituida por un adsorbente retenido sobre una superficie plana, sobre la que se aplica una disolución de la muestra a analizar mediante un capilar, a una distancia aproximada de 1 cm del borde inferior. El adsorbente o *fase estacionaria* (agua sobre sílica o alúmina, etc.) es típicamente polar, inerte a los disolventes apolares (*eluentes*) que suelen emplearse como *fase móvil*. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente sube por capilaridad en la placa, separando los diversos componentes de la muestra, de acuerdo a la afinidad que cada uno presente hacia las fases estacionaria y móvil. Al llegar el disolvente a aproximadamente 1 cm del borde superior de la placa, ésta se saca de la cromatocámara, se deja evaporar el eluyente y la placa se analiza utilizando luz ultravioleta o luz visible, o aplicando reactivos que dan como resultado

reacciones de coloración específicas con las sustancias contenidas en la mezcla analizada. (12)

b) Cromatografía de Gases (CG):

También es posible el empleo de otras técnicas de análisis más avanzadas como la cromatografía de gases y la cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas, que permiten la separación e identificación de componentes en mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. (13)

La *cromatografía de gases (CG)* es una técnica de separación en la que una cantidad muy pequeña de muestra líquida (en el orden de microlitros) se volatiliza térmicamente y se inyecta en la cabeza de una columna capilar (con diámetro interno de unas pocas décimas de milímetro y 2-50 metros de largo), que separa los componentes de acuerdo a sus distintas afinidades con la fase estacionaria, mientras es arrastrada hacia un detector por un gas inerte (He, Ar, CO₂, N₂, H₂) que no interacciona con ella. (13)

La columna contiene un recubrimiento interno de una fase líquida impregnada sobre la pared del capilar, o bien, sobre la superficie de un sólido inerte (como tierra de diatomeas). Se encuentra dentro de un horno que la mantiene a una temperatura igual o ligeramente superior al punto de ebullición promedio de los componentes de la muestra. Sin embargo, cuando éstos presentan un amplio intervalo de ebullición, se emplea un *programa o rampa de temperaturas* específico, para mejorar la separación. (13)

El detector puede ser de varios tipos (Detector de Ionización de Llama, de Conductividad Térmica, de Quimioluminiscencia del Azufre, de Captura de Electrones, etc.), pero en general, todos brindan información cualitativa y cuantitativa en forma de una gráfica de *tiempo (o volumen) de retención* de cada componente contra alturas de pico relativas a su abundancia dentro de la muestra, el cual se denomina *cromatograma*. Éste es único para cada compuesto bajo condiciones determinadas (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), de tal forma que si se poseen estándares, es posible identificar los componentes en una muestra. (13)

Esta limitación con respecto a la identificación ha hecho que se combinen la eficiencia en la separación de la CG con la capacidad analítica de técnicas espectroscópicas como la *espectroscopia de masas (EM)*.

Esta técnica, en sus distintas modalidades, es capaz de proporcionar información muy amplia sobre una muestra: 1) composición elemental; 2) estructura de moléculas orgánicas y biológicas; 3) composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas; y 4) relaciones isotópicas de átomos en las muestras. (13)

En general, el equipo consta de un sistema de entrada en el que la muestra se volatiliza (o entra en ese estado si proviene de un cromatógrafo de gases); un sistema de ionización que fragmenta la muestra en su *ion molecular* (ion radical con el mismo peso molecular que la molécula neutra original) y otros menores; un analizador de masas que separa los componentes de acuerdo a su relación masa-carga, con ayuda de la aplicación de un campo magnético; y un detector que mide la abundancia relativa de fragmentos de cada masa (comúnmente un multiplicador de electrones). (13)

Todos los componentes requieren mantenerse a alto vacío, debido a que las partículas cargadas que se generan interaccionan con los componentes de la atmósfera y como consecuencia son destruidos.

Las fuentes de ionización, de acuerdo a la cantidad de energía que transmiten a la molécula y el efecto que causan sobre ella, pueden ser *duras* (de alta energía que deja a la molécula en un estado excitado, cuya relajación implica la rotura de numerosos enlaces, ocasionando un gran número de iones fragmentados) o *blandas* (de menor energía, que produce escasa fragmentación). Dentro de estas categorías se encuentran varios diseños, como: Impacto de Electrones, Ionización Química, Ionización por Campo, Termonebulización, Bombardeo de Átomos Rápidos, etc.). (13)

El analizador de masas aplica un campo magnético que atrae a cada uno de los iones con la misma fuerza (suponiendo carga idéntica) y los desvía sobre un detector. Los iones más ligeros se desviarán más que los iones pesados porque la fuerza aplicada a cada ion es igual pero los iones ligeros tienen menos masa. El detector mide exactamente cuán lejos se ha desviado

cada ion y, a partir de ese, dato se calcula el "cociente masa por unidad de carga". Con esta información es posible determinar con un alto nivel de certeza cuál es la composición química de la muestra original. (13)

2. Principales grupos de metabolitos secundarios:

La lista de grupos de metabolitos secundarios conocida es larga y variada, de acuerdo a las distintas clasificaciones que se han hecho de los mismos. Por ello, a continuación se presentan únicamente los grupos más comunes, y aquellos que se consideran fundamentales para la investigación, basándose en los resultados de estudios de tamizaje fitoquímico que se han efectuado en otras especies del género *Peperomia*.

a) Esteroides y Triterpenoides:

(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, incisos a y b)

Los terpenoides y esteroides constituyen el más amplio conjunto conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. Los triterpenos son específicos del reino vegetal, mientras que los esteroides pueden encontrarse en animales. Tanto los triterpenos como los esteroides vegetales, proceden –vía escualeno– del mevalonato, aunque el mecanismo de formación es ligeramente distinto. (14)

Los triterpenos, 4,000 compuestos basados en más de 40 esqueletos diferentes, son compuestos de 6 unidades isoprénicas (30 átomos de carbono), procedentes de la ciclación del 3S-2,3-epoxi-2,3-dihidroescualeno o, más raramente, del mismo escualeno. Casi siempre están hidroxilados en C-3 debido a la apertura del epóxido. Los triterpenos presentan una gran unidad estructural, las principales diferencias se deben a su configuración y van unidas a la conformación adoptada por el epoxiescualeno (o el ecualeno) antes de la ciclación, así como a los desplazamientos 1,2 de protones y de metilos que justifican la existencia de los diferentes esqueletos tetra- y pentacíclicos que caracterizan este grupo.

La unidad estructural también es muy marcada en los esteroides: compuestos tan diferentes en cuanto a sus propiedades como los fitosteroles, saponósidos, ecdisteroides, glicósidos cardiotónicos o alcalinas esteroídicas, tienen todos el mismo esqueleto básico. (14)

No existen diferencias fundamentales entre triterpenos y esteroides, éstos últimos pueden ser considerados como triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo, tres metilos. Inicialmente la presencia de metilos en C-4 y C-14 sirvió para distinguirlos.

El interés terapéutico y empleo industrial de ambos grupos hace que posean gran importancia: como heterósidos cardiotónicos (que aún no han podido ser sustituidos por ningún producto sintético); como saponinas espirostánicas, del sitosterol o estigmasterol que son materias primas en procesos biotecnológicos en la industria farmacéutica de medicamentos esteroídicos (anticonceptivos, anabolizantes, antiinflamatorios); como componentes del regaliz ("Orozuz"), edulcorante poco calórico usado en la industria agroalimentaria y como antitusivo, extraído de *Glycyrrhiza glabra*; y otros. (14)

Tanto triterpenoides como esteroides pueden investigarse mediante las pruebas de color vía húmeda de Liebermann Burchard, ácido tricloroacético y Carr-Price. (12)

b) Saponinas: (ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso c)

Las saponinas son glicósidos esteroides con un núcleo espiroetano que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas. La porción esteroide de las saponinas esteroides (también denominada saponina o aglicona esteroide) se origina por la ruta de la acetil-Coenzima vía ácido mevalónico y escualeno. Como O-glicósidos, las saponinas esteroides se hidrolizan fácilmente en medio ácido o enzimáticamente. (14)

Se encuentran principalmente en varias familias de la clase Monocotiledónea, como son: Liliaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae (Agavaceae). En las dicotiledóneas, se las ha encontrado en las familias Solanaceae y Scrofulariaceae.

Aunque algunas han mostrado diversas actividades biológicas (antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, ictiotóxica, molusquicida, insecticida, antihelmíntica, expectorante, diurética, cardiovascular, antiinflamatoria, anti-úlceras, espermicida, analgésica, antipirética, sedante, antihepatotóxica,

hemolítica, antimicótica, etc.), fundamentalmente se han constituido desde hace bastante tiempo, como precursores únicos de muchos medicamentos esteroides tales como hormonas sexuales, corticoides, anticonceptivos orales y diuréticos. La producción industrial de estas sustancias requiere una serie de procesos microbiológicos de fermentación y una serie de conversiones químicas relativamente complejas y en su gran mayoría patentadas por los grandes laboratorios farmacéuticos. (14, 15)

Las saponinas pueden investigarse mediante prueba de espuma, prueba de hemólisis y cromatografía en capa fina. (11)

c) Taninos: *(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso d)*

Antiguamente utilizados como colorantes de pieles y alimentos, son el resultado de la combinación de un fenol y un azúcar. Tienen gusto amargo y suelen acumularse en las raíces, cortezas y en menor medida en las hojas. Suelen tener varios usos: la precipitación de la gelatina y otras proteínas sirve para clarificar el vino y para el curtido de pieles (los taninos se intercalan entre las fibras de colágeno, estableciendo uniones que permiten crear una gran resistencia frente al agua y el calor, haciendo que la piel se convierta en cuero). Su poder astringente los hace aptos para la cicatrización de heridas, sobre todo administrados en forma de cataplasmas. Asimismo la precipitación de los alcaloides tras un envenenamiento atenúa la toxicidad. Estas virtudes se deben a la propiedad que tienen de combinarse a otras sustancias (proteínas, fibras, alcaloides, gelatinas, etc.), para originar reacciones fenólicas. Las plantas que tienen taninos y esencias (salvia, menta) son muy útiles como antisépticos (bactericidas, bacteriostáticos y antifúngicos), antiinflamatorios en casos de bronquitis, hemorroides, sabañones, etc., antidiarreicos, cicatrizantes, hemostáticos⁸, antídotos de intoxicaciones por metales pesados y alcaloides, reepitelizantes (en uso externo impermeabilizan, protegen y reepitelizan pieles dañadas), antioxidantes, hipocolesterolemiantes, protectores de la pared vascular y antinutrientes (por precipitar o inhibir enzimas digestivas). (10, 14)

Entre las especies ricas en taninos se encuentran: culantrillo, pie de león, euphrasia, roble, castaño, encina, té común, arándano, zarzamora, etc. (10)

Se investigan por precipitación de proteínas y prueba con FeCl_3 . (12)

d) Aceites Volátiles: *(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso e)*

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica (como perfumes, aromatizantes, condimentos y saborizantes). Generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. (14)

Se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia (fluidos, bálsamos y oleorresinas), origen (naturales, artificiales y sintéticas) y naturaleza química de los componentes mayoritarios (monoterpenoides, sesquiterpenoides, fenilpropanoides). (14)

Se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes partes de unas 60 familias de plantas. Aunque se les encuentra en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal.

Se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: extrusión⁹, destilación con vapor de agua, extracción con disolventes volátiles, enfleurage¹⁰ y con fluidos supercríticos. (16)

Los aceites volátiles se investigan mediante técnicas cromatográficas, siendo la más adecuada la cromatografía de gases, que permite establecer el perfil de constituyentes de un aceite en particular. La cromatografía en capa fina suele emplearse de forma rutinaria para el control de calidad de aceites esenciales, sin embargo, resulta insuficiente para la resolución definitiva de una mezcla. (14)

e) Flavonoides y Antocianinas:

(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, incisos f y g)

Son pigmentos casi universales en los vegetales, casi siempre hidrosolubles, responsables de la coloración de flores, frutos y a veces hojas.

Entre ellos, el grupo de los antocianósidos brinda coloraciones rojas, azules y violetas. (11)

Todos poseen un origen biosintético común y un elemento estructural básico, un encadenamiento 2-fenilcrománico. (14) Se clasifican, según la estructura química de la cadena intermedia, como: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavandioles (leucoantocianos), antocianos, chalconas y uronas.

Sus propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado, así como de su forma (libre, glicósido, dímero, polímero o sulfato). (11)

Se encuentran ampliamente distribuidos en plantas verdes (especialmente angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se encuentran principalmente en las partes aéreas de las plantas. Las antocianinas se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo al violeta-azul. Muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal. (11)

Se les considera “venoactivos”, es decir, ser capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentar su resistencia; así como inhibidores enzimáticos, antiinflamatorios, antibacteriales y antivirales.

Sirven a la planta como filtros solares, atractores de polinizadores y como protección contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales (es decir, actúan como fitoalexinas). (11)

Se extraen con el uso de diferentes disolventes (agua, etanol caliente, acetona, éter de petróleo, etc.) y se analizan por técnicas cromatográficas. (14)

f) Alcaloides: *(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso h)*

Son sustancias orgánicas de origen vegetal con actividad fisiológica (sobre el sistema nervioso central) muy intensa y más o menos tóxica en dosis pequeñas. Contienen nitrógeno en sus moléculas y con frecuencia se presentan combinados con ácidos orgánicos o taninos. Representan entre el 0.1-3% del peso seco de la planta. (11)

Actualmente se conocen más de 4,000 alcaloides, aunque su presencia probablemente quede reducida a menos del 10% de las especies botánicas. Su función es reguladora y protegen a las plantas contra insectos y parásitos.

Son sintetizadas en plantas partiendo de aminoácidos y derivados inmediatos. Pueden ser sólidos, solubles en alcohol o insolubles en agua. Se extraen con agua, alcohol, álcalis y disolventes orgánicos apolares.

En medicina, farmacología y fitoterapia se emplean en estado puro o por quimiosíntesis como drogas vegetales (como la quinina y la morfina), y en la industria de café y de bebidas refrescantes. (11)

Se investigan cualitativamente mediante reacciones de color y precipitación con reactivos de Mayer, Dragendorff y Wagner, así como mediante técnicas cromatográficas. (12)

g) Antraquinonas: *(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso i)*

Metabolitos con funcionalidad p -quinoide en un núcleo antracénico, biosintetizados, en el caso de hongos, líquenes y plantas superiores de las familias Ramnaceae, Poligonaceae y Leguminosae, por la ruta de la malonil-CoA; y en el caso de las Rubiaceae, Gesneriaceae, Escrofulariaceae, Verbenaceae y Bifnoniaceae, a partir del ácido shikímico y ácido mevalónico.

Presentan generalmente grupos –OH en C-1 y C-8, un grupo metilo, hidroximetileno o carboxilo sobre C-3 y un grupo –OH o –OMe sobre C-6.

Están ampliamente distribuidas en todos los reinos. En el vegetal, se les encuentra en hojas, tallos, madera y frutos, principalmente en forma de glicósidos, y en menor proporción, en forma libre o agliconas. Algunas plantas ricas en antraquinonas son el aloe (*Aloe barbadensis*, *A. capensis*), sen (*Cassia senna*, *C. angustifolia*), riubarbo (*Rheum palmatum*) y caña fístula (*Cassia fistula*). (11)

Según la dosis, tienen acciones variables como colagogos¹¹, laxantes o purgantes. (11)

Se investigan mediante reacciones de color como Bornträger y Bornträger Modificado, así como mediante técnicas cromatográficas. (12)

h) Cumarinas: *(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso j)*

Son 2H-1-benzopirán-2-onas que se pueden considerar lactonas de los ácidos 2-hidroxi-Z-cinámicos. Son abundantes y ampliamente distribuidas en el reino vegetal (especialmente en material seco), habiéndose descrito más de

un millar de ellas. La gran mayoría se hayan sustituidas en C-7 por un hidroxilo. (14)

Al igual que otros derivados fenilpropánicos, proceden del metabolismo de la fenilalanina, por la vía del ácido 4-cumárico, un ácido cinámico. Se clasifican en hidroxí o metoxi cumarinas, cumarinas isoprenílicas, piranocumarinas y furanocumarinas. (11)

Las cumarinas libres son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos como dióxido de etilo y disolventes clorados con los cuales pueden ser extraídas. Los heterósidos¹² son más o menos solubles en agua. Para su purificación se pueden aplicar las propiedades específicas de las lactonas: apertura y solubilización en medio alcalino, cierre en medio ácido. También es posible en algunos casos recurrir a la sublimación. Cuando varias presentan estructuras similares, se recurre a la electroforesis capilar. Poseen un espectro UV característico. (11)

El interés farmacológico de las drogas con cumarinas es limitado: algunas como venotónicos¹³ y protectores vasculares, otras como fotosensibilizantes empleados en el tratamiento de psoriasis. (11)

i) Principios Amargos: *(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso k)*

Constituyen un grupo numéricamente importante de sustancias (alrededor de 3,000), característicamente amargas. La mayoría de los principios amargos que se encuentran en drogas oficinales, son estructuralmente terpenoides, principalmente iridoides glicosilados (ciclopentan-[c]-piran-monoterpenoides derivados biosintéticamente del monoterpeneo geraniol, responsables de actividad antiinflamatoria, analgésica, estimulante de secreciones gástricas y antiarrítmica), secoiridoides (iridoides de estructura abierta), sesqui-, di- y triterpenos, neuroleninas, y fundamentalmente lactonas terpénicas, a las que deben su sabor. (14)

Entre ellas, las más comunes y estudiadas son las lactonas sesquiterpénicas, que se originan del producto de ciclación, ciclodecadienílico, del 2E,6E-farnesil-pirofosfato, el catión germacradieno, el cual se lactoniza formando el germacránólido, esqueleto base del cual

se derivan los principales grupos de sesquiterpenolactonas (pseudoguayanólidos, elemanólidos, guayanólidos, eudesmanólidos y eremofilanólidos). (14)

Poseen diferentes actividades farmacológicas: antiinflamatoria, antimicrobiana, antimigrañosa, etc., sin embargo, son también causantes de procesos alérgicos (principalmente dermatitis de contacto) y algunas causan convulsiones, por lo cual la terapéutica actual rara vez utiliza drogas que las contengan. (14)

Se encuentran en hongos y Briofitas, así como en algunas Angiospermas de las familias Asteraceae (especialmente la *Artemisia annua*, que se emplea en el tratamiento de malaria, *Neurolaena lobata*, rica en neuroleninas, y *Arnica montana*), Lauraceae, Menispermaceae, Apiaceae y Magnoliaceae.

No existe un método específico de extracción, pero se las puede obtener con diclorometano o una mezcla de éter dietílico-éter de petróleo-metanol, para luego fraccionar los extractos mediante cromatografía. (14)

Las sesquiterpenolactonas pueden investigarse por las pruebas de coloración de Legal y Baljet. (12)

j) Cardenólicos y Bufadienílicos:

(ver esqueleto base generalizado en Anexo 3, inciso l)

Heterósidos vegetales que actúan directamente sobre el músculo cardíaco, son compuestos de estructura sumamente homogénea, formados por una *genina* esteroídica (núcleo tetracíclico con encadenamiento *cis-trans-cis* típico de los esteroides, o raramente *trans-trans-cis*) y una parte *osídica*. (14)

La genina se caracterizan por poseer, en el C-17 del núcleo esteroideo, un anillo de lactona α,β -insaturado en orientación β , y sustituyentes hidroxilo en C-3 y C-14. Derivan del ácido mevalónico, pero el final de las moléculas procede de la condensación de un esteroide C-2, con una unidad C-2 o C-3. (14)

La parte osídica está conformada generalmente por azúcares muy específicos como 2,6-didesoxihexosas (como la D-digitoxosa) y 2,6-didesoxi-3-metilhexosas (como la L-oleandrosa o la D-diginosa); aunque

también es posible encontrar 6-desoxihexosas (L-ramnosa, D-fucosa), 6-desoxi-3-metilhexosas (D-digitalosa) y glucosa. El azúcar se encuentra habitualmente unida a la genina mediante el hidroxilo en C-3, y en la mayoría de los casos no es solo una osa, sino un oligosacárido de 2 a 4 osas, en las que si existe glucosa, se encuentra en posición terminal.

Dependiendo del tamaño del ciclo lactónico se les clasifica en: *Cardenólidos*, con γ -lactona α,β -insaturada (anillo pentacíclico); y *Bufadienólidos*, con δ -lactona di-insaturada (anillo hexacíclico), frecuentemente con sustituyentes metilos, hidroximetilos o grupos aldehído en C-10 y C-13. (14)

En general son sólidos cristalizables solubles en agua y poco solubles en alcoholes y cloroformo, aunque esta solubilidad depende de la naturaleza de la aglicona y de la cadena de azúcares (que brinda mayor solubilidad a medida que crece). (14)

Las drogas con cardiotónicos son muy tóxicas y pueden acumularse. A dosis terapéuticas refuerzan el tono y disminuyen la frecuencia cardiaca, por lo que se emplean para el control de arritmias cardiacas. A dosis altas aumenta las alteraciones del ritmo y provocan fibrilación. (14)

Los heterósidos cardiacos presentes en las plantas parecen estar limitados a las, Angiospermas. Los cardenólidos son los más comunes y abundan particularmente en Apocynaceae y Asclepiadaceae. Existen bufanólidos en algunas Liliaceae y en algunas Ranunculaceae. También se encuentran estos compuestos en los venenos de sapo.

Se estudian mediante reacciones de color como la reacción de Pesez, y la de Keller-Killiani para 2,6-didesoxihexosas, y las de Kedde y Baljet para γ -lactonas α,β -insaturadas. (14)

IV. JUSTIFICACIÓN

Comparados con los caracteres morfológicos, los componentes fitoquímicos son definidos con mayor precisión y son característicos, hasta cierto punto, para cada grupo de especies vegetales, de manera que resultan útiles en la clasificación definitiva de nuevas especies. Al mismo tiempo, la composición química de cada planta le brinda un conjunto de características particulares que pueden hacerla destacar entre otras, por su utilidad.

En el presente estudio se plantea el análisis de la composición química, mediante tamizaje fitoquímico, de dos especies nuevas para la ciencia, pertenecientes a la familia Piperaceae (conocida por la importancia económica de algunas especies de los géneros *Piper* –de las que se extrae la pimienta–, y *Peperomia* –de uso ornamental–), *Peperomia cuchumatana* y *Peperomia moralesii*.

Es importante efectuar su estudio fitoquímico completo en vista de que son especies endémicas locales de Guatemala recientemente descritas, que aún no cuentan con esta clase de análisis, y en las cuales cabe la posibilidad de intuir, mediante el análisis de su composición, alguna utilidad particular derivada de ésta (probablemente relacionada con las que tienen otras especies ya conocidas, como *Peperomia. scutellaefolia*, *P. galioides* y *P. angustifolium*, que presentan efectos antiinflamatorio, antimicrobiano y cicatrizante, que se atribuyen a su contenido de flavonoides, alcaloides y quinonas, entre otros) que brinde elementos que justifiquen su conservación, manejo y aprovechamiento racional.

Esta investigación contribuirá a un proyecto más amplio: el estudio de la diversidad florística de Guatemala a través del análisis taxonómico de las especies vegetales. Al mismo tiempo, ayuda al enriquecimiento del banco de datos de especies tipificadas representativas de la flora de la región, que acompaña a la colección de referencia más amplia con que se cuenta hoy día en el país. Ambos son objetivos principales de la Unidad de Investigación del Herbario BIGU de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

V. OBJETIVO

- Determinar cualitativamente: saponinas, aceites volátiles, alcaloides, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, principios amargos, esteroides y triterpenoides, presentes en las especies vegetales guatemaltecas *Peperomia cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz, mediante tamizaje fitoquímico.

VI. HIPÓTESIS

La investigación no contará con ninguna hipótesis, debido a que se tratará de un estudio descriptivo, en el cual, por tratarse del análisis químico de dos especies totalmente nuevas (recién descubiertas), se carece de cualquier clase de antecedentes que permitan formular una hipótesis que pueda comprobarse con el estudio que se plantea realizar.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo: las especies vegetales guatemaltecas *Peperomia cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz.

B. Muestra: 50 g de material vegetal seco de cada especie (provenientes de todas las partes aéreas y raíz de las plantas) que se emplearán para efectuar los análisis de metabolitos secundarios.

C. Recursos

1. Humanos:

- Tesista: Br. Ellen Yvette Aguilar Ovando
- Asesores: Licda. Noemí Orozco
Ing. Agr. Mario Véliz

2. Materiales:

a) Equipo:

- Plancha de calentamiento con agitador magnético.
- Horno eléctrico L-C, Lab-Line Instrument, Inc.
- Rotavapor Büchi 461
- Balanza semianalítica Ohaus (modelo Scout II), de 0-250 g.
- Cromatógrafo de gases Agilent 6890N con divisor de flujo y columna HP-5MS de 30m X 0.25mm de diámetro interno.
- Detector selectivo de masas Agilent 5973N acoplado al cromatógrafo.
- Biblioteca de referencia de espectros de masa NIST 98.
- Lámpara de ultravioleta (UV) con longitudes de onda de 254 y 365 nm.
- Equipo de seguridad personal (bata, guantes, lentes y mascarilla para gases).

b) Reactivos:

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| - Ácido Sulfúrico | - Ácido Bórico |
| - Ácido Acético Glacial | - Anhídrido Acético |
| - Ácido Clorhídrico | - Cloroformo |
| - Ácido Tricloroacético | - Diclorometano |

- Etanol
- Metanol
- *n*-Butanol
- Tolueno
- Hexano
- Acetato de Etilo
- Éter de Petróleo
- Benceno
- Amonio
- Yodo sólido
- Tricloruro de Antimonio
- Nitrato Básico de Bismuto
- Yoduro de Potasio
- Nitroprusiato de Sodio
- Cloruro de Mercurio (II)
- Ácido 3,5-dinitrobenzoico
- Cloruro de Sodio
- Sulfato de Sodio Anhidro
- 4-hidroxibenzaldehído
- Anisaldehído
- Hidróxido de Amonio
- Hidróxido de Potasio
- Cloruro Férrico
- Gelatina
- Dietilamina
- Peróxido de Hidrógeno
- Agar sangre
- Magnesio metálico en polvo

–*Todos Grado Reactivo, en vista de que se utilizarán para análisis cualitativo.* –

- Estándares:
 - Para alcaloides: atropina, papaverina (1% p/p en metanol).
 - Para flavonoides y antocianinas: ácido cafeico, kaempferol, hidrato de quercitrina, quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido (0.1% p/p en metanol).
 - Para antraquinonas: extracto de sen (0.1% p/p en metanol).
 - Para cumarinas: umbeliferona, ácido *p*-cumárico, cumarina (1% p/p en metanol).
 - Para cardenólidos y bufadienólidos: digoxina (1% p/p en metanol);
 - Para saponinas: saponina (0.5% p/p en agua) saponina, colesterol, ergosterol, zarsapogenina, β -sitosterol, stigmasterol (0.1% p/p en metanol);
 - Para principios amargos: extracto de *Neurolaena lobata* (1% p/p en metanol);
 - Para aceites volátiles: mirceno, linalol, borneol, geraniol, timol, anetol, mentol, piperina (1% p/p en metanol).

c) Cristalería:

- vasos de precipitados de 10, 50, 100 y 250 mL
- Balones aforados de 10 mL
- Vidrio de reloj
- Probetas de 10 y 50 mL
- Balones de fondo redondo CORNING 24/40, de 100 mL y 1 L
- Condensador CORNING 24/40
- Ampolla de decantación de 500 mL
- Varillas de vidrio
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Micropipetas de vidrio con bulbo
- Frascos de vidrio de 30 mL, color ámbar con tapa
- Capilares sin heparina
- Cromatocámara
- Cromatoplacas de Silicagel 60 F₂₅₄
- Mechero de alcohol
- Masking Tape
- Atomizador
- Papel filtro cualitativo Wathman 1
- Papel parafilm
- Pinzas para tubo de ensayo
- Caja de Petri con agar sangre
- Gradilla para 10 tubos de ensayo de 10 mL
- Tamiz No. 35 o menor –medida estadounidense –

D. Métodos:**1. Procedimientos:****Etapa 1: *identificación y obtención de material vegetal fresco***

Identificar *in situ* –basándose en caracteres morfológicos específicos– y obtener el material vegetal, mediante colecta directa de las plantas en su hábitat natural (en la meseta de Todos Santos Cuchumatán), con asesoría del Ing. Agr. Mario Véliz. Transportar el material colectado en bolsas negras grandes con pequeñas perforaciones para permitir la ventilación del contenido (evitando

exponerlo al sol o macerarlo). Limpiar manualmente el material vegetal de fragmentos de otras plantas, hojas podridas, tierra u otros elementos que puede traer adheridos.

Etapa 2: *secado y molienda*

Secar todas las partes aéreas y raíz del material vegetal colectado ya limpio, a temperatura ambiente y en sombra, o de ser necesario, en horno con salida de vapor a temperatura inferior a 55°C. Una vez seco, molerlo manualmente hasta donde sea posible, y con ayuda de un procesador de alimentos, cuchillos u otros accesorios cortantes, según sea necesario. Luego, cerner con ayuda de un tamiz a partículas semifinas (con tamaño de partícula < 355 µm, correspondiente a Tamiz No. 35 o menor –de acuerdo a la clasificación estadounidense–).

Etapa 3: *determinación cualitativa de familias de metabolitos secundarios*

a) **Investigación de esteroides o triterpenoides:** Reacciones de color

- Liebermann Burchard: a 0.5 g de muestra seca colocados en un tubo de ensayo, aplicar unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1). *Resultado:* desarrollo de coloración rosa o púrpura indica saponinas triterpenoidales; colores verde y azul verdoso indican posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.
- Ácido tricloroacético: a 0.5 g de muestra seca colocados en un tubo de ensayo, añadir unos cristales de ácido tricloroacético y esperar aproximadamente 3 minutos. *Resultado:* desarrollo de coloración naranja, rojo o rojo oscuro es indicativo de triterpenos tetracíclicos; esteroides desarrollan color a 60°C; triterpenos pentacíclicos a 110°C.
- Carr-Price: agrega 2 mL de tricloruro de antimonio al 30% p/v en cloroformo (*ver preparación en Anexo 4, inciso a*) a 1 mg de muestra en cloroformo. *Resultado:* desarrollo de coloración azul, indicando posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.

b) **Investigación de saponinas:**

- Prueba de espuma: preparar tres tubos de ensayo de la siguiente manera:

Tubo 1: 100 mg de material vegetal pulverizado y seco.

Tubo 2: : 2 mL de estándar de saponina 0.5 % p/p en agua (control positivo de saponinas).

Tubo 3: 2 mL de agua (control negativo de saponinas).

A cada tubo adicionar 10 mL de agua destilada y calentar en baño de maría a 60°C durante 30 minutos. Dejar enfriar los tubos y taparlos con parafilm. Luego, agitarlos vigorosamente 30 a 40 segundos y observar la formación de una capa de espuma. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

- **Prueba de Hemólisis:** con un marcador indeleble trazar líneas en el fondo (por fuera) de la caja de Petri que contiene el agar sangre, que dividan su área en 4 espacios simétricos. Identificarlos respectivamente como “muestra 1”, “muestra 2”, “control de saponinas” y “blanco”. Cortar y extraer un pequeño bocado de agar en cada espacio separado, con ayuda del extremo grueso de una micropipeta. Utilizando una micropipeta para cada muestra, agregar una gota de cada una de las soluciones preparadas en la prueba de espuma (extractos acuosos de cada espécimen vegetal, control y agua) en el espacio correspondiente. Tapar y dejar reposar 24 hrs. *Resultado:* la formación de un halo blanquecino alrededor del sitio en que se colocó la muestra señala la presencia de saponinas.
- **Cromatografía en capa fina:** 2 g de material vegetal seco, se extraen con 10 mL de disolución de etanol al 70% v/v con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5 mL y proceder a aplicar con un capilar 25-40 µL de este preparado en una cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Aplicar con un capilar por triplicado estándares de saponinas, colesterol, ergosterol, zarsapogenina, β-sitosterol y stigmasterol (0.1% p/p en metanol). Fase móvil: *n*-butanol-ácido acético-agua (50:10:40). *Detección:* aplicar sobre la cromatoplaque ya seca, empleando un atomizador, reactivo de Liebermann-Burchard (*ver preparación en Anexo 4, inciso b*). Observar en la placa bajo luz ultravioleta de 365 nm. *Resultado:*

presencia de zonas azules y verdes indican saponinas esteroidales, zonas rojas y violetas indican presencia de triterpenoides.

c) Investigación de taninos:

- Ensayos macro y semimicro: extraer en un vaso de precipitados 2 g de material vegetal pulverizado con 6 mL de disolución de metanol al 80% v/v, filtrar y evaporar el filtrado a sequedad. Añadir 5 mL de agua caliente al residuo, agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 0.2 mL de disolución de NaCl al 10% p/v (ver preparación en Anexo 4, inciso c) y filtrar con papel filtro cualitativo. Adicionar 2 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: únicamente la alícuota del filtrado de la muestra (tubo control).

Tubo 2: agregar 4-5 gotas de disolución acuosa de gelatina 1% p/v (ver preparación en Anexo 4, inciso d).

Tubo 3: agregar 4-5 gotas de disolución de gelatina-sal (ver preparación en Anexo 4, inciso e).

Tubo 4: agregar 3-4 gotas de disolución acuosa de cloruro férrico 10% p/v (ver preparación en Anexo 4, inciso f).

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

Resultados: formación de precipitado al agregar disolución de gelatina indica posibles taninos. Con cloruro férrico, una coloración grisáceo-negro indica catecol, mientras que una negro-azulado indica pirogalol.

d) Investigación de aceites volátiles:

- Cromatografía en capa fina:

Extraer en un vaso de precipitados 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano, agitando por 15 minutos. Filtrar con papel filtro cualitativo y evaporar en baño maría (60°C) a sequedad en un vaso de precipitados. Disolver en 1 mL de tolueno y aplicar con un capilar 20-50 µL de este preparado en una cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄.

Aplicar sobre la cromatoplaqueta, con ayuda de un capilar, estándares de mentol, timol, anetol, mirceno, linalol, borneol, geraniol y piperina (1% p/p en metanol). Repetir 3 veces cada aplicación.

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

Detección: en la cromatoplaaca seca observar fluorescencia de algunos aceites volátiles bajo luz ultravioleta de 365 nm. Aplicar sobre la cromatoplaaca, empleando un atomizador, reactivo de anisaldehído- H_2SO_4 (ver preparación en Anexo 4, inciso g). Calentar a 100°C sobre una plancha de calentamiento por 5-10 minutos. *Resultado:* observar presencia de zonas azules, verdes rojas y cafés que pasadas algunas horas desaparecen completamente.

▪ Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CGEM):

Extraer aceites esenciales mediante hidrodestilación. Para ello:

- Colocar 20 g de material vegetal seco y pulverizado en un balón de fondo redondo de 1 L de capacidad.
- Agregar 300 mL de agua destilada, 5 núcleos de ebullición y conectarlo a un equipo de destilación por arrastre de vapor que permita recibir el destilado en un recipiente sumergido en un baño de hielo, que contenga 20 mL de hexano.
- Ajustar la temperatura para que la velocidad de destilación permita recuperar aproximadamente 250 mL de destilado en 2 horas.
- Terminada la destilación, separar las fases acuosa y orgánica del destilado en una ampolla de decantación, lavando la fase acuosa con dos porciones adicionales de 5 mL de hexano.
- Secar la fase orgánica agregando 1 g de sulfato de sodio anhidro en el recipiente (o más de ser necesario) y luego separarla del desecante por decantación.
- Eliminar el disolvente de la fase orgánica en un rotavapor a 45°C .
- Trasladar el aceite recuperado con ayuda de una micropipeta a un vial ámbar y colocarlo cerrado con parafilm en refrigeración hasta el momento de su análisis por cromatografía.

Analizar mediante CGEM. Para ello:

- Fijar los parámetros de operación esenciales del equipo:
 - Temperatura inicial: 250°C
 - Rampa de temperaturas tentativa
 - Temperatura final: 350°C

- Gas portador: Helio
- Presión: 4.44 psi
- Relación del divisor: 50:1
- Flujo del divisor: 36.7 mL/min
- Tomar, con la jeringa del cromatógrafo, 1 μ L de muestra del aceite extraído por hidrodestilación, e inyectarlo en el diafragma de la cámara de vaporización del equipo.
- Iniciar la corrida cromatográfica.
- Evaluar el cromatograma y espectros de masas obtenidos con la ayuda de la base de datos del equipo.

e) Investigación de alcaloides:

- Ensayos macro y semimicro: pesar 1 g de material vegetal seco. Agregar 2 gotas de disolución de hidróxido de amonio al 10% p/v, luego añadir 25 mL de metanol a 60°C. Filtrar con papel filtro Whatman 1 y acidificar el filtrado con HCl 2N. La disolución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's (*ver preparación en Anexo 4, inciso h*). *Resultado:* cambio de coloración a blanco-crema, turbidez o formación de precipitado o complejos de este color indican presencia de alcaloides.

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff (*ver preparación en Anexo 4, inciso i*). *Resultado:* cambio de coloración a rojo-naranja, turbidez o formación de precipitado o complejos de este color indican presencia de alcaloides.

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner (*ver preparación en Anexo 4, inciso j*). *Resultado:* cambio de coloración a marrón turbidez o formación de precipitado o complejos de este color indican presencia de alcaloides.

Tubo 4: únicamente la alícuota de la muestra (tubo control).

Usar como controles positivos, disoluciones de estándares de atropina y papaverina al 1% en metanol, a las que se les efectúan las mismas pruebas. Observar durante 2 horas.

- Cromatografía en capa fina: pesar 1 g de material vegetal seco y molido, agregar 1 mL de disolución de hidróxido de amonio al 10% p/v y extraer con 5 mL de disolución de metanol al 80% v/v. Colocar en baño maría a 60°C durante 5 minutos. Filtrar con papel filtro cualitativo y concentrar. Aplicar, con ayuda de un capilar, en una placa de silica gel 60 F₂₅₄, y repetir 10 veces la aplicación. Aplicar con un capilar por triplicado estándares de atropina y papaverina al 1% p/p en metanol.

Fase móvil: cloroformo-dietilamina (90:10).

Detección: fluorescencia al irradiar con luz ultravioleta de 254 nm; fluorescencia azul o amarilla de algunos alcaloides al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm. Aplicar sobre la cromatoplaca ya seca, empleando un atomizador, reactivo de Dragendorff (*ver preparación en Anexo 4, inciso i*). Observar inmediatamente en la placa la presencia de zonas cafés o naranjas que indican presencia de alcaloides.

f) Investigación de flavonoides y antocianinas:

- Ensayos macro y semimicro: extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de disolución de metanol al 80% v/v, filtrar con papel filtro cualitativo y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar con ayuda de una varilla de vidrio gruesa el residuo, adicionando 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 mL de disolución de metanol al 80% v/v y filtrar con papel filtro cualitativo. Dividir en 6 tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. *Resultado:* desarrollo de color verde o azul verdoso indica presencia de 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.

Tubo 2: agregar 3-5 gotas de disolución de cloruro férrico al 10% p/v (*ver preparación en Anexo 4, inciso f*). *Resultado:* desarrollo de color azul o verde-negro indica presencia de compuestos fenólicos.

Tubo 3: agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos. *Resultado:* desarrollo de color rojo indica presencia de leucoantocianinas; coloración café indica catequinas.

Tubo 4: agregar 50 mg magnesio metálico en polvo y 0.5 mL de HCl concentrado (método de Shinoda). *Resultado:* desarrollo de tono rojizo indica posible núcleos de γ -benzopirona de flavonoides (excepto chalconas, auronas, dihidrochalconas, catequinas e isoflavononas).

Tubo 5: agregar disolución saturada de ácido bórico en anhídrido acético. Preparar esta disolución agregando ácido bórico en polvo a 2 mL de anhídrido acético hasta que no se disuelva más revolviéndole a temperatura ambiente (método de Dimroth). *Resultados:* desarrollo de tonos amarillos o amarillo-verdosos indica posibles 5-hidroxi flavonas.

Tubo 6: únicamente la alícuota del filtrado de la muestra (tubo control).

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el tubo control. *Resultados:* desarrollo inmediato de color amarillo a rojo en presencia de flavonas y flavonoles; rojo a magenta en presencia de flavanoles; rojo, magenta, violeta y/o azul en presencia de flavanonas; amarillo en presencia de isoflavonas. Isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

- Cromatografía en capa fina: extraer 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de disolución de metanol al 80% v/v por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la disolución con papel filtro cualitativo y aplicar diez veces, utilizando un capilar, sobre la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Aplicar con un capilar por triplicado, estándares de ácido cafeico, kaempferol, hidrato de quercitrina, quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido (0.05% p/p en metanol).

Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50).

Detección: fluorescencia al irradiar con luz ultravioleta de 254 nm. Fluorescencia azul, amarilla o verde al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm.

g) Investigación de antraquinonas:

- Prueba de Bornträger: extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de disolución de etanol al 80% v/v, filtrar con papel filtro cualitativo y concentrar en baño de maría a 60°C. Disolver el residuo con 30 mL de agua

destilada y filtrar nuevamente con papel filtro cualitativo. Extraer con 10 mL de benceno y separar fases orgánica y acuosa utilizando una ampolla de decantación. A la fase bencénica añadir 5 mL de disolución etanólica de hidróxido de amonio al 10% p/v (ver preparación en Anexo 4, inciso k) y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina. *Resultado:* desarrollo de coloración rojo o rosado indica presencia de antraquinonas.

- *Prueba de Bornträger modificado:* calentar 0.3 g de material vegetal seco y pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N (ver preparación en Anexo 4, inciso l) y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos en baño de maría a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10 mL de benceno y separar fases orgánica y acuosa utilizando una ampolla de decantación. A la capa bencénica adicionar 5 mL de disolución de hidróxido de amonio al 10% p/v (ver preparación en Anexo 4, inciso k) y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina. *Resultado:* desarrollo de coloración rojo o rosado indica presencia de antraquinonas.
- *Cromatografía en capa fina:* extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado, con 5 mL de disolución de metanol al 80% v/v en baño maría a 60°C por 5 minutos. Filtrar con papel filtro cualitativo y aplicar con un capilar 10 veces en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Aplicar con un capilar, por triplicado, estándar de extracto de sen (*Cassia angustifolia*), 0.1% p/p en metanol.

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

Detección: fluorescencia al irradiar con luz ultravioleta de 254 nm. Fluorescencia amarilla o rojo-café al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm. Aplicar sobre la cromatoplaque ya seca, empleando un atomizador, disolución etanólica de hidróxido de potasio al 5% p/v (ver preparación en Anexo 4, inciso m) y calentar 5 minutos a 100°C. Observar la aparición zonas rojas con luz visible y fluorescencia roja al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm, que indican presencia de antraquinonas. Observar la aparición zonas amarillas con luz visible y fluorescencia amarilla al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm, que indican presencia de antronas y antranolas.

h) Investigación de cumarinas:

- Ensayos macro y semimicro: extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado, con 10 mL de disolución de metanol al 80% v/v en baño maría a 60°C por 5 minutos. Medir 5 mL del extracto y agregarles 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en un cuadro de papel filtro Wathman 1, de 10×10 cm. A una mancha agregar 1 gota de KOH 0.5N (*ver preparación en Anexo 4, inciso l*) y observar bajo luz ultravioleta de 365 nm. *Resultado:* fluorescencia azul o verde indica presencia de cumarinas.
- Cromatografía en capa fina: a 1 g de material vegetal seco y pulverizado adicionar 10 mL de disolución de metanol al 80% v/v y calentar 30 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar con papel filtro cualitativo, evaporar hasta 1 mL y aplicar con un capilar 10 veces en la cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄. Aplicar con un capilar, por triplicado, estándar de umbeliferona, ácido *p*-cumárico y cumarina (1% p/p en metanol).
Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).
Detección: fluorescencia al irradiar con luz ultravioleta de 254 nm. Intensa fluorescencia azul o verde-azul al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm. Aplicar sobre la cromatoplaca ya seca, empleando un atomizador, disolución etanólica de hidróxido de potasio al 5% p/v (*ver preparación en Anexo 4, inciso m*) y calentar 5 minutos a 100°C. Observar fluorescencia azul o verde al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm, que indican presencia de cumarinas.

i) Investigación de principios amargos:

- Prueba de Legal: extraer 0.1 g de material vegetal seco pulverizado, con 3 mL de disolución de etanol al 70% v/v en baño maría a 60°C por 5 minutos. Filtrar con papel filtro cualitativo y agregar al filtrado 1 mL de disolución fresca de nitroprusiato de sodio al 0.5% en agua (*ver preparación en Anexo 4, inciso n*) y 1-4 gotas de disolución de hidróxido de potasio 2N (*ver preparación en Anexo 4, inciso o*). *Resultado:* coloración rojo oscuro indica presencia de lactonas α,β -insaturadas.

- Cromatografía en capa fina: calentar en baño de maría, a 60°C, por 10 minutos, 1 g de material vegetal con 10 mL de disolución de metanol 80% v/v. Filtrar con papel filtro cualitativo, evaporar a 2 mL y aplicar con un capilar 10 veces en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Aplicar con un capilar, por triplicado, estándar de extracto de *Neurolaena lobata* (1% p/p en metanol).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8).

Detección: aplicar sobre la cromatoplaque ya seca, empleando un atomizador, reactivo de Liebermann-Buchard (*ver preparación en Anexo 4, inciso b*) y calentar 5 minutos a 100°C. Observar aparición de zonas café oscuro y/o gris que indican presencia de principios amargos.

j) Investigación de cardenólidos y bufadienólidos:

- Presencia de lactonas insaturadas: extraer 1 g de material vegetal seco pulverizado, con 5 mL de disolución de metanol al 80% v/v en baño maría a 60°C por 5 minutos. Filtrar con papel filtro cualitativo y, con un capilar, aplicar en tres puntos distintos de un cuadro de papel filtro Wathman 1, de 5×15 cm, el extracto (en el primero aplicar una vez, en el segundo dos veces y en el tercero tres). Dejar secar y a cada punto agregar 2 gotas de reactivo Kedde (*ver preparación en Anexo 4, inciso p*). Secar el papel filtro y observar cambio de color. *Resultado:* aparición de marca o anillo púrpura indica presencia de compuestos cardenólidos y bufadienólidos.
- Presencia de azúcares 2-desoxigenadas: evaporar el disolvente del extracto metanólico preparado en el ensayo de *lactonas insaturadas* (arriba) y eliminar los pigmentos coloreados mediante extracciones sucesivas de los mismos con éter de petróleo (hasta que salga incoloro). Secar el residuo y agregar 3 mL de reactivo Keller-Killiani (*ver preparación en Anexo 4, inciso q*). Trasvasar a un tubo de ensayo, mezclar y resbalar 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. *Resultado:* observar la formación de un anillo púrpura en la interfase, que señala la presencia de compuestos cardenólidos y bufadienólidos.

- Cromatografía en capa fina: a 1 g de material vegetal seco y pulverizado agregar 20 mL de disolución de etanol al 50% v/v. Reflujar durante 15 minutos y dejarla enfriar. Filtrar con papel filtro cualitativo y agregar 8 gotas de ácido acético glacial. Efectuar extracciones en una ampolla de decantación con 3 porciones de 15 mL de diclorometano, separando fases orgánica y acuosa. Secar la fase orgánica filtrándola sobre sulfato de sodio anhidro y evaporar el disolvente. Disolver el residuo con 1 mL de disolución diclorometano/etanol (1:1) y aplicar 10 veces, con un capilar, sobre una cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄. Aplicar con un capilar, por triplicado, estándar de digoxina (1% p/p en metanol).

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

Detección: no hay fluorescencia al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm. Aplicar sobre la cromatoplaqueta ya seca, empleando un atomizador, reactivo de Kedde (*ver preparación en Anexo 4, inciso p*). Observar la aparición zonas rosa o azul violeta con luz visible, que detectan el anillo lactónico de los cardenólidos (los bufadienólidos no reaccionan).

(12)

2. Diseño de Investigación:

a) Diseño de Muestreo:

El diseño de muestreo es no probabilístico por conveniencia.

b) Diseño:

Se planteó un diseño no experimental transeccional descriptivo, a desarrollar en tres etapas: 1) identificación *in situ* y colecta de material vegetal fresco en su hábitat natural, con ayuda del Ing. Agr. Mario Véliz (asesor); 2) secado, molienda y tamizado de la muestra; y 3) análisis de la composición química mediante pruebas específicas vía húmeda, cromatografía en capa fina o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para cada grupo de metabolitos seleccionado, de acuerdo a la metodología descrita en el Manual 2005 de Operaciones de Tamizaje Fitoquímico del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales –LIPRONAT–.

Las familias de metabolitos seleccionadas fueron: esteroides y triterpenoides, saponinas, taninos, aceites volátiles (para los que se efectuó adicionalmente a lo

indicado en el manual, análisis por cromatografía de gases), alcaloides flavonoides y antocianinas, antraquinonas, cumarinas y principios amargos.

c) Análisis de Resultados:

La interpretación de las pruebas fue totalmente cualitativa y se efectuó de acuerdo a los fundamentos teóricos de las mismas, contrastándose los resultados con los obtenidos en controles en cada prueba.

Debido a que se planificó la obtención de muestras pequeñas de especímenes muy homogéneos (colectados en un área bien delimitada y de características uniformes), las pruebas se realizaron una única vez para cada planta, pero se efectuaron al menos dos pruebas distintas para cada grupo de metabolitos, con el fin de corroborar los resultados entre pruebas y darles mayor validez a las mismas.

Los resultados fueron traducidos en términos de “presencia” o “ausencia” de cada grupo de metabolitos, tal y como se indica en cada una de las pruebas anteriormente descritas, haciéndose un análisis descriptivo de los hallazgos.

VIII. RESULTADOS

Tabla No. 1: Resultados del proceso de obtención, secado y molienda del material vegetal para los análisis de metabolitos secundarios. (Ver Anexo 7)

Especie Vegetal*	Peso del material fresco colectado	Peso del material seco	Observaciones
<i>Peperomia cuchumatanica</i> Véliz	190.78 g	53.8 g	El material seco y molido presenta color café oscuro y olor penetrante a hierbas.
<i>Peperomia moralesii</i> Véliz	230.46 g	40.1 g	El material seco y molido presenta color café claro y olor similar a la otra especie, pero más suave.

* Ambas especies vegetales fueron identificadas *in situ* al momento de la colecta, basándose en caracteres morfológicos específicos, por el Ing. Agr. Mario Véliz, Coordinador de la Unidad de Investigación del Herbario BIGU, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Fuente: Datos Experimentales.

Tabla No. 2: Resultados de las Pruebas de Identificación de Metabolitos Secundarios en *Peperomia cuchumatanica* Véliz. (Ver Anexo 7)

Metabolito	Prueba	Resultados Observados	Interpretación de la Prueba	Inferencia de las pruebas
Esteroides o Triterpenoides	Liebermann-Burchard	No hay cambio de coloración al agregar el reactivo.	(-)	Ausencia de esteroides y triterpenoides (incluidas saponinas triterpenoidales, derivados de colestano y triterpenos tetra y pentacíclicos).
	Ácido Tricloroacético	No hay cambio de coloración al agregar el reactivo ni al calentar a 60°C o a 110°C.	(-)	
	Carr-Price	No hay cambio de coloración al agregar el reactivo.	(-)	
Saponinas	Prueba de Espuma	Formación de una capa de espuma muy pequeña que desaparece en menos de 10 segundos.	(-)	Ausencia de saponinas.
	Prueba de Hemólisis	No se observa ningún cambio en el agar sangre alrededor de la muestra después de 24 horas.	(-)	
	CCF	Aparición de dos marcas de color café (no verde, azul, rojo o violeta) al aplicar luz ultravioleta en la placa. Ninguna coincide con las dejadas por los estándares.	(-)	
Taninos	Adición de disolución de gelatina 1% p/v	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	Ausencia de taninos y presencia de otro tipo de compuestos fenólicos.
	Adición de disolución de Gelatina-Sal	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	
	Adición de FeCl ₃ al 10% p/v	Cambio de color del extracto de la muestra a verde-gris.	(+)	
Aceites Volátiles	CCF	Aparición de dos marcas de color violeta bajo luz ultravioleta de 365 nm y cinco en tonos violetas al agregar el revelador y calentar la placa. Cuatro de éstas desaparecen en el transcurso de las siguientes 2 horas. Ninguna coincide con las de los estándares.	(+)	Presencia de aceites volátiles: - α-Cedreno - Tujopseno - Valenceno - Miristicina - Nerolidol - γ-Gurjuleno - γ-Selineno - Apíol - Elemicina - 1,5-Ciclodecadieno, 1,5-dimetil-8-(1-metileténil)-, [S-(Z,E)]
	CGEM	La base de datos empleada identificó, con una confiabilidad superior al 90%, 10 sustancias de 18 detectadas (Ver Anexos 5 y 6), siendo la más abundante el apíol.	(+)	

Continúa en pág. 40...

Continuación de Tabla No. 2 (pág. 39)...

Metabolito	Prueba	Resultados Observados	Interpretación de la Prueba	Inferencia de las pruebas
Alcaloides	Adición de Reactivo de Mayer	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	Ausencia de alcaloides.
	Adición de Reactivo de Dragendorff	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	
	Adición de Reactivo de Wagner	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	
	CCF	No se observan marcas fluorescentes al irradiar la placa con luz ultravioleta de 365 nm, ni marcas en color café o anaranjado al agregar reactivo de Dragendorff.	(-)	
Flavonoides y Antocianinas	Adición de H ₂ SO ₄ concentrado	Cambio de color del extracto a amarillo limón.	(+)	Presencia de flavonoides: Posible presencia de: - Núcleos de γ -benzopirona - 5-hidroxi flavonas Probable ausencia de: - Leucoantocianinas - Catequinas - Chalconas - Dihidrochalconas - Auronas - Isoflavononas - quercetina - rutina - hidrato de quercitrina - ácido clorogénico - hiperósido - kaempferol
	Adición de FeCl ₃ al 10% p/v	Cambio de color del extracto a verde oscuro.	(+)	
	Prueba para Leucoantocianinas (adición de HCl concentrado y calor)	No hay cambio de coloración.	(-)	
	Método de Shinoda (adición de Mg _(s) y HCl concentrado)	Cambio de color del extracto a rojo-anaranjado.	(+)	
	Método Dimroth (adición de disolución saturada de ácido bórico/anhídrido acético)	Cambio de color del extracto a amarillo limón.	(+)	
	CCF	Una marca fluorescente color azul violeta al irradiar la placa con luz ultravioleta de 254 nm, y de color verde al emplear luz ultravioleta de 365 nm. La marca no corresponde en color ni posición a ninguno de los estándares empleados.	(+)	
Antraquinonas	Bornträger	Ligera coloración rosada en la fase alcalina.	(+)	Presencia de antraquinonas (probable ausencia de antranolas y antronas).
	Bornträger modificado	Ligera coloración rosada en la fase alcalina.	(+)	
	CCF	Fluorescencia de dos marcas de color rojo-café al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm, que fluorescen intensamente en rojo al agregarles KOH etanólico, calentarlas e irradiarlas con la misma luz. Ninguna marca coincide con las del estándar.	(+)	
Cumarinas	Ensayos macro y semimicro de fluorescencia	Fluorescencia intensa en verde al agregar KOH 0.5N e irradiar con luz ultravioleta de 365 nm.	(+)	Presencia de cumarinas (probable ausencia de ácido paracumárico, umbeliferona y cumarina).
	CCF	Aparición de tres marcas verde fluorescente al irradiar la placa con luz ultravioleta de 365 nm, cuyo brillo se intensifica al agregar KOH al 5% p/v y calentar la placa. Ninguna marca corresponde a las de los estándares.	(+)	
Principios Amargos	Legal	No hay cambio de coloración.	(-)	Presencia de principios amargos distintos a sesquiterpeno-lactonas.
	CCF	Aparición de una marca café-gris al aplicar reactivo de Liebermann-Burchard. No coincide con las del estándar.	(+)	

Continúa en pág. 41...

Continuación de Tabla No. 2 (pág. 40)...

Metabolito	Prueba	Resultados Observados	Interpretación de la Prueba	Inferencia de las pruebas
Cardenólidos y Bufadienólidos	Presencia de lactonas insaturadas	No hay cambio de coloración.	(-)	Ausencia de compuestos cardenólidos y bufadienólidos.
	Presencia de azúcares 2-desoxigenados	No se forma anillo púrpura en la interfase.	(-)	
	CCF	No se observan marcas en tonos rosa o azul-violeta con luz visible.	(-)	

Fuente: Datos Experimentales.

Tabla No. 3: Resultados de las Pruebas de Identificación de Metabolitos Secundarios en *Peperomia moralesii* Véliz. (Ver Anexo 7)

Metabolito	Prueba	Resultados Observados	Interpretación de la Prueba	Inferencia de las pruebas
Esteroides o Triterpenoides	Liebermann-Burchard	No hay cambio de coloración al agregar el reactivo.	(-)	Ausencia de esteroides y triterpenoides (incluidas saponinas triterpenoidales, derivados de colestano y triterpenos tetra y pentacíclicos).
	Ácido Tricloroacético	No hay cambio de coloración al agregar el reactivo ni al calentar a 60°C o a 110°C.	(-)	
	Carr-Price	No hay cambio de coloración al agregar el reactivo.	(-)	
Saponinas	Prueba de Espuma	Formación de una capa de espuma muy pequeña que desaparece en menos de 10 segundos.	(-)	Ausencia de saponinas.
	Prueba de Hemólisis	No se observa ningún cambio en el agar sangre alrededor de la muestra después de 24 horas.	(-)	
	CCF	Aparición de dos marcas de color café (no verde, azul, rojo o violeta) al aplicar luz ultravioleta en la placa. Ninguna coincide con las dejadas por los estándares.	(-)	
Taninos	Adición de disolución de gelatina 1% p/v	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	Ausencia de taninos y presencia de otro tipo de compuestos fenólicos.
	Adición de disolución de Gelatina-Sal	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	
	Adición de FeCl ₃ al 10% p/v	Cambio drástico de color del extracto de la muestra a verde-negro.	(+)	
Aceites Volátiles	CCF	Aparición de tres marcas de color violeta al agregar el revelador y calentar la placa (ninguna sin tratamiento químico bajo luz ultravioleta de 365 nm). Todas desaparecen en el transcurso de las siguientes 2 horas. Ninguna coincide con las de los estándares.	(+)	Presencia de aceites volátiles: - α-Cedreno - Miristicina - γ-Gurjuleno - γ-Selineno - Apiol - Elemicina
	CGEM	La base de datos empleada identificó, con una confiabilidad superior al 90%, 6 sustancias de 9 detectadas (Ver Anexos 5 y 6), siendo la más abundante el apiol.	(+)	

Continúa en pág. 42...

Continuación de Tabla No. 3 (pág. 41)...

Metabolito	Prueba	Resultados Observados	Interpretación de la Prueba	Inferencia de las pruebas
Alcaloides	Adición de Reactivo de Mayer	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	Ausencia de alcaloides.
	Adición de Reactivo de Dragendorff	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	
	Adición de Reactivo de Wagner	No hay cambio de coloración ni formación de precipitado.	(-)	
	CCF	No se observan marcas fluorescentes al irradiar la placa con luz ultravioleta de 365 nm, ni marcas en color café o anaranjado al agregar reactivo de Dragendorff.	(-)	
Flavonoides y Antocianinas	Adición de H_2SO_4 concentrado.	No hay cambio de coloración.	(-)	Presencia de flavonoides: Posible presencia de: - Núcleos de γ -benzopirona Probable ausencia de: - Leucoantocianinas - Catequinas - Chalconas - Dihidrochalconas - Auronas - Isoflavononas - 5-hidroxiflavonas - quercetina - rutina - hidrato de quercitrina - ácido clorogénico - hiperósido - kaempferol
	Adición de $FeCl_3$ al 10% p/v	Cambio de color del extracto a verde-negro.	(+)	
	Prueba para Leucoantocianinas (adición de HCl concentrado y calor)	No hay cambio de coloración.	(-)	
	Método de Shinoda (adición de $Mg_{(s)}$ y HCl concentrado)	Cambio de color del extracto a rojo-anaranjado.	(+)	
	Método Dimroth (adición de disolución saturada de ácido bórico/anhídrido acético)	No hay cambio de coloración.	(-)	
	CCF	Una marca fluorescente color azul violeta al irradiar la placa con luz ultravioleta de 254 nm, y de color amarillo al emplear luz ultravioleta de 365 nm. La marca no corresponde en color ni posición a ninguno de los estándares empleados.	(+)	
Antraquinonas	Bornträger	Ligera coloración rosada en la fase alcalina.	(+)	Presencia de antraquinonas (probable presencia de antranolas y antronas).
	Bornträger modificado	Ligera coloración rosada en la fase alcalina.	(+)	
	CCF	Fluorescencia de dos marcas al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm, una en rojo y otra en amarillo, que se intensifican al agregarles KOH etanólico, calentarlas e irradiarlas con la misma luz. Ninguna marca coincide con las del estándar.	(+)	
Cumarinas	Ensayos macro y semimicro de fluorescencia	Fluorescencia intensa en azul-verde al agregar KOH 0.5N e irradiar con luz ultravioleta de 365 nm.	(+)	Presencia de cumarinas (probable ausencia de ácido paracumárico, umbeliferona y cumarina).
	CCF	Aparición de una marca azul-verde fluorescente al irradiar la placa con luz ultravioleta de 365 nm, cuyo brillo se intensifica al agregar KOH al 5% p/v y calentar la placa. La marca no corresponde a las de los estándares.	(+)	

Continúa en pág. 43...

Continuación de Tabla No. 3 (pág. 42)...

Metabolito	Prueba	Resultados Observados	Interpretación de la Prueba	Inferencia de las pruebas
Principios Amargos	<i>Legal</i>	No hay cambio de coloración.	(-)	Presencia de principios amargos distintos a sesquiterpeno-lactonas.
	<i>CCF</i>	Aparición de una marca café-gris al aplicar reactivo de Liebermann-Burchard. No coincide con las del estándar.	(+)	
Cardenólidos y Bufadienólidos	<i>Presencia de lactonas insaturadas</i>	No hay cambio de coloración.	(-)	Ausencia de compuestos cardenólidos y bufadienólidos.
	<i>Presencia de azúcares 2-desoxigenados</i>	No se forma anillo púrpura en la interfase.	(-)	
	<i>CCF</i>	No se observan marcas en tonos rosa o azul-violeta con luz visible.	(-)	

Fuente: Datos Experimentales.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los análisis de metabolitos secundarios en ambas muestras revelan la presencia de aceites volátiles, flavonoides, cumarinas, principios amargos y antraquinonas; descartando la presencia (al menos en concentraciones que puedan ser detectadas mediante los ensayos realizados) de triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, alcaloides, compuestos cardenólicos y bufadienólicos.

Para ambas especies, las pruebas de esteroides, triterpenos, saponinas, compuestos cardenólicos y bufadienólicos son concluyentes, y concuerdan entre sí en el sentido de que no se espera encontrar saponinas o compuestos cardenólicos y bufadienólicos, en una planta en la que las pruebas de triterpenos y esteroides son negativas, por estar éstos estructuralmente muy relacionados (14).

Las pruebas de adición de disolución de gelatina para taninos se basan en la capacidad de precipitar proteínas que tienen estos compuestos, y son claramente negativas para ambas especies vegetales analizadas. Sin embargo, la prueba de cloruro férrico señala únicamente la presencia de compuestos fenólicos, un grupo amplio de sustancias que incluye taninos, flavonoides y antocianinas (14).

En el caso de las plantas estudiadas, el resultado negativo en las pruebas de precipitación con gelatina y positivo en presencia de cloruro férrico se interpreta como la ausencia de taninos y presencia de compuestos fenólicos distintos a estos últimos. Los resultados positivos obtenidos en algunas pruebas para flavonoides concuerdan con esta interpretación.

Para *Peperomia cuchumatana*, las pruebas indican posible presencia de núcleos de γ -benzopirona y 5-hidroxi flavonas, según los métodos de Shinoda y Dimroth, respectivamente. Así mismo, el conjunto de ensayos efectuados indica la ausencia de leucoantocianinas, catequinas, chalconas, dihidrochalconas e isoflavononas.

Para *Peperomia moralesii*, los resultados de las pruebas de este grupo de metabolitos son semejantes, variando únicamente en que no se detectan 5-hidroxi flavonas con el método de Dimroth, y hay ligeros cambios en las tonalidades obtenidas para los ensayos positivos, que demuestran pequeñas diferencias en la

composición (probablemente en la concentración de estos componentes) de ambas especies.

En las dos muestras vegetales la cromatografía en capa fina descarta la presencia de quercetina, rutina, hidrato de quercitrina, ácido clorogénico, hiperósido y kaempferol, empleados como estándares, y muestra la presencia de flavonoides distintos entre ellas. La verificación de estas diferencias entre esta clase de metabolitos requeriría de la evaluación de los extractos con más pruebas cromatográficas.

Los ensayos efectuados para principios amargos muestran la ausencia de lactonas α,β -insaturadas (de acuerdo a la prueba de Legal (12)), de tal modo que el resultado positivo obtenido con la cromatografía en capa fina se atribuye a principios amargos distintos a sesquiterpenolactonas. Se presume la ausencia de iridoides y secoiridoides, debido a la naturaleza terpénica de estos compuestos, cuya presencia se hubiese revelado con las pruebas específicas para esteroides y triterpenoides (14). Se considera más plausible la presencia de neuroleninas (distintas a las presentes en el extracto de *Neurolaena lobata*, de acuerdo a la cromatografía en capa fina) u otros principios amargos cuya estructura es no terpenoide (19).

El material seco muestra la presencia de por lo menos diez aceites volátiles distintos en *Peperomia cuchumatana*, y seis de éstos en *P. moralesii*, que fueron identificados por la base de datos NIST 98, al efectuarse análisis por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CGEM) de sus extractos hexánicos. La abundancia relativa de los componentes varía sensiblemente entre especies, aunque en ambos casos el componente más abundante es el apiol.

Ambas especies presentan dos sustancias no identificadas cuyo porcentaje del área total del cromatograma es superior al 1% (ver *Tabla No. 4 en Anexo 5*), es decir, cuya abundancia relativa es considerable. Las dos presentan tiempos de retención muy similares, por lo que cabe la posibilidad de que sean las mismas, pese a que la base de datos del equipo no fue capaz de identificarlas apropiadamente. Una de ellas, la sustancia que más tardó en eluir en ambos extractos, es abundante en *Peperomia cuchumatana*, y relativamente escasa en *P. moralesii*. De este componente solo puede suponerse, por su tiempo de retención y las semejanzas observadas entre los demás componentes de la mezcla, que es una sustancia de características (peso y estructura) similar al apiol, pero la afirmación requiere la utilización de una base de datos más

extensa, o efectuar procedimientos de aislamiento y derivatización (de no ser posible llevar a cabo pruebas con otras técnicas de identificación como resonancia magnética nuclear –RMN–) para identificar la sustancia.

El resultado de las pruebas para antraquinonas es débil en las dos especies, aunque en la cromatografía en capa fina pueden reconocerse con claridad antraquinonas (de fluorescencia roja (12)) distintas en ambas, y se señalan como probables, antronas o antranolas (con fluorescencia amarilla (12)) en *Peperomia moralesii*.

Los ensayos para determinación de cumarinas muestran la presencia de cumarinas diferentes entre las especies, y a su vez, distintas a los estándares. Aunque los ensayos realizados son únicamente cualitativos, puede afirmarse, por la intensidad y tamaño de las marcas en la cromatoplaque, que la concentración de cumarinas en estas plantas es relativamente alta, comparada con la de los otros metabolitos.

En la literatura son escasos los estudios fitoquímicos de especies del género *Peperomia*, sin embargo, en ellos se han identificado flavonoides, triterpenos y esteroides como componentes principales (7). Los resultados de las pruebas efectuadas a *P. cuchumatana* y *P. moralesii* en el presente estudio muestran que ambas especies poseen los mismos grupos de metabolitos secundarios entre sí, pero difieren en su composición específica y en la proporción de sus componentes comunes; pese a la proximidad del área en que habitan. Al mismo tiempo, los resultados indican que ambas presentan diferencias marcadas en su composición, con respecto a las reportadas en la literatura para otras especies del mismo género, pues carecen de triterpenos y esteroides, y presentan cantidades notables de aceites volátiles y cumarinas, además de principios amargos y antraquinonas, que no han sido reportadas en estudios previos.

X. CONCLUSIONES

1. Ambas especies estudiadas contienen flavonoides, cumarinas, antraquinonas, aceites volátiles y principios amargos distintos a sesquiterpenolactonas.
2. Ambas especies analizadas carecen (cuando menos en concentraciones que puedan ser detectadas por los ensayos realizados) de taninos, esteroides, triterpenos, saponinas, alcaloides, compuestos cardenólicos y bufadienílicos.
3. El aceite esencial de *Peperomia cuchumatana* contiene un mayor número de componentes terpénicos volátiles que el de *P. moralesii*.
4. El componente principal (en cuanto a su abundancia relativa) del aceite esencial de ambas especies vegetales es el apiol.
5. La composición química de las dos especies analizadas es igual en cuanto a los grupos de metabolitos secundarios que presentan, y distinta en términos de sus componentes específicos.
6. Las especies analizadas presentan diferencias marcadas en cuanto a los grupos de metabolitos secundarios que las componen, con respecto a las reportadas en la literatura para otras especies del género *Peperomia*.

XI. RECOMENDACIONES

1. Efectuar análisis cromatográficos más completos para la identificación de los flavonoides, antraquinonas y cumarinas presentes en ambas especies, para poder compararlas con mayor detalle.
2. Utilizar una base de datos más completa u otras técnicas de análisis para la identificación de los aceites volátiles detectados y no identificados por el equipo empleado.
3. Efectuar el tamizaje fitoquímico de otras especies del género *Peperomia* que habitan en regiones similares y en regiones distintas, en cuanto a altitud, clima y tipo de suelo, a las que habitan las dos especies estudiadas, con el fin de correlacionar su composición química con estas características.
4. Realizar ensayos de actividad farmacológica de flavonoides de ambas plantas, basados en los reportes realizados para otras especies del género *Peperomia*.

XII. REFERENCIAS

1. Lecciones Hipertextuales de Botánica: Familia Piperaceae [en línea]. www.unex.es/polen/LHB/magnoliidae/piperace.htm [Consulta: 6 agosto 2006].
2. [en línea] www.inbio.eas.ualberta.ca/bims/k03/p13/c045/o0234/f01525.htm [Consulta: 6 agosto 2006].
3. Furnari, G., Pavone, P., Salmeri, C. y otros. Tabla de Botánica Sistemática: Piperaceae [en línea]. Universidad de Catania. www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Pipe_fam.html [Consulta: 6 agosto 2006].
4. Rowley, G. Pep for plantsmen –Part 2, the geophytic peperomias. UK. BCSJ Vol. 19 (4). 200-205 p.
5. Standley, P. y Steyermark, J. 1952. Flora of Guatemala. Fieldiana Botany, Part III, Vol. 24. USA. Chicago Natural History Museum.
6. Sánchez, J. Las especies del género *Peperomia* cultivadas en España [en línea]. 2003. www.arbolesornamentales.com/Peperomia.htm [Consulta: 25 octubre 2006].
7. Navarro, G. y Fabiola, R. Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R, et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. [en línea] sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Salud/Guillermo_N_R/introduccion.htm [Consulta: 15 agosto 2006].
8. Morton, J. 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America; Bahamas to Yucatan. USA. Ed. Charles C. Thomas. 1420 p.
9. Véliz, M. 2007. New Species of *Peperomia* (Piperaceae) of Central America, Internacional Cactus Adventures no. 73: 2-13.
10. Martínez, A. Ensayos de Reconocimiento de Metabolitos de Interés Farmacéutico [en línea]. 2001. Universidad de Antioquía, Medellín. amart@muiscas.udea.edu.co [Consulta: 28 octubre 2006].
11. Santizo, I. 2004. Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Guatemala. 100 p. Tesis Licenciatura en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica.
12. Manual de Operaciones; tamizaje fitoquímico. 2005. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales –LIPRONAT–. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala . 9 p.

13. Skoog, D., Holler, F. y Nieman, T. 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ª edición. España. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1028 p.
14. Bruneton, J. 2001. Farmacognosia; Fitoquímica, plantas medicinales. 2ª edición. España. Editorial Acribia. 1099 p.
15. Martínez, A. Saponinas Esteroides [en línea]. 2001. Universidad de Antioquía, Medellín. <amart@muiscas.udea.edu.co> [Consulta: 28 octubre 2006].
16. Martínez, A. Aceites Esenciales [en línea]. 2001. Universidad de Antioquía, Medellín. <amart@muiscas.udea.edu.co> [Consulta: 28 octubre 2006].
17. 1992. Diccionario de la Lengua Española. 21ª edición. España. Real Academia Española. Espasa-Calpe S.A. Tomos I y II.
18. 1999. 100 Plantas Medicinales Aromáticas y Culinarias. España. Servilibro Ediciones S.A.. 348 p.
19. Deharo, E., *et al.* Técnicas de Laboratorio para la Selección de Sustancias Antimaláricas. [en línea]. 2000. Institut de Recherche pour le Développement (IRD). La Paz, Bolivia. 188 p. <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_03_03/010023670.pdf> [Consulta: 19 agosto 2007].
20. [en línea]. MDidea Exporting División. <http://www.mdidea.com/support/glossary_phytochemicals.html> [Consulta: 19 agosto 2007].
21. [en línea]. <http://www.ecodesignguide.dk/html_pages/pdf_files/chem_advisory_list.pdf> [Consulta: 19 agosto 2007].

XIII. ANEXOS

ANEXO 1

Glosario

1. **Epífita:** De *epi*, sobre y el gr. $\iota\chi\omega\tilde{\upsilon}\tau\grave{\alpha}$, vegetal. Dícese del vegetal que vive sobre otra planta, sin alimentarse a expensas de esta, como los musgos y líquenes.
2. **Estípula:** Del lat. *stipula*, brizna, paja. Apéndice foliáceo colocado en los lados del pecíolo o en el ángulo que este forma con el tallo.
3. **Brácteas:** Hoja que nace del pedúnculo de las flores de ciertas plantas y suele diferir de la hoja verdadera por su forma, consistencia y color.
4. **Acaulescente:** De *a*, privativo y del lat. *caulis*, tallo. Planta carente de tallo o con tallo tan minúsculo que parece inexistente.
5. **Acetabulada:** Del lat. *acetabulum*, con forma de acetábulo o copa.
6. **Peltado:** Del lat. *peltatus*, armado de pelta o escudo. Aplícase a la hoja de lámina redondeada y con el pecíolo inserto en el centro.
7. **Subsésil:** situado debajo de la base de la corola de la flor.
8. **Hemostático:** De *hemo-* sangre, y el gr. $\nu\omega\delta\omega\lambda\eta\tilde{\upsilon}\tau\eta$ que detiene. Dícese del medicamento o agente que se emplea para detener una hemorragia.
9. **Extrusión:** Técnica para la extracción de aceites esenciales en la que el material vegetal se exprime para liberar el aceite. De éste modo se recolecta y filtra. La técnica se utiliza especialmente en el caso de las esencias de cítricos.
10. **Enfleurage:** Técnica para la extracción de aceites esenciales en la que el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.
11. **Colagogo:** Del gr. $\chi\omicron\lambda\omicron\gamma\omicron$, bilis, y $\epsilon\lambda\omicron\zeta$, mover. Dícese de la sustancia o medicamento que provoca la secreción y salida de bilis de la vesícula biliar hacia el

duodeno, actuando entonces como suave agente laxante, puesto que la bilis es el laxante interno natural del organismo.

12. **Heterósido:** Son sustancias no reductoras (acetales) que por hidrólisis ácida o enzimática dan uno o más azúcares y un componente no glucídico llamado aglicón o genina.
13. **Venotónico:** Sustancia con acción vaso constrictora venosa. Qué activa la circulación sanguínea venosa.

(17)(18)

ANEXO 2

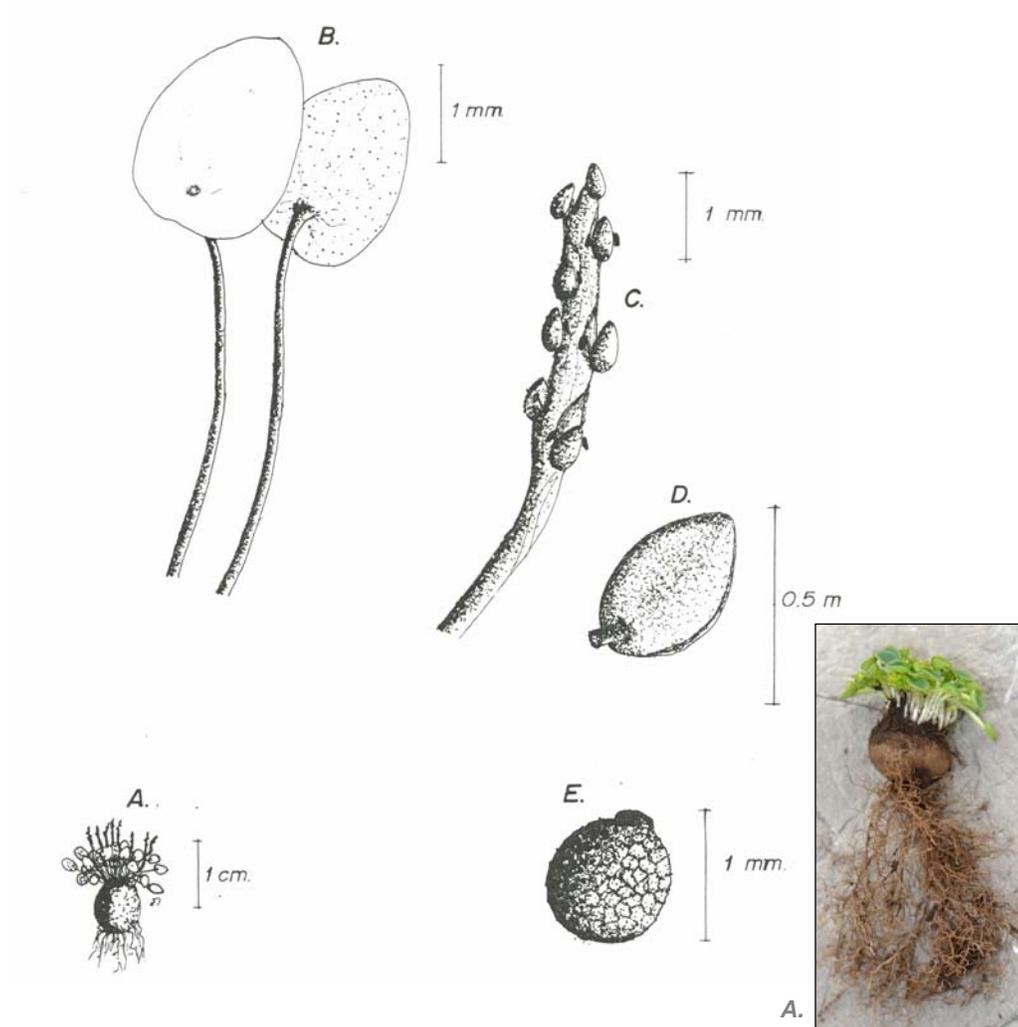
Morfología de *Peperomia cuchumatanica* Véliz y *P. moralesii* Véliz

Figura 1: ***Peperomia cuchumatanica* Véliz**
 A. estructura; B. hojas; C. inflorescencias; D. brácteas florales; E. fruto

Tomado de: - Véliz, M. 2007. New Species of Peperomia (Piperaceae) of Central America, Internacional Cactus Adventures no. 73.
 - [en línea]. <http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast>. [Consulta: 12 septiembre 2007].

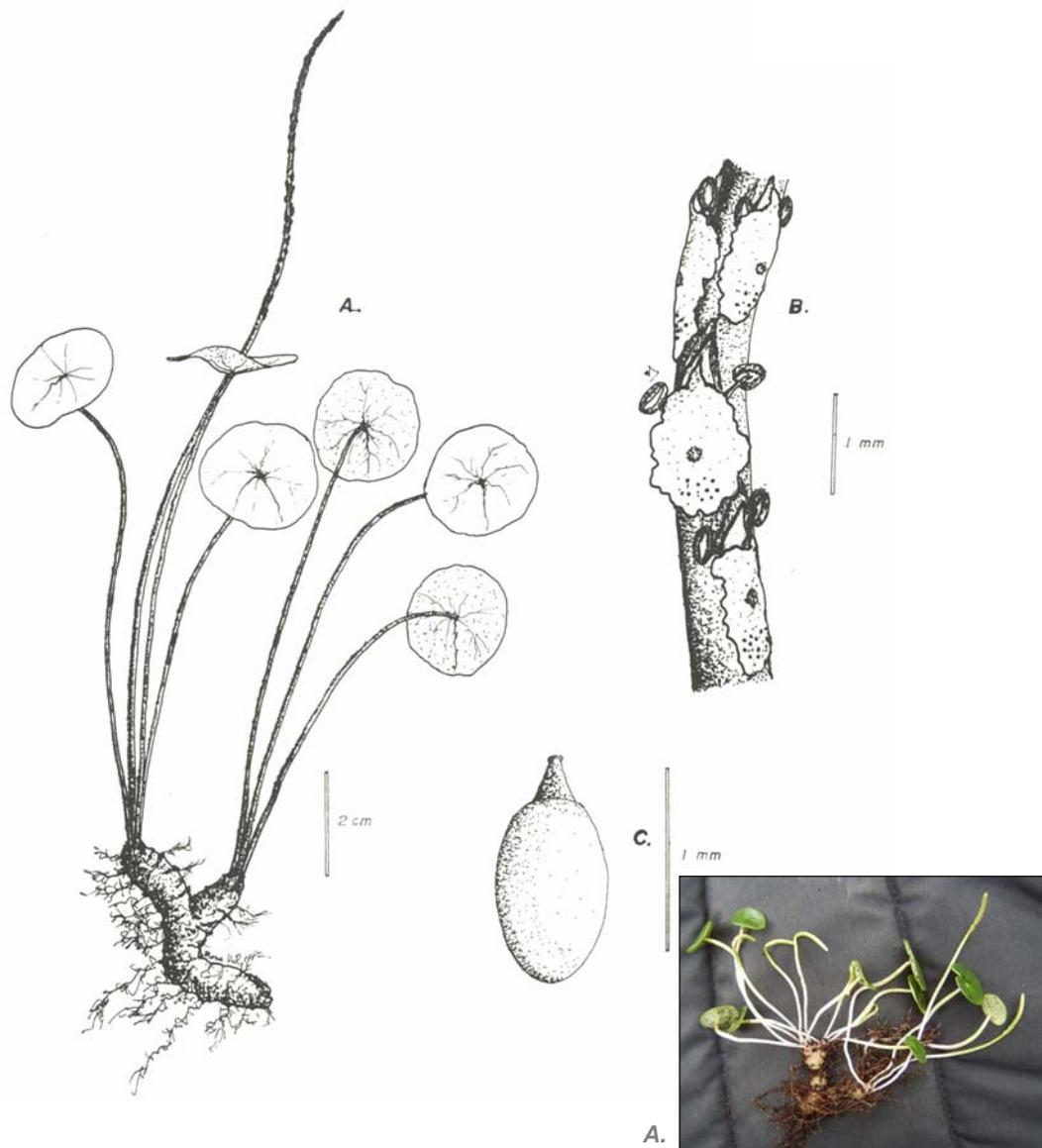


Figura 2: *Peperomia moralesii* Véliz

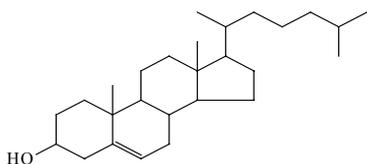
A. estructura; B. brácteas florales sobre la sección de una inflorescencia; C. fruto

Tomado de: - Véliz, M. 2007. New Species of *Peperomia* (Piperaceae) of Central America, *Internacional Cactus Adventures* no. 73.
 - [en línea]. <http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast>. [Consulta: 12 septiembre 2007].

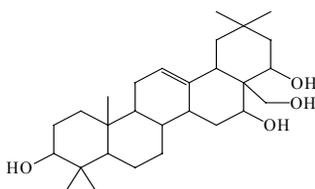
ANEXO 3

Estructuras Base de Metabolitos Secundarios (Estructuras Típicas Generalizadas)

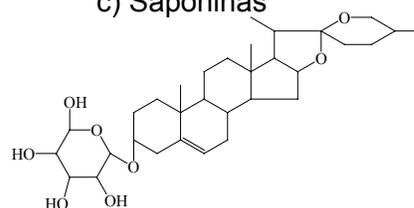
a) Esteroides



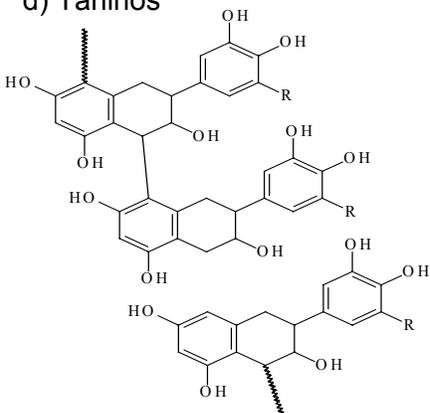
b) Triterpenos



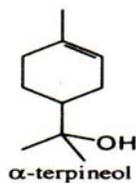
c) Saponinas



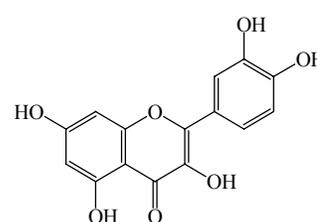
d) Taninos



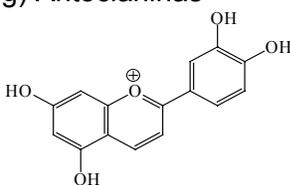
e) Aceites Volátiles



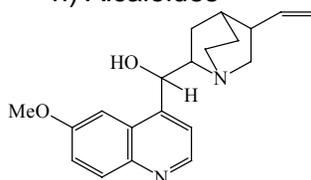
f) Flavonoides



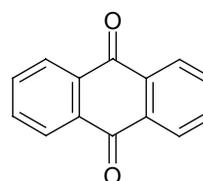
g) Antocianinas



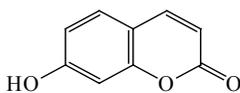
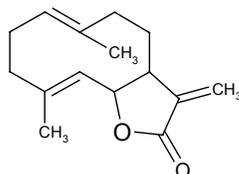
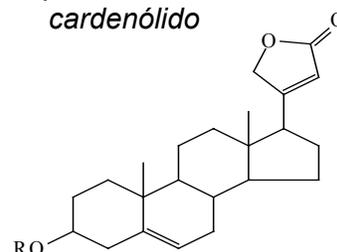
h) Alcaloides



i) Antraquinonas



j) Cumarinas

k) Principios Amargos:
germacranólidol) Compuestos Cardiotónicos:
cardenólido

ANEXO 4

Preparación de Reactivos

- a) Tricloruro de Antimonio 30% p/v en cloroformo:
- Pesar 3.0 g de tricloruro de antimonio y disolverlos en 6 mL de cloroformo.
 - Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con cloroformo.
- ① El cloroformo es potencialmente cancerígeno, puede absorberse por la piel y libera gases tóxicos e irritantes al descomponerse por calentamiento ($\text{HCl}_{(g)}$, Cl_2 , fosgeno). *Trabajar con él utilizando equipo de seguridad completo y lejos de fuentes de calor.*
- b) Liebermann-Burchard:
- Mezclar 5 mL de anhídrido acético con 5 mL de cloroformo.
 - Enfriar a 0°C y agregar 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
 - ⇒ El reactivo es estable durante 1 día.
- ① El cloroformo es potencialmente cancerígeno, puede absorberse por la piel y libera gases irritantes al descomponerse por calentamiento. *Trabajar con él utilizando equipo de seguridad completo y lejos de fuentes de calor.*
- ① El ácido sulfúrico es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Es oxidante y ácido fuerte capaz de atacar metales liberando hidrógeno. *Trabajar bajo campana de extracción de gases y con equipo completo de seguridad.*
- c) Cloruro de Sodio 10% p/v:
- Pesar 1.0 g de cloruro de sodio y disolverlos en 6 mL de agua destilada.
 - Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.
- d) Gelatina 1% p/v:
- Pesar 0.1 g de gelatina y disolverlos en 6 mL de agua destilada.
 - Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.
 - ⇒ El reactivo es estable en refrigeración durante 1 semana.
- e) Gelatina-Sal:
- Pesar 0.1 g de gelatina y 1 g de NaCl.
 - Disolverlos en 6 mL de agua destilada.
 - Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.
 - ⇒ El reactivo es estable en refrigeración durante 1 semana.
- f) Tricloruro Férrico 10% p/v:
- Pesar 1 g de FeCl_3 y disolverlos en 6 mL de agua destilada.
 - Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.
 - ⇒ Preparar justo antes de usar.

g) Anisaldehído-Ácido Sulfúrico:

- Mezclar 0.1 mL de anisaldehído con 2 mL de ácido acético glacial.
- Agregarles 17 mL de metanol y luego 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- ⇒ La disolución es estable en un recipiente oscuro por tiempo limitado. Descartar si se torna de color violeta.

① El ácido sulfúrico es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Es oxidante y ácido fuerte capaz de atacar metales liberando hidrógeno. *Trabajar bajo campana de extracción de gases y con equipo completo de seguridad.*

h) Mayer: (yoduro de mercurio y potasio)

- Disolver 0.14 g de HgCl_2 en 6 mL de agua.
- Disolver 0.5 g de KI en 1 mL de agua.
- Mezclar las dos disoluciones y aforar a 10 mL.
- ⇒ El reactivo solo debe añadirse a disoluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos.
- ⇒ La disolución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado.
- ⇒ Solo debe agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso del mismo.

① El cloruro de mercurio es irritante y corrosivo. Puede absorberse por la piel. Es sumamente tóxico para el ambiente. *Evitar todo contacto, trabajar con equipo completo de seguridad.*

i) Dragendorff: (yoduro de bismuto y potasio)

- Disolución A: disolver 0.65 g de nitrato básico de bismuto en 2 mL de ácido nítrico concentrado.
- Disolución B: disolver 2.72 g de KI en 5 mL de agua destilada.
- Mezclar ambas disoluciones, dejarlas reposar 15 minutos y decantar el supernadante dentro de un balón aforado de 10 mL.
- Aforar el balón con agua destilada.
- ⇒ La disolución es estable en un recipiente oscuro y refrigerado durante 6 meses.

① El ácido nítrico es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Es oxidante y ácido fuerte capaz de atacar metales. *Trabajar bajo campana de extracción de gases y con equipo completo de seguridad.*

j) Wagner: (yodo-yoduro de potasio)

- Pesar 0.127 g de I_2 y adicionarles 0.2 g de KI disueltos en 5 mL de agua destilada.
- Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.

① El yodo es irritante y causa quemaduras severas por contacto o inhalación (sublima fácilmente). Es oxidante y reacciona violentamente con acetaldehído, fósforo, aluminio, amoníaco y metales alcalinos. Por calentamiento intenso libera gases tóxicos. Tóxico para organismos acuáticos. *Trabajar con equipo completo de seguridad. No descartar en el drenaje.*

k) Hidróxido de Amonio al 10% p/v:

- Pesar 1.0 g de hidróxido de amonio y disolverlos en 6 mL de agua destilada.

- Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.
 - ① El hidróxido de amonio es base fuerte disuelto en agua, corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Ataca a la mayoría de metales liberando hidrógeno inflamable. Muy tóxico para organismos acuáticos. *Trabajar con equipo completo de seguridad. No descartar en el drenaje.*
- l) Hidróxido de Potasio Etanólico 0.5 N:
- Pesar 0.2 g de KOH en un vaso de precipitados y disolverlos en 7 mL de etanol al 95% v/v.
 - Trasvasar cuantitativamente a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con más etanol.
 - ① El hidróxido de potasio es base fuerte, su disolución en agua es sumamente exotérmica. Es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Ataca algunos metales liberando hidrógeno inflamable. *Trabajar con equipo completo de seguridad.*
- m) Hidróxido de Potasio Etanólico al 5% p/v:
- Pesar 0.5 g de KOH en un vaso de precipitados y disolverlos en 7 mL de etanol al 95% v/v.
 - Trasvasar cuantitativamente a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con más etanol.
 - ① El hidróxido de potasio es base fuerte, su disolución en agua es sumamente exotérmica. Es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Ataca algunos metales liberando hidrógeno inflamable. *Trabajar con equipo completo de seguridad.*
- n) Nitroprusiato Sódico 0.5% p/v:
- Pesar 0.05 g de nitroprusiato sódico en un vaso de precipitados y disolverlos en 7 mL de agua destilada.
 - Trasvasar cuantitativamente a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con más agua destilada.
 - ① El nitroprusiato sódico es tóxico por ingestión y capaz de liberar HCN y óxidos de nitrógeno bajo calentamiento excesivo. *Evitar todo contacto directo y trabajar con equipo completo de seguridad.*
- o) Hidróxido de Potasio Acuoso 2 N:
- Pesar 1.122 g de KOH en un vaso de precipitados y disolverlos en 7 mL de agua destilada.
 - Trasvasar cuantitativamente a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con más agua destilada.
 - ① El hidróxido de potasio es base fuerte, su disolución en agua es sumamente exotérmica. Es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Ataca algunos metales liberando hidrógeno inflamable. *Trabajar con equipo completo de seguridad.*
- p) Kedde:
- Medir 5 mL de disolución etanólica de ácido 3,5-dinitrobenzoico al 3% p/v preparado recientemente.
 - Medir 5 mL de NaOH 2M.

- Mezclar al momento de utilizar.
 - ① El hidróxido de sodio es base fuerte, su disolución en agua es sumamente exotérmica. Es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Ataca algunos metales liberando hidrógeno inflamable. *Trabajar con equipo completo de seguridad.*
- q) Keller-Killiani:
- Medir 0.3 mL de disolución acuosa de FeCl_3 al 10% p/v.
 - Medir 50 mL de ácido acético glacial.
 - Mezclar antes de usar.
 - ① El ácido acético es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Es inflamable y altamente tóxico para organismos acuáticos. *Trabajar bajo campana de extracción de gases y con equipo completo de seguridad.*

Tomado de: Santizo, I. 2004. Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Guatemala. 100 p. Tesis Licenciatura en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica.

ANEXO 5

Reporte del Análisis CGEM para identificación de Aceites Volátiles

A. Condiciones del equipo para el análisis de los extractos de ambas especies:

- **Equipo:**
Cromatógrafo: Agilent 6890N
Detector: selectivo de masas Agilent 5973N
Biblioteca: referencia de espectros de masa NIST 98
- **Horno:**
Temperatura inicial: 50 °C
Tiempo inicial: 1.00 min
Temperatura final: 50 °C
Rampas:

#	Razón de Cambio	Temperatura final	Tiempo final
1	7.00	250	5.00
2	0.00		
- **Columna:**
Tipo: capilar
Modelo: Agilent 19091S-433, HP-5 MS
Dimensiones: 30 m × 250.00 µm
Grosor de la película: 0.25 µm
- **Inyección:**
Modo: Split (50:1)
Temperatura inicial: 250 °C
Presión: 4.44 psi
Volumen inyectado: 1 µL de muestra
Flujo del divisor: 36.7 mL/min
Flujo total: 39.2 mL/min
Gas portador: helio
- **Detección:** (los parámetros empleados en los análisis corresponden al Standard Spectral Target Tune para el Detector de Masas Agilent 5973, con los que se generaron los datos de la biblioteca NIST 98 usada en la identificación).
Modo de adquisición de datos: Scan
Parámetros:

Low Mass: 10.0	MS Quad: 150 °C máx. 200 °C
High Mass: 300.0	MS Source: 230 °C máx. 250 °C
Threshold: 150	

 Voltaje del Multiplicador de Electrones (EM Voltage): 1200.0
 Polarización de Corriente: Negativa
 Polarización del Ion: Positiva

B. Componentes identificados por la biblioteca del detector:

Tabla No. 4: Aceites volátiles identificados por análisis CGEM.

Especie Vegetal	No. de pico	TR*	% Área	Compuesto Identificado	# Ref	CAS#	Certeza
Peperomia cuchumatana Véliz	11	16.51	0.84	α-Cedreno: 1H-3a,7-Metanoazuleno,2,3,4,7,8,8a-hexahidro-3,6,8,8,-tetrametil-[3R-(3.α.,3a.β.,7.β.,8a.α.)]-	58899	469-61-4	98
	13	16.85	0.46	Tujopseno: (1AS-(-α,4aβ,8aR*)))-1,1a,4,4a,5,6,7,8-octahidro-2,4a,8,8-tetrametilciclopropa(d)naftaleno	58621	470-40-6	96

Continúa en pág. 62...

Continuación de Tabla No. 4 (pág. 61)...

Especie Vegetal	No. de pico	TR*	% Área	Compuesto Identificado	# Ref	CAS#	Certeza
<i>Peperomia cucumatanica</i> Véliz	15	17.47	3.00	NI. **	-	-	-
	16	17.93	0.64	Valenceno: Naftaleno,1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metileténil)-,[1R-(1.α.,7.β.,8a.α.)]-	58889	4630-07-3	99
	17	18.12	0.41	1,5-Ciclododecadieno,1,5-dimetil-8-(1-metileténil)-,[S-(Z,E)]-	58772	75023-40-4	97
	18	18.44	8.99	Miristicina: 1,3-Benzodioxol,4-metoxi-6-(2-propenil)-	50187	607-91-0	97
	19	18.91	4.23	Elemicina: Benceno,1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)-	61340	487-11-6	95
	20	19.03	1.10	Nerolidol: 1,6,10-Dodecatrien-3-ol,3,7,11-trimetil,-[S-(Z)]-	71002	142-50-7	91
	21	19.54	1.09	γ-Gurjuneno: Azuleno,1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metileténil)-,[1R-(1.α.,3a.β.,4.α.,7.β.)]-	58911	22567-17-5	94
	22	19.68	0.51	γ-Selineno: Naftaleno,decahidro-4a-metil-1-metileno-7-(1-metiletilideno)-,(4aR-trans)-	58833	515-17-3	96
	25	21.30	28.14	Apiol: 1,3-Benzodioxol-4,7-dimetoxi-5-(2-propenil)-	70480	523-80-8	98
	26	21.45	20.73	NI. **	-	-	-
<i>Peperomia moralesii</i> Véliz	9	16.51	0.52	α-Cedreno: 1H-3a,7-Metanoazuleno,2,3,4,7,8,8a-hexahidro-3,6,8,8,-tetrametil-[3R-(3.α.,3a.β.,7.β.,8a.α.)]-	58905	469-61-4	99
	10	17.46	1.60	NI. **	-	-	-
	11	18.49	19.89	Miristicina: 1,3-Benzodioxol,4-metoxi-6-(2-propenil)-	50186	607-91-0	97
	12	18.98	13.42	Elemicina: Benceno,1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)-	61341	487-11-6	97
	13	19.57	2.87	γ-Gurjuneno: Azuleno,1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metileténil)-,[1R-(1.α.,3a.β.,4.α.,7.β.)]-	58911	22567-17-5	97
	14	19.72	3.36	γ-Selineno: Naftaleno,decahidro-4a-metil-1-metileno-7-(1-metiletilideno)-,(4aR-trans)-	58833	515-17-3	95
	15	21.20	24.60	Apiol: 1,3-Benzodioxol-4,7-dimetoxi-5-(2-propenil)-	70480	523-80-8	98
	16	21.35	1.16	NI. **	-	-	-

* TR = Tiempo de Retención.

** NI = No Identificado (Compuesto no identificado que presenta un % de área superior a 1 en el cromatograma)

Fuente: Datos Experimentales.

C. Cromatogramas:

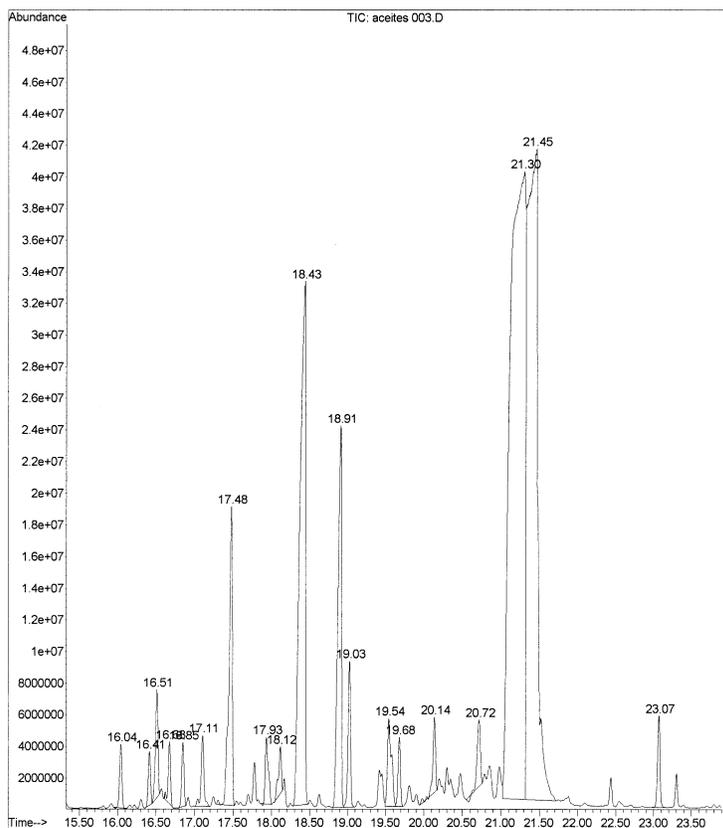
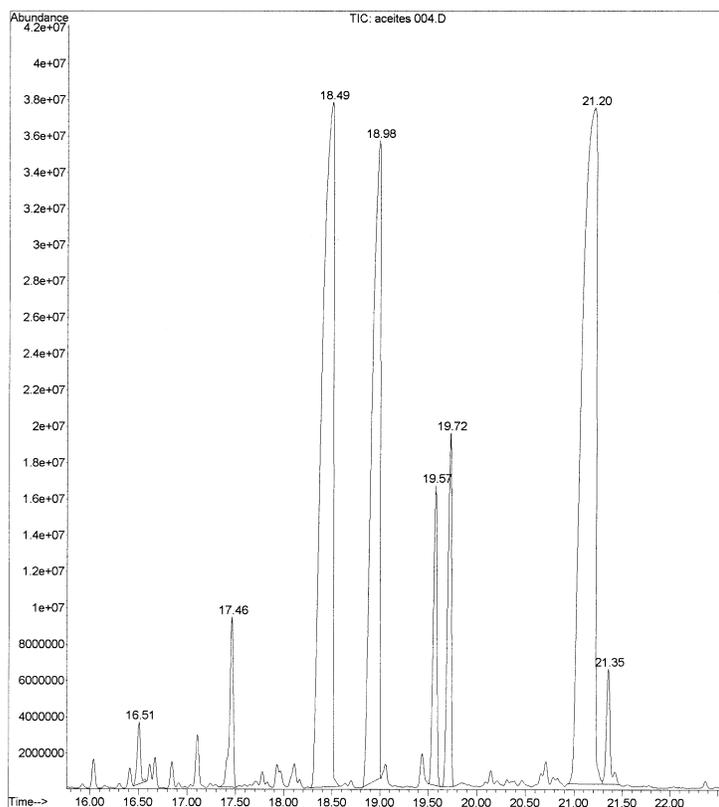


Figura 3: Cromatograma del aceite esencial de *Peperomia cuchumatana* Véliz

Fuente: Datos Experimentales.

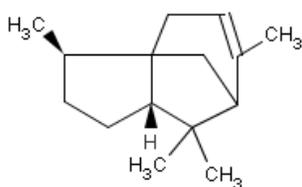
Figura 4: Cromatograma del aceite esencial de *Peperomia moralesii* Véliz

Fuente: Datos Experimentales.

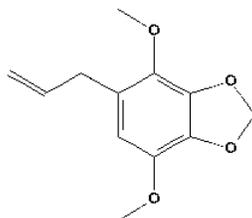


ANEXO 6

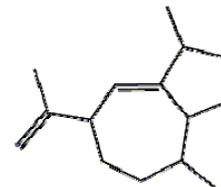
Estructuras de los Aceites Volátiles Identificados por Análisis CGEM



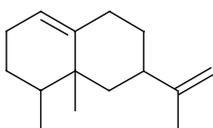
α -Cedreno
(C₁₅H₂₄)



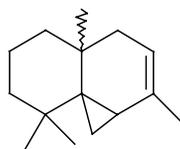
Apiol
(C₁₂H₁₄O₄)



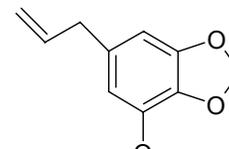
γ -Gurjuneno
(C₁₅H₂₄)



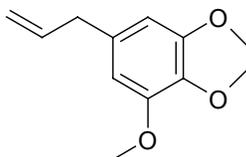
Valenceno
(C₁₅H₂₄)



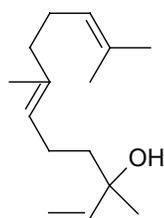
Tujopseno
(C₁₅H₂₄)



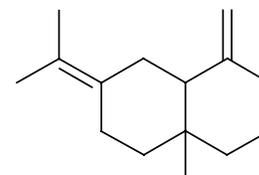
Miristicina
(C₁₁H₁₂O₃)



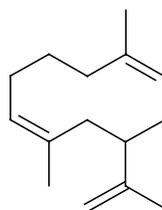
Elemicina
(C₁₂H₁₆O₃)



Nerolidol
(C₁₅H₂₆O)



γ -Selineno
(C₁₅H₂₄)



1,5-Ciclodecadieno,1,5-dimetil-8-(1-metilenil)-,[S-(Z,E)]-
(C₁₅H₂₄)

Tomado de: - [en línea]. MDidea Exporting División. <http://www.mdidea.com/support/glossary_phytochemicals.html> [Consulta: 19 agosto 2007].
- [en línea]. <http://www.ecodesignguide.dk/html_pages/pdf_files/chem_advisory_list.pdf> [Consulta: 19 agosto 2007].

ANEXO 7

Fotografías del Proceso Experimental



Figura 5: Meseta de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango

Fuente: Colecta.



Figura 6: *Peperomia moralesii* Véliz

Fuente: Colecta.



Figura 7: *Peperomia cuchumatana* Véliz

Fuente: Colecta.



Figura 8: Proceso de secado de *Peperomia moralesii* Véliz

Fuente: Proceso Experimental.



Figura 9: Proceso de secado de *Peperomia cuchumatana* Véliz

Fuente: Proceso Experimental.

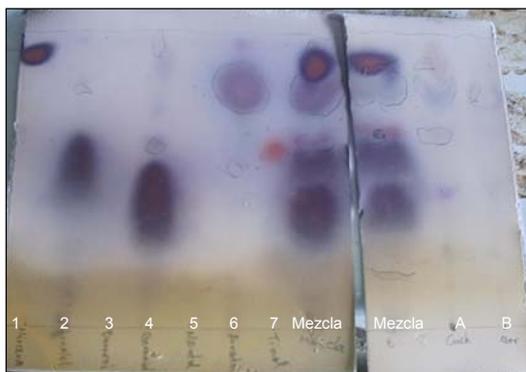


Figura 10: CCF de aceites volátiles

(1 = mirceno, 2 = linalol, 3 = borneol, 4 = geraniol, 5 = mentol, 6 = anetol, 7 = timol, **Mezcla** = mezcla de estándares, **A** = extracto de *P. cuchumatana*, **B** = extracto de *P. moralesii*)

Fuente: Proceso Experimental.

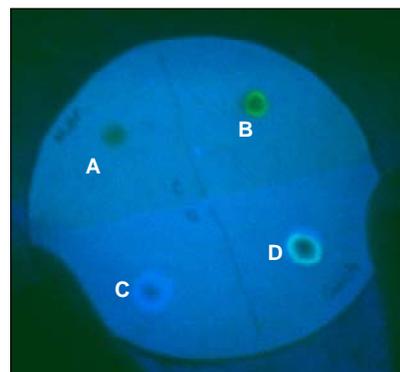


Figura 11: Ensayo de identificación de cumarinas por fluorescencia a 365 nm

A = *P. moralesii* sin KOH
C = *P. moralesii* al agregarle KOH
B = *P. cuchumatana* sin KOH
D = *P. cuchumatana* al agregarle KOH

Fuente: Proceso Experimental.

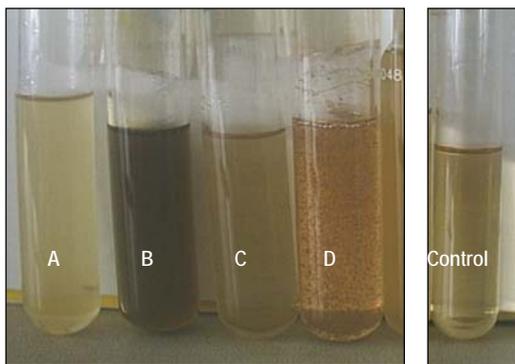


Figura 12: Ensayos de flavonoides y antocianinas en *P. cuchumatana*

A = Método de Dimroth (+)
B = Adición de FeCl_3 al 10% p/v (+)
C = Prueba para Leucoantocianinas (-)
D = Ensayo de Shinoda (+)

Fuente: Proceso Experimental.

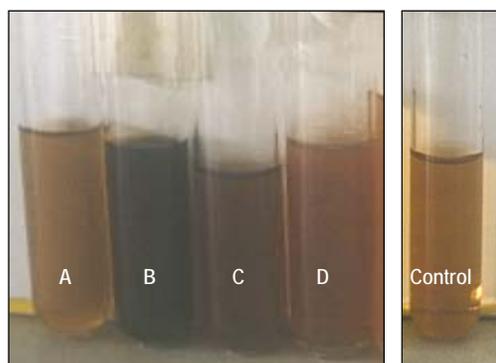


Figura 13: Ensayos de flavonoides y antocianinas en *P. moralesii*

A = Método de Dimroth (-)
B = Adición de FeCl_3 al 10% p/v (+)
C = Prueba para Leucoantocianinas (-)
D = Ensayo de Shinoda (+)

Fuente: Proceso Experimental.



Figura 14: CCF de principios amargos

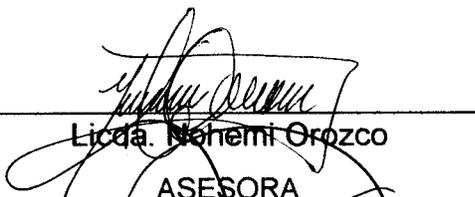
Est. = Extracto de *Neurolaena lobata* (estándar)
A = Extracto de *P. cuchumatana*
C = Extracto de *P. moralesii*

Fuente: Proceso Experimental.



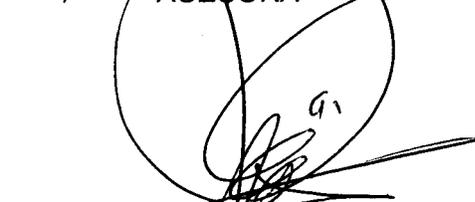
Br. Ellen Yvette Aguilar Ovando

AUTORA



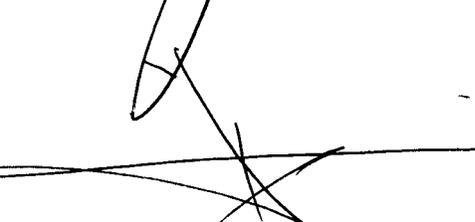
Licda. Nohemi Orozco

ASESORA



Ing. Agr. Mario Véliz

ASESOR



Lic. Jhoni F. Álvarez C.

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA



Dr. Oscar M. Cobar P.

DECANO