

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



**CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR
CROMATOGRFÍA DE GASES DE TRES ESPECIES DEL
GÉNERO PIPER Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
CITOTÓXICA**

Dafne Denisse Rivera Sagastume

Química Farmacéutica

Guatemala, Mayo de 2008

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



**CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR
CROMATOGRFÍA DE GASES DE TRES ESPECIES DEL
GÉNERO PIPER Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
CITOTÓXICA**

Informe de Tesis

Presentado por

Dafne Denisse Rivera Sagastume

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, Mayo de 2008

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes.....	3
3.1 Familia <i>Piperaceae</i>	3
3.2 Género <i>Piper</i>	3
3.3 <i>P. donnell-smithii</i>	5
3.4 <i>P. peltatum</i>	6
3.5 <i>P. diandrum</i>	7
3.6 Aceite esencial.....	8
3.7 Cromatografía de gases.....	9
3.8 Tamizaje Fotoquímico y Actividad Citotóxica.....	11
4. Justificación.....	13
5. Objetivos.....	14
6. Hipótesis.....	15
7. Materiales y Métodos.....	16
7.1 Universo de trabajo.....	16
7.2 Muestra.....	16
7.3 Materiales.....	16
8. Resultados.....	30
9. Discusión de Resultados.....	43
10. Conclusiones.....	45
11. Recomendaciones.....	46
12. Referencias.....	47
13. Anexos.....	50

1. RESUMEN

El presente trabajo se basó en la caracterización de los aceites esenciales que se encuentran en tres especies del género *Piper*. Las especies a estudiar fueron *Piper donnell smithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum*; Las tres especies tienen como nombre común cordoncillo.

En las tres especies se realizó un tamizaje fitoquímico en el cual se identificaron alcaloides, saponinas, flavonoides, antocianinas, cumarinas, aceites volátiles y principios amargos. La planta que obtuvo mayor cantidad de metabolitos secundarios fue *Piper peltatum*, las otras dos especies obtuvieron similitudes de resultados.

El aceite esencial a estudiar se obtuvo utilizando el destilador tipo Neocleavenger que permite atrapar el aceite por medio de una hidrodestilación y utilización de un solvente. Se calculó el porcentaje de rendimiento de aceite para cada especie. La que obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento fue *Piper donnell smithii* (0.619%), seguido por *Piper peltatum* (0.2118%) y por último *Piper diandrum* (0.1431%).

El aceite recolectado se utilizó para la caracterización de los aceites esenciales por medio de un cromatógrafo de gases acoplado a masas. En cada especie se observó diferentes componentes, obteniendo en *Piper donnell smithii* 34 componentes, en *Piper peltatum* 24 componentes y *Piper diandrum* el cual fue el mayoritario se obtuvieron 42 componentes los cuales fueron identificados por medio de un software integrado en el cromatógrafo.

Se evaluó la actividad citotóxica de los aceites esenciales de cada especie contra el "cámaron salino" (*Artemia salina*) en la cual se determinó la CL50 (concentración letal media) mediante el programa Finney, obteniendo los siguientes resultados para *Piper donnell smithii* 0.227mg/ml, para *Piper diandrum* 0.265mg/ml, al determinar las concentraciones de citotoxicidad ninguna presentó intervalo de confianza, es decir, no muestra un límite inferior y superior de concentración; Sin embargo la especie *Piper peltatum* presentó una CL50 de 0.306mg/ml con un intervalo de confianza al 95% de 0.059-0.766.

2. INTRODUCCIÓN

En varios países se utilizan los aceites esenciales de diferentes plantas, empleándolos como saborizantes de alimentos, carminativos, en perfumería y en la medicina. Además poseen propiedades antisépticas y propiedades antibacterianas, antimicrobianas y antifúngicas, éstas últimas han sido todas una serie de investigaciones. Indudablemente, la presencia de aceites esenciales en las especies previenen el crecimiento excesivo de bacterias evitando así su descomposición.

En Guatemala se describen aproximadamente 83 especies distribuidas en diferentes regiones del país, de las cuales existe muy poca información química o farmacológica reportada, por lo cual surge la necesidad de contribuir a estudios de especies que correspondan al género *Piper*, como *P. donnell smithii*, *P. peltatum*, *P. diandrum* para evaluar su composición química, validar el uso popular y determinar su citotoxicidad.

Estudios recientes han pretendido contribuir al estudio de las especies aromáticas y medicinales más importantes del género *Piper*, logrando identificar la naturaleza química de algunos principios activos con actividad biocida (sustancia química tóxica utilizada para erradicar las formas de vida no deseadas, especialmente en la agricultura). Por esta razón es importante continuar con el estudio de este género, realizando una investigación sobre la actividad citotóxica lo que permitirá un mejor aprovechamiento de los recursos naturales con los que cuenta el país y propiciará la explotación sostenible de nuevos productos.

3. ANTECEDENTES

3.1 FAMILIA PIPERACEAE

Las Piperaceas crecen en climas tropicales, subtropicales y templados; son hierbas ó arbustos. Esta familia comprende 10 géneros, siendo los principales: *Piper* y *Peperomia*. Estas plantas pueden ser erectas o postradas, tienen hojas alternadas, opuestas o verticiladas pueden o no tener glándulas aromáticas; de hojas enteras con nervadura pinnada o palmatinnada, venulada en cruz, no presenta meristemo basal persistente; con hidatodes comúnmente presentes y estomas anisocíticos o ciclocíticos. Los tallos tienen nodos, pueden ser articulados aéreos y subterráneos, presentan el tejido vascular primario en dos o más anillos, o en anillos pequeños esparcidos; el xilema sin fibras traqueidas pero con fibras libriformes. El tipo de reproducción es por polinización (son plantas hermafroditas); y por esquejes de los tallos, las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias tipo espada o espadices, son flores diminutas con brácteas succulentas sin perianto. El fruto es una dropa o baya y consta de una semilla (12.1).

3.2 GÉNERO PIPER

Está constituido por más de 700 especies, presenta tallos con nudos engrosados y las inflorescencias son espigas solitarias opuestas a las hojas que están dispuestas en forma alternada. Estas plantas se encuentran en una gran variedad de hábitats, las partes vegetativas a menudo presentan aromas cuando son estrujadas. Algunas especies del género *Piper* son utilizadas como condimento, en especial por sus frutos aromáticos y picantes (*P. nigrum*), y muchas de ellas se emplean en la medicina natural (12.2).

En el género *Piper* se ha reportado la presencia de metabolitos del ácido mevalónico (monoterpenos y sesquiterpenos), metabolitos del ácido acético y shikímico (flavonoides) y relacionados al ácido shikímico (lignoides, arilpropanoides, amidas, etc.). Los metabolitos más frecuentes aislados son: amidas (cinnamoilamidas y alquilamidas); aristolactamas y otros alcaloides, flavonoides (flavona, dihidroflavonas, dihidrochalconas y o-metilflavonoides) notándose que la o-glicosilación es rara (12.1).

Se han efectuado estudios en *Piper tuberculatum*, la cual es ampliamente distribuida en América desde Brasil hasta México, de ella han sido aisladas e identificadas siete amidas extraídas de las semillas con diclorometano-metanol, de las cuales dos resultaron

amidas isobutílicas y cinco piperidínicas las que mostraron una fuerte actividad contra *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium cladosporioides*(12.3).

En un estudio realizado en Costa Rica se obtuvo el aceite esencial de las hojas de *Piper terrabanum*, mediante el procedimiento de hidrodestilación, con un rendimiento de 0.10% en relación con el peso del material fresco. La composición del aceite se estudió utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). En el análisis se detectaron 78 señales y se identificaron 42 compuestos en forma total o parcial, correspondientes a un 90.2% del aceite. Los principales compuestos identificados fueron los hidrocarburos terpénicos β -cariofileno, germacreno-D, α -humuleno y α -pineno, y el alcohol sesquiterpénico *cis*-nerolidol. Es de resaltar en este estudio, la ausencia de fenilpropanoides como constituyentes del aceite esencial de este *Piper* y que son característicos en muchos de los aceites de estas plantas (12.2).

En un estudio realizado en tres Piperaceas panameñas, se identificó la composición química del aceites esencial de las hojas de *P. arboreum*, *P. fimbriulatum* y *P. obliquum*. Los principales constituyentes de *P. arboreum* fueron δ -cadineno, γ -copaeno y β -pineno; en el aceite de *P. fimbriulatum*, β -cariofileno y monoterpenos oxigenados como linalol y acetato de linalilo, en *P. obliquum* se identificó β -cariofileno, espatulenol y algunos sesquiterpenos no caracterizados previamente tales como 1,5-epoxisalvial-4 (14) eno y el β -selineno (12.4).

Se analizó el aceite esencial de *P. capense*, *P. nigrum*, *P. guineense* y *P. umbellatum* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) y RMN ^{13}C y se encontró que los constituyentes mayoritarios fueron monoterpenos para *P. capense* (β -pineno, β -cariofileno); *P. Nigrum* (limoneno, β -cariofileno, sabineno y β -pineno); *P. umbellatum* (β -pineno, α -pineno y (E)-neralidol) y derivados de fenilpropanoides encontrados en *P. guineense* (dilapiol y miristicina) (12.4).

En Guatemala se realizó un estudio en el cual se identificaron cinco especies del género *Piper* de las cuales cuatro son nativas y se distribuyen principalmente en Mesoamérica, dentro de éstas se mencionan: *P. aeruginosibaccum*, *P. hispidum*, *P. patulum*, *P. auritum* y *P. aduncum* con una distribución más amplia. De la extracción del aceite esencial y determinación del rendimiento se obtuvo como resultado que la especie que presenta mayor rendimiento es *P. auritum* (2.0%) seguida de *P. aduncum* (1.64%), *P.*

hispidum (0.46%), *P. patulum* (0.45%) y la de menor rendimiento es *P. aeruginosibaccum* (0.3%). En estas especies de Piper se identificaron monoterpenos como componentes mayoritarios y se observó que *P. auritum* y *P. hispidum* presentan mayor número de monoterpenos, seguido de *P. patulum*, *P. aeruginosibaccum* y *P. aduncum*. Mediante el tamizaje fitoquímico se identificaron flavonoides, saponinas, principios amargos, alcaloides y aceite esencial en todas las especies, cumarinas únicamente en *P. auritum*, y antraquinonas en muy poca cantidad en *P. auritum*, *P. asuncum*, *P. aeruginosibaccum* y *P. hispidum*. La evaluación de la actividad biológica se realizó mediante el método de dilución y el método de difusión en disco, el cual resultó más efectivo en el caso de aceites esenciales. Se evaluó la actividad de los aceites esenciales contra bacterias y levaduras presentando actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis* a una concentración menor de 0.1mg/ml, siendo *P. aeruginosibaccum* el que presenta mayor actividad. La evaluación contra *Candida albicans*, *Candida neoformans* y *Escherichia coli* no presentó crecimiento. En la actividad citotóxica se evaluaron los aceites esenciales a una concentración de 0.5mg/ml y se observó muerte total de los nauplios de *Artemia salina* en cuatro de los aceites evaluados excepto en *P. auritum*. Los aceites esenciales de Piper también presentaron actividad contra *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* a una concentración menor de 0.5mg/ml (12.4).

3.3 *Piper donnell smithii*

3.3.1 Nombre común: Cordoncillo.

3.3.2 Descripción botánica: Plantas erectas, generalmente de 1.5 a 6m de altura, tallos glabros, pétalos de un metro de longitud o usualmente cortos, escasamente vaginado pero dilatado en la base; hojas lanceoladas a ovado-orbiculares lustrosa, opacas de 11-15cm de largo y 3.5-5.5 de ancho, agudas en el ápice, la vena es prominente en el centro, los pedúnculos son de la misma longitud que los pecíolos (12.5).

3.3.3 Farmacología: De acuerdo a la revisión realizada en las diferentes bases de datos no existen datos publicados.

3.3.4 Química: De acuerdo a la revisión realizada en las diferentes bases de datos no existen datos publicados.

3.4 *Piper peltatum*

3.4.1 Nombre científico: Cordoncillo.

3.4.2 Hábitat: Bosques de tierras bajas o matorrales húmedos o lluviosos, algunas veces en guamiles. 600msnm o menos (12.5).

3.4.3 Distribución: Sur de México hacia Panamá, Indias Occidentales. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Izabal, Santa Rosa, Suchitepéquez, Retalhuleu y San Marcos (12.5).

3.4.4 Descripción botánica: Plantas erectas, rígidas, total o casi totalmente herbáceas, generalmente de cerca de 1.5m de altura, escasamente ramificadas, los tallos diminutamente puberulentos o casi glabros, succulentos; hojas largas, con pecíolo largo, ancho, largamente vaginado; láminas de las hojas muy delgadas, ovado-orbiculares, mayormente de 20 a 30cm de largo, algunas veces más anchas que largas, abruptamente agudas en el ápice que es redondeado, base suavemente cordada o redondeada, peltada o casi glabras, verde oscuro en el haz, más pálidas y punteadas en el envés, palmatinervadas desde el punto de inserción, el nervio principal usualmente divergente en 2 nervios que nacen en cada lado por encima de la base; comúnmente el pedúnculo es más pequeño que el pecíolo de 1 a 7cm de largo, glabro o escasamente puberulento con 4 a 10 espigas, que se encuentran en pedúnculos de 7 a 12mm de largo; espigas verde pálido, mayormente de 8 a 9cm de largo y 3.5mm de grosor, muy obtusas, las brácteas peburulentas (12.5).

3.4.5 Usos populares: La planta actúa como rubefaciente, tónico estomacal, como remedio para edemas y escorbuto. Las hojas se colocan en la cabeza para aliviar el dolor de cabeza. Cuando es aplicada en cataplasmas es emoliente y madurativa. El cocimiento de las hojas alivia la inflamación y enfermedades de la piel y actúa como estomáquico y diurético. Se dice que disuelve los cálculos renales. El cocimiento de las hojas se usa para inflamación linfática. Las hojas frescas son aplicadas como emolientes sobre el hígado o en los testículos para aliviar la inflamación de éstos. Las hojas estrujadas, calientes se aplican en tumores y úlceras. El cocimiento de las raíces es muy estimado como un diurético potente y para el tratamiento de gonorrea. La hoja calentada, aplicada

directamente se dice que cura espasmos musculares, dolor de cabeza y de estómago. Los baños del té de las hojas se usan como galactagogos. Las hojas secas se toman en infusión y se obtiene un efecto anticonceptivo (12.6).

3.4.6 Farmacología: Se utiliza para la malaria, como febrífugo, para inducir el aborto, problemas del hígado, mordida de serpiente, infecciones cutáneas, úlceras externas, urticaria, es digestivo, repelente de insectos, sudorífico, antiinflamatorio, anticonceptivo, para el dolor estomacal y la diarrea (12.7).

3.4.7 Química: De acuerdo a la revisión realizada en las diferentes bases de datos no existen datos publicados.

3.5 *Piper diandrum*

3.5.1 Nombre científico: Cordoncillo.

3.5.2 Hábitat: Bosques o matorrales húmedos a secos, abajo de 1650msnm, los más comunes abajo de 900msnm (12.5).

3.5.3 Distribución: Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Progreso, Izabal, Zacapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Suchitepequez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango, Sur de México, Honduras, El Salvador (12.5).

3.5.4 Descripción botánica: Arbusto o árbol, comúnmente de 2–6 metros de altura, con ramas esparcidas, aparentemente glabros, las ramas pequeñas son fuertes y glabros; los pecíolos son variados en altura regularmente de 2.5 – 7cm, pero algunas veces son los largos y usualmente glabros; las hojas son ovaladas a ovado-orbiculares, de 15-22cm de largo y 8.5-9cm de ancho, son delgadas y firmes, con base en cordada o redondeada, peltada o casi glabras, verde oscuro en el haz, más pálidas y punteadas en el envés; tiene nueve nervios, los cuales son prominentes; el pedúnculo mide 1.5-2.5cm de largo, es glabro; la espina delgada, mide 12-25cm de largo y 2-3cm de ancho, son curvados. La fruta es glabra y muy pequeña (12.5).

3.5.5 Farmacología: De acuerdo a la revisión realizada en las diferentes bases de datos no existen datos publicados.

3.5.6 Química: De acuerdo a la revisión realizada en las diferentes bases de datos no existen datos publicados.

3.6 ACEITE ESENCIAL

Son llamados así los constituyentes odoríferos o esencias de una planta. El término aceite esencial se origina probablemente del hecho que el aroma de una planta existe en las glándulas o entre las células en forma líquida, el cual al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua. La palabra esencial fue derivada del latín “quinta essentia” que significaba el quinto elemento, asignado a estos aceites, ya que la tierra, el fuego, el viento y el agua, fueron considerados los cuatro primeros elementos (12.8).

Pueden estar ubicados en las diferentes partes de la planta; por ejemplo, en las coníferas está en todo el tejido; en la rosa, sólo en el pétalo; en el comino, en las semillas; en el clavo de olor, en el brote o yema; en la lima, en los frutos; en la menta, en los pelos glandulares de las ramas y hojas; en el costus, en las raíces. Algunas plantas tienen un aceite esencial que difiere en composición a través de la planta, la canela en un ejemplo, el aceite esencial obtenido de las hojas contiene principalmente eugenol, de la corteza principalmente cinamaldehído y de la raíz del canfor (12.8).

Los aceites esenciales químicamente están formados por la mayoría de los monoterpenos y algunos sesquiterpenos y compuestos aromáticos (12.8).

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy variadas; son ampliamente utilizados en perfumería, como saborizantes de alimentos y en la medicina. Ejemplo: los aceites esenciales de anís, menta y canela son carminativos, el de clavo de olor es analgésico dental y se utiliza además en la producción comercial de vainillina; el de pino es desinfectante y desodorante; el de eucalipto es expectorante; los de valeriana y de lavanda tienen efectos sedantes. Cada uno de los componentes aislados puede también tener una aplicación como el citronelal que es el repelente de los mosquitos, el mentol como calmante de dolores de muela y de garganta, como anestésico y antiespasmódico;

el citral que tiene acción antihistamínica y es analgésica en oftalmología, el cíneol-1,8, es expectorante u antiséptico, etc. (12.8).

Los aceites esenciales son obtenidos del material fresco que los contiene utilizando principalmente el clásico procedimiento de destilación por arrastre de vapor;(9.9) el aceite esencial es secado posteriormente con sulfato de sodio anhidro. Otros métodos usuales son el de expresión del material vegetal, (9.9) extracción con solventes lipofílicos y el enflorado; éste último es bastante usado en perfumería y consiste en que los pétalos de una flor, por ejemplo, se colocan y presionan entre dos placas de vidrio impregnados de grasa, en las cuales se absorbe el aceite, el cual es luego extraído con alcohol. Para efectuar la caracterización química se utiliza la cromatografía de gases (12.10).

3.7 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases permite separar los componentes de una muestra vaporizada en virtud de que éstos se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida contenida en una columna. La muestra que se va a analizar se lleva a la fase gaseosa y se inyecta en una de las cabezas de la columna cromatográfica. La elusión de los componentes se realiza mediante el flujo de una fase gaseosa móvil que, a diferencia de la de otros métodos cromatográficos, es inerte y no interactúa con las moléculas de las especies de la muestra; sólo las transporta a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la de gas-líquido y la de gas-sólido. La primera, es la que tiene más aplicaciones en todos los campos de la ciencias y se le conoce comúnmente como cromatografía de gases. La cromatografía de gas-sólido tiene menos aplicaciones debido a que muchas moléculas reactivas o polares poseen tiempos de retención muy largos y las colas de los picos de elución no son aceptables (12.11).

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica de análisis que ofrece resoluciones excelentes con sensibilidad del orden de miligramos a picogramos. Los resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto. Los componentes de las muestras deben ser estables a la temperatura de operación, las muestras tiene que ser volátiles. La fase estacionaria es un líquido poco volátil que recubre un soporte sólido o las paredes de la columna. El mecanismo de separación se produce mediante partición de las moléculas de la muestra entre la fase estacionaria y la

fase móvil (líquida y gaseosa). Esta modalidad se utiliza en más del 95% de las aplicaciones de la cromatografía líquida debe solubilizar selectivamente las sustancias de la muestra, debe ser termoestable, presentar una baja volatilidad a la temperatura en la cual se realiza el análisis y ser químicamente inerte en relación con los componentes de la muestra (12.12).

3.7.1 Descripción de la técnica:

3.7.1.1 Fase móvil: La fase móvil gaseosa proporciona un rápido equilibrio entre las fases con mayor eficiencia en la obtención de los análisis. Los gases más utilizados son: nitrógeno, helio, hidrógeno y argón. La fase móvil no debe interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra, debe tener bajo costo, ser compatible con el detector y tener alta pureza. Para dar una mayor reproducibilidad al análisis, la saturación del gas debe ser constante y debe ser controlada a través de válvulas de aguja (12.12).

3.7.1.2 Sistemas de inyección: La inyección se realiza generalmente con microjeringas que contienen la muestra. El volumen inyectado no debe superar la capacidad de la columna y entre más pequeño sea el volumen usado de la muestra mayor será la eficiencia y la reproducibilidad del análisis. La temperatura aplicada debe ser suficiente para la volatilización de la muestra (12.12).

3.7.1.3 Columnas: La columna consiste en un tubo largo que contiene la fase estacionaria. Los materiales más usados son el cobre, el acero, el aluminio, el vidrio y el teflón. El material de la columna no debe interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra (12.12).

3.7.1.4 Sistema de detectores: Las sustancias presentes en la muestra pasan a través de la columna, en donde son separadas y llegan al sistema de detección. Con relación a la selectividad, los detectores pueden ser clasificados en universales y selectivos o específicos. Los detectores universales miden la variación de una propiedad del gas de arrastre que sale de la columna mientras que los detectores específicos miden una propiedad característica de una determinada clase de sustancias. Con relación a la sensibilidad, los detectores cuya respuesta varía poco por cambios en la velocidad de flujo de la fase móvil,

son llamados detectores sensibles de flujo de masa. En estos detectores la sensibilidad se define como la relación del área de pico a la masa inyectada. En los detectores sensibles a la concentración, la respuesta varía en función del flujo de la fase móvil y su sensibilidad se define como el producto del área del pico por el flujo de la fase móvil dividido por la masa inyectada (12.12).

La respuesta del detector debe ser lineal dentro de un amplio intervalo de concentraciones. Este intervalo de concentraciones se conoce como intervalo lineal dinámico y corresponde a la diferencia entre la concentración máxima del intervalo lineal dinámico y la mínima concentración del mismo y que debe distinguirse de la señal de fondo o ruido del detector. El análisis cuantitativo se puede llevar a cabo gracias a la relación directa que existe entre la respuesta del detector y la concentración de la muestra, siempre y cuando la respuesta obtenida para la muestra se encuentre dentro de ese intervalo (12.12).

3.7.2 Estudios de Aceites Esenciales:

La cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) para la separación y la identificación de la composición química de aceites esenciales, ha tenido un avance considerable, al punto de ser utilizada como rutina en varios laboratorios (12.12).

El estudio de la influencia del ciclo vegetativo en la producción de los aceites esenciales es un ejemplo de su aplicación ya que permite determinar la composición química del aceite en función del metabolismo vegetativo de la planta, además de evidenciar un eventual polimorfismo y, como consecuencia de estos resultados, el productor local de estos aceites esenciales, puede determinar el período correcto para la obtención de un producto de composición y calidad constante, con rendimientos óptimos (12.12).

3.8 TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor

interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fotoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del “screening” farmacológico (12.12).

El tamizaje de la actividad citotóxica consiste en poner de manifiesto la tolerancia de los nauplios (larvas de camarón salino) a una determinada concentración del extracto, fracción o compuesto en condiciones estándar previamente determinadas y verificar así que tan tóxico es el compuesto (9.13). También puede servir para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, es una prueba útil aunque no es selectiva para ninguna molécula química y su correlación con otras actividades no ha sido bien estudiada (12.14).

4. JUSTIFICACIÓN

Desde el punto de vista taxonómico, el estudio de los aceites esenciales ha servido como una ayuda en la definición de especies, en la detección de híbridos existentes en poblaciones naturales y en la confirmación de razas geográficas dentro de una misma especie. Este conocimiento puede ayudar a la detección de posibles razas químicas y a observar el efecto de factores ecológicos o geográficos sobre diversas poblaciones de plantas.

Los aceites esenciales en algunas especies como en el caso del género *Piper* son utilizadas como condimento, en especial por sus frutos aromáticos y picantes (*P. nigrum*), y muchas de ellas se emplean en la medicina natural. En algunos estudios se ha podido ampliar el conocimiento sobre la actividad química que poseen los principios activos de los aceites esenciales de algunas especies del género *Piper*. Estudios recientes demostraron como pueden actuar estos principios activos como biocidas matando diferentes microorganismos que de cierta forma perjudican a la población.

El género *Piper* ha sido muy estudiado en otros países como en Brasil, Costa Rica, y otros, mostrando diferentes usos, es por eso la importancia de este estudio ya que en Guatemala este género se encuentra muy distribuido pero ha sido poco estudiado y no se le ha dado la importancia que debería, por lo tanto se desea darle seguimiento a la investigación de las especies del género *Piper* para encontrar en ella diferentes actividades como en el caso de esta investigación actividad citotóxica.

5. OBJETIVOS

Objetivo General:

5.1 Caracterizar los aceites esenciales presentes en tres especies del género *Piper* por cromatografía de gases y evaluar la actividad citotóxica de los mismos.

Objetivos Específicos:

5.2 Identificar los constituyentes presentes en el aceite esencial de las especies *Piper donnell smithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum* por medio de cromatografía de gases.

5.3 Evaluar la actividad citotóxica de las especies *Piper donnell smithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum* contra *Artemia salina*.

5.4 Caracterizar mediante tamizaje fitoquímico los metabolitos secundarios presentes en las especies *Piper donnell smithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum*.

6. HIPÓTESIS

Las especies del género *Piper donnell smithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum* presentan metabolitos secundarios y los aceites esenciales poseen actividad citotóxica.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de trabajo:

Tres especies del género *Piper*, *Piper Donnell Smithii*, *Piper peltatum*, *Piper diandrum*.

7.2 Muestra:

Aceites esenciales de las tres especies del género *Piper*, *Piper Donnell Smithii*, *Piper peltatum*, *Piper diandrum*.

7.3 Materiales:

7.3.1 Recursos Humanos:

7.3.1.1 Autora:

Dafne Denisse Rivera Sagastume

7.3.1.2 Asesora:

Lcda. Sully Margot Cruz, M. A.

7.3.1.3 Revisora:

Lcda. Beatriz Eugenia Medinilla Aldana

7.3.2 Recursos Físicos:

7.3.2.1 Instalaciones:

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)

Laboratorio de Toxicología del Centro de Información y Asesoría Toxicológica (CIAT)

7.3.2.2 Materiales y Equipo:

7.3.2.2.1: Equipo:

Cromatógrafo de gases Hewlett Pakar modelo 5890 serie II con detector selectivo de masas, columna HP5 de 30 metro de largo y 0.5µm de espesor de la fase líquida con un diámetro interno de 0.64 pulgadas.

Destilador Neocleavenger.

Sistema de enfriamiento o circulación de agua.

Evaporador rotativo.

Balanza.

Estereoscopio.
Estufa.
Lámpara de luz blanca.
Pecera para cultivo.
Campana de Flujo Laminar.
Incubadora.
Pipeta automáticas.
Refrigeradora.
Manta de calentamiento.
Bomba de oxígeno para pecera.
Computadora Finney (DOS).
Câmaras cromatográficas.
Cromatofolios de aluminio de silica gel 60 F254 o placas de vidrio.
Lámpara de luz UV.

7.3.2.2 Materiales:

Balón de 1000ml.
Balón con boca esmerilada de 125ml.
Pipetas Pasteur.
Viales de vidrio de ½ dracma.
Bulbo de hule o manguera de hule con boquilla.
Embudo.
Huevos de *Artemia salina*.
Marcador indeleble.
Microplaca.
Papel filtro.
Puntas amarillas de 200µL.
Puntas azules de 100µL.
Sal de mar.
Termómetro.
Vaso de precipitar de 2 L.
Disolventes orgánico (hexano, pentano o xileno).
Balón de evaporación.
Condensador.

Balón de colecta.
Microplaca.
Reactivos específicos para cada metabolito.
Tubos de ensayo.
Erlenmeyer.
Micropipetas.
Probetas.
Perillas de succión.
Baño María.
Asperjador de vidrio.
Agitador magnético.
Regla.

7.3.3 Procedimiento:

Las técnicas utilizadas se basaron en el Manual de Operaciones de Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (12.8, 12.12, 12.15-12.20).

7.3.3.1 Tamizaje fitoquímico:

El tamizaje (screening) fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y análisis por cromatografía en capa fina. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensible, reproducibles y de bajo costo.

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. Una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuido sobre una placa de vidrio o aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el

vapor del eluente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluente migra por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla. Después que ha ocurrido, se evapora el eluente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz Visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

Rf: Factor de retención, es la medida de la migración de una sustancia determinada en un disolvente dado.

$$\text{Rf: } \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

7.3.3.1.1 Investigación de alcaloides:

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

Tubo 1: agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's. (Color blanco a crema).

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff. (Color rojo a naranja).

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner. (Color marrón).

Tubo 4: testigo.

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

Preparación de Reactivos:

Mayer's (yoduro de mercurio y potasio)

- a. 1.36g de HgCl_2 / 60mL H_2O
- b. 5g KI / 10mL H_2O
- c. Mezclar y diluir a 100mL.

Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)

- a. 8g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / 20mL HNO_3
- b. 27.2g KI / 50mL H_2O

c. Mezclar, reposar, decantar sobrenadante. Diluir a 100mL.

Wagner (yodo-yoduro de potasio)

a. 1.27 g I₂ + 2 g KI / 5mL H₂O

b. Diluir a 100mL.

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

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10); acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), cloroformo- dietilamina (90:10); acetona-agua-amonió concentrado (90:7:3)

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365nm algunos fluorescen azul o amarillo.

Reactivo de Dragendorff: zonas cafés o naranjas en visible, los colores no son estables.

7.3.3.1.2 Investigación de saponinas:

Prueba de espuma:

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

Tubo 2: 2mL de control de saponinas (0.5 %).

Tubo 3: 2mL de agua.

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

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

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

Detección:

Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

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

(Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas). (Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas).

7.3.3.1.3 Investigación de taninos:

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

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10%).

Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

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

Con cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol; negro-azulado: pirogalol)

7.3.3.1.4 Investigación de flavonoides y antocianinas:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 3g de material vegetal pulverizado con 10mL de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15mL de éter de petróleo hasta

que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30mL de metanol al 80 por ciento, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5mL de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético.

Tubo 7: testigo.

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

Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

Cromatografía en capa fina: Extraer 1g de material vegetal seco pulverizado con 10mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µL). (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10)

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365nm.

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

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

Aplicar a la placa vapores de amoniaco para intensificar el color de las manchas.

7.3.3.1.5 Investigación de antraquinonas:

Prueba de Bornträger: Extraer 3g de material vegetal pulverizado con 10mL de etanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar en baño de maría (60°C). Disolver el residuo con 30mL de agua destilada y filtrar. Extraer con 10mL de benceno. A la fase bencénica añadir 5mL de solución de test de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

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

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

Estándar: solución al 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas (10µL). (Aloína, flangulina A/B, glucofrangulina A/B y sus agliconas, reina, aloe- emodina, extracto de sen)

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), acetato de etilo- metanol-agua (100:13.5:10).

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento.

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

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

7.3.3.1.6 Investigación de cumarinas:

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

Cromatografía en capa fina: A 1g de material vegetal adicionar 10mL de metanol y calentar 30 minutos en baño de maría. Filtrar y evaporar hasta 1mL. Aplicar 20µL en una cromatoplaqueta de sílica gel 60 F₂₅₄. Utilizar como estándar canela en metanol al 1 por ciento, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina.).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7); tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50mL de tolueno y 50mL de éter son mezclados durante 5 min con 50mL de ácido acético al 10%, se filtra y se descarta la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter es usada).

Detección:

Sin tratamiento químico UV 254nm fluorescencia. UV 365 nm todas las cumarinas muestras una intensa fluorescencia azul o verde- azul.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%. UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

7.3.3.1.7 Investigación de aceites volátiles:

Cromatografía en capa fina:

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

Disolver en 1mL de tolueno y aplicar 20-50µL en cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄.

Método B: Pesar 10-50g (dependiendo del tipo de droga) de material vegetal y destilar con arrastre de vapor por 1 hora. Recolectar el aceite esencial en xileno. Diluir la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y aplicar 5 μ L (1:10) en cromatoplaaca de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3 μ L).

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

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

7.3.3.1.8 Investigación de principios amargos:

Cromatografía en capa fina: Calentar 1g de material vegetal con 10mL de metanol en baño de María a 60°C por 10 minutos. Evaporar y filtrar a 2mL. Aplicar en la cromatoplaaca. Estándar: artemisina al 1 por ciento en metanol (20 μ L).

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

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

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

7.3.3.2 Extracción y determinación del porcentaje de rendimiento del aceite esencial a partir de la materia vegetal de las tres especies de género *Piper* *P. Donnell Smithii*, *P. peltatum* y *P. diandrum* utilizando el destilador tipo Neocleavenger. (12.12, 12.15-12.16, 12.20-12.21)

6.3.3.2.1 Preparación de la muestra:

- Moler 100g de materia seca vegetal y pesar 50g del material molido.
- Introducir los 50g de material molido en un balón de destilación de 1000ml.

- Agregar aproximadamente de 400-500ml de agua destilada hasta cubrir los 50g del material.

7.3.3.2.2 Uso del destilador tipo Neocleavenger:

- Instalar el destilador de aceites esenciales (ver figura No. 1), conectar el balón de destilación con el recipiente colector.
- Conectar la bomba que circula la solución de enfriamiento poner el refrigerante.
- Llenar con agua el tubo N hasta el nivel B del tubo graduado.
- Agregar 2ml de un disolvente orgánico (pentano) en el tubo K utilizando una pipeta Pasteur y colocar el tapón al tubo hasta que empiece a destilar el aceite.
- Destilar a temperatura constante durante 2-3 horas o según lo especifique la literatura para cada especie, mantener el flujo de destilación de 2-3ml por minuto.
- Determinar el tiempo de destilación a partir que empieza a obtenerse el aceite.
- Medir la capa superior de aceite esencial recogido en el recipiente graduado.
- Esperar 10 minutos después de terminar el calentamiento antes de colectar el aceite.
- Abrir la llave, dejar caer el agua y descartarla. Recibir la parte orgánica en un balón de 125ml y agregar al tubo K aproximadamente 1ml de disolvente orgánico utilizado anteriormente, para lavar y arrastrar todo el aceite recuperado.
- Eliminar el disolvente orgánico utilizando rotavapor.
- Pesar el aceite obtenido, verterlo en vial color ámbar y almacenar a 4°C.
- Determinar el porcentaje de rendimiento a partir del peso del aceite entre el peso de la materia vegetal por cien.
- Lavar el destilador con suficiente metanol y agua destilada para dejarlo completamente limpio y evitar cualquier contaminación cruzada en la siguiente corrida.

7.3.3.3 Determinación de los componentes del aceite esencial por medio de cromatografía de gases.

Las muestras se preparan tomando 2µL del aceite y se diluyen a 1ml con metanol. Los extractos obtenidos se inyectan al cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas para su identificación.

El cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas tiene una columna HP5 de 30 metro de largo y 0.5 µm de espesor de la fase líquida con un diámetro interno de 0.64 pulgadas de columna capilar.

La rampa utilizada para la separación es la siguiente:

- La temperatura del puerto de inyección es de 250°C
- La temperatura del detector es de 280°C
- La temperatura de la columna inicial es de 50°C con un tiempo de espera de 3 minutos y luego un incremento de 20°C por minuto hasta llegar a 250°C

El cromatógrafo de gases tiene para la identificación de las sustancias presentes en la muestra una librería (Chem Statium) en la cual contiene la mayor parte de sustancias químicas identificadas por su número de CAS lo que le permite sin necesidad de inyectar patrones la identificación inequívoca por comparación de iones de los aceites presentes en la muestra.

7.3.3.4 Tamizaje de la actividad citotóxica contra "Camarón salino" (*Artemia salina*): (12.22-12.28)

Artemia salina es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son sensibles a una gran variedad de sustancias. Habita en lagos salinos de todo el mundo. Es tolerante a un amplio rango de concentraciones de sal, desde agua fresca hasta aguas saturadas de sal. Los nauplios de *A. Salina* son utilizados como organismos blanco para detectar la bioactividad de compuestos extraídos de plantas y la toxicidad a estos crustáceos presenta una buena correlación con actividad antitumoral y anti -*T cruzi*. El tamizaje de la actividad citotóxica consiste en poner de manifiesto la tolerancia de los nauplios a una determinada concentración (1000mg/ml) del extracto, fracción o compuesto en condiciones estándar previamente determinadas.

7.3.3.4.1 Preparación del agua de mar:

- Disolver 35g de la sal de mar en un litro de agua destilada.

- Hacer una marca en el vaso de precipitar para indicar el volumen de agua.
- Hervir por 30 minutos y completar el volumen que se evaporó según la marca.
- Filtrar y refrigerar hasta el momento de usar, es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

7.3.3.4.2 Cultivo de *Artemia salina*:

- Colocar en un vaso de precipitar 200ml del agua de mar y airear por 30 minutos.
- Colocar el agua en la pecera y agregar 40mg de huevecillos en el área cerrada lado oscuro.
- Incubar por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).

7.3.3.4.3 Determinación de la Citotoxicidad:

- Pesar 0.040g del extracto a ensayar y disolver con 2ml de agua de mar. Agregar por triplicado en una microplaca; 100µL del extracto disuelto + 100µL de agua de mar con 10-15 nauplios.
- Control negativo: 100µL de agua de mar, 100µL de agua de mar con 10-15 nauplios.
- Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
- Contar en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

7.3.3.5 Diseño de la Investigación:

Se realizó un análisis cualitativo al identificar los componentes de los aceites esenciales por medio de un cromatógrafo de gases, estos aceites fueron extraídos utilizando el destilador Neoclevenger y se cuantificó el porcentaje de aceite que se obtuvo.

Para evaluar la actividad citotóxica se utilizó estadística no paramétrica, se evaluó la presencia o ausencia de muertes con respecto a los nauplios poniendo de manifiesto la tolerancia de éstos a determinadas concentraciones del extracto. La DL50 se determinó con el siguiente procedimiento:

Calculó del % de camarones muertos:

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

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

Dividir X dentro de Y y multiplicarlos por 100.

Si el % de camarones muertos es mayor a 50%, repetir la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5 y 0.25mg/ml. Obtener los valores de X y Y en cada dosis y determinar el valor CL_{50} con el programa de computadora Finney (DOS). Si el % es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1mg/ml. Los resultados se presentaron por medio de estadística descriptiva.

8. RESULTADOS

8.1 Tamizaje Fitoquímico:

Las pruebas cualitativas (precipitación, coloración, test de espuma, otros) evidenciaron la presencia de ciertos metabolitos por lo que se realizó la Cromatografía de capa fina. En el cuadro No. 1 se muestran las pruebas cualitativas y en el Cuadro No. 2 se muestran las diferentes bandas obtenidas utilizando el método de la cromatografía de capa fina.

Cuadro No. 1

Especie Pruebas	<i>P. donnell smithii</i>	<i>P. peltatum</i>	<i>P. diandrum</i>
Alcaloides	No hay presencia de precipitado, sin embargo hay cambio de color con los tres reactivos utilizados (+)	No hay presencia de precipitado, sin embargo hay cambio de color con los tres reactivos utilizados (+)	Solamente presentó cambio de color con el reactivo Dragendorff y Wagner (+)
Saponinas	Presentó 0.7cm de espuma (+)	Presentó 1.5cm de espuma (+)	Presentó 0.6cm de espuma (+)
Taninos	No se presentó ninguna reacción (-)		
Flavonoides y Antocianinas	Los 5 tubos examinados algunos presentaron una coloración amarilla palida con sospecha de isoflavonas, otros no presentaron coloración por lo que se sospecha la presencia de isoflavononas, chalconas y auronas		
Antraquinonas	No se presentó ninguna reacción (-)		
Cumarinas	Las tres plantas reaccionaron con el hidróxido de potasio dando una coloración verde (+)		

Cuadro No. 2

Especies Pruebas	<i>P. donnell smithii</i>		<i>P. peltatum</i>		<i>P. diandrum</i>	
	No. Bandas	RF	No. Bandas	RF	No. Bandas	RF
Alcaloides	4	Rf1= 0.33 Rf2=0.58 Rf3=0.77 Rf4=0.93	4	Rf1= 0.10 Rf2=0.30 Rf3=0.48 Rf4=0.71	2	Rf1= 0.30 Rf2=0.61
Saponinas	2	Rf1= 0.22 Rf2=0.54	3	Rf1= 0.22 Rf2=0.33 Rf3=0.53	2	Rf1= 0.16 Rf2=0.82
Flavonoides y Antocianinas	1	Rf1= 0.11	9	Rf1= 0.04 Rf2=0.11 Rf3=0.21 Rf4=0.25 Rf5=0.32 Rf6=0.40 Rf7=0.56 Rf8=0.75 Rf9=0.83	2	Rf1= 0.07 Rf2=0.58
Aceites volátiles	7	Rf1= 0.12 Rf2=0.19 Rf3=0.27 Rf4=0.45 Rf5=0.68 Rf6=0.77 Rf7=0.93	5	Rf1= 0.18 Rf2=0.27 Rf3=0.44 Rf4=0.57 Rf5=0.93	7	Rf1= 0.19 Rf2=0.27 Rf3=0.37 Rf4=0.43 Rf5=0.55 Rf6=0.63 Rf7=0.92
Principios amargos	2	Rf1= 0.91 Rf2=0.95	6	Rf1= 0.04 Rf2=0.11 Rf3=0.16 Rf4=0.76 Rf5=0.93 Rf6=0.98	4	Rf1= 0.16 Rf2=0.87 Rf3=0.91 Rf4=0.96

8.2 Porcentaje de Rendimiento del Aceite Esencial:

En el cuadro No. 2 se muestra los % de rendimiento del aceite extraído de las tres especies evaluadas. La planta *P. donnell smithii* presentó mayor rendimiento de aceite y el de menor rendimiento fue *P. diandrum*.

Cuadro No. 3

Especie	Aceite obtenido (g)/50g Promedio / Desviación Estándar	Aceite obtenido (%)
<i>P. donnell smithii</i>	0.1775 +/- 0.062	0.6190
<i>P. peltatum</i>	0.0780 +/- 0.054	0.2118
<i>P. diandrum</i>	0.0572 +/- 0.004	0.1431

8.3 Constituyentes identificados por Cromatografía de Gases con detector selectivo de masas:

8.3.1 *P. donnell smithii*: se identificaron 34 compuestos y el de mayor abundancia fue el espatulenol.

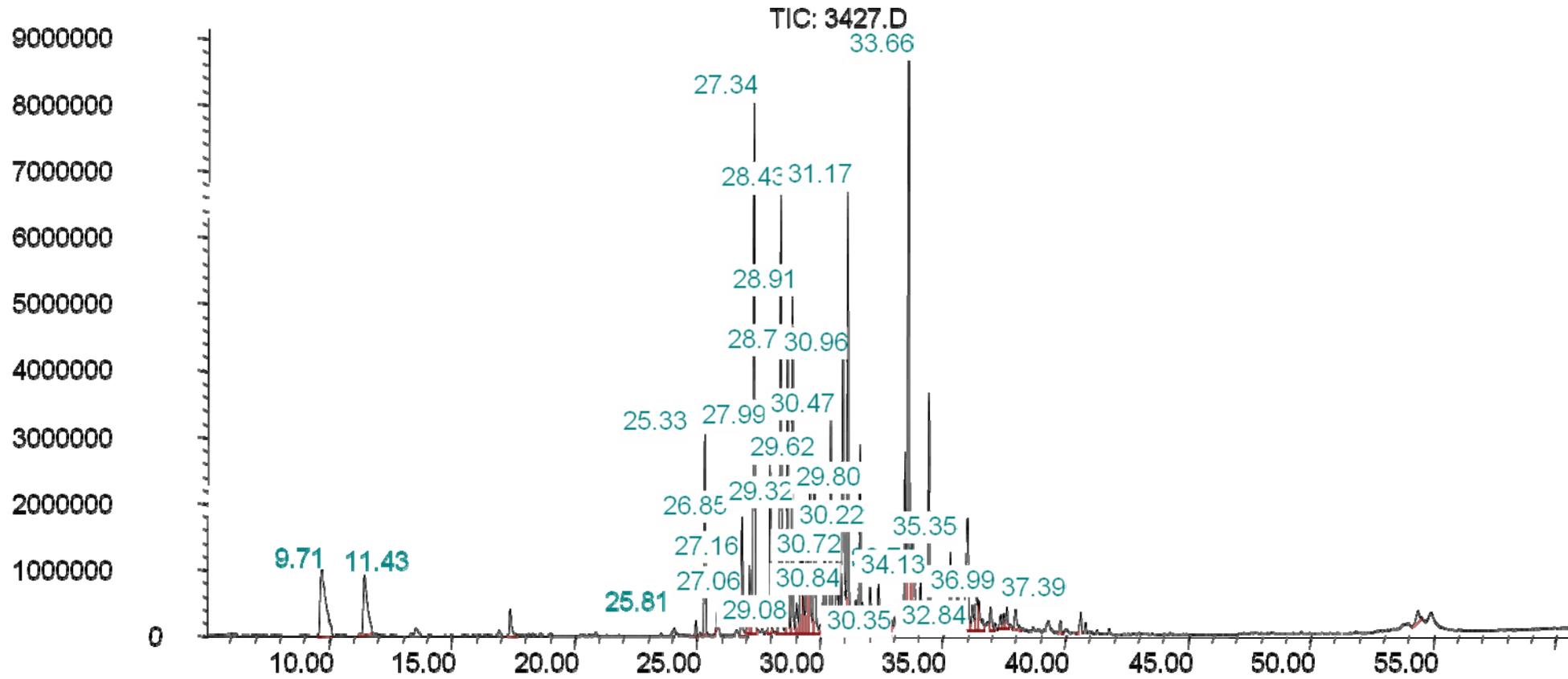
Cuadro No. 4

Tiempo de Retención (minutos)	Compuesto	% de abundancia
9.71	α -pineno	3.45
11.43	β -pineno	2.31
25.33	Bicicloelemeno	2.19
25.81	α -cubebeno	0.16
26.85	Triciclo α -copaeno	1.47
27.06	Azuleno γ -gurjuneno	0.48
27.17	β -bourboneno	0.79
27.34	β -elemeno	6.57
27.99	α -gurjuneno	2.01
27.99	Naftaleno	2.01

28.43	β –cariofileno	6.14
28.71	1,5 ciclodecano germacrano	3.65
28.71	Ciclohexano γ -elemeno	3.65
28.91	α -guaieno	4.70
29.08	Aloaromadendrano	0.56
29.32	Trans- β -farneseno	1.33
29.62	α -humeleno	2.53
29.80	Aromadendrano	2.49
30.22	α -copaeno	1.87
30.35	β –selineno	0.44
30.46	β –cubebeno	2.75
30.46	D-germacrano	2.75
30.71	Neolocimeno	1.27
30.83	6,10,11,11-Tetrametil- tricyclo	0.86
30.83	Naftaleno δ -cadineno	0.86
30.97	B-germacrano	4.47
30.97	Biciclo – germacrano	4.47
31.16	δ -guaieno	5.59
32.85	E,E- α .-farneseno	0.33
33.66	Espatulenol	8.72
34.13	Veridiflorol	0.94
35.35	Isospatulenol	1.08
36.99	3,4'-difluoro-4- metoxibifenil	0.45
37.39	Trans-cariofileno	0.25

Gráfica No. 1

Abundance



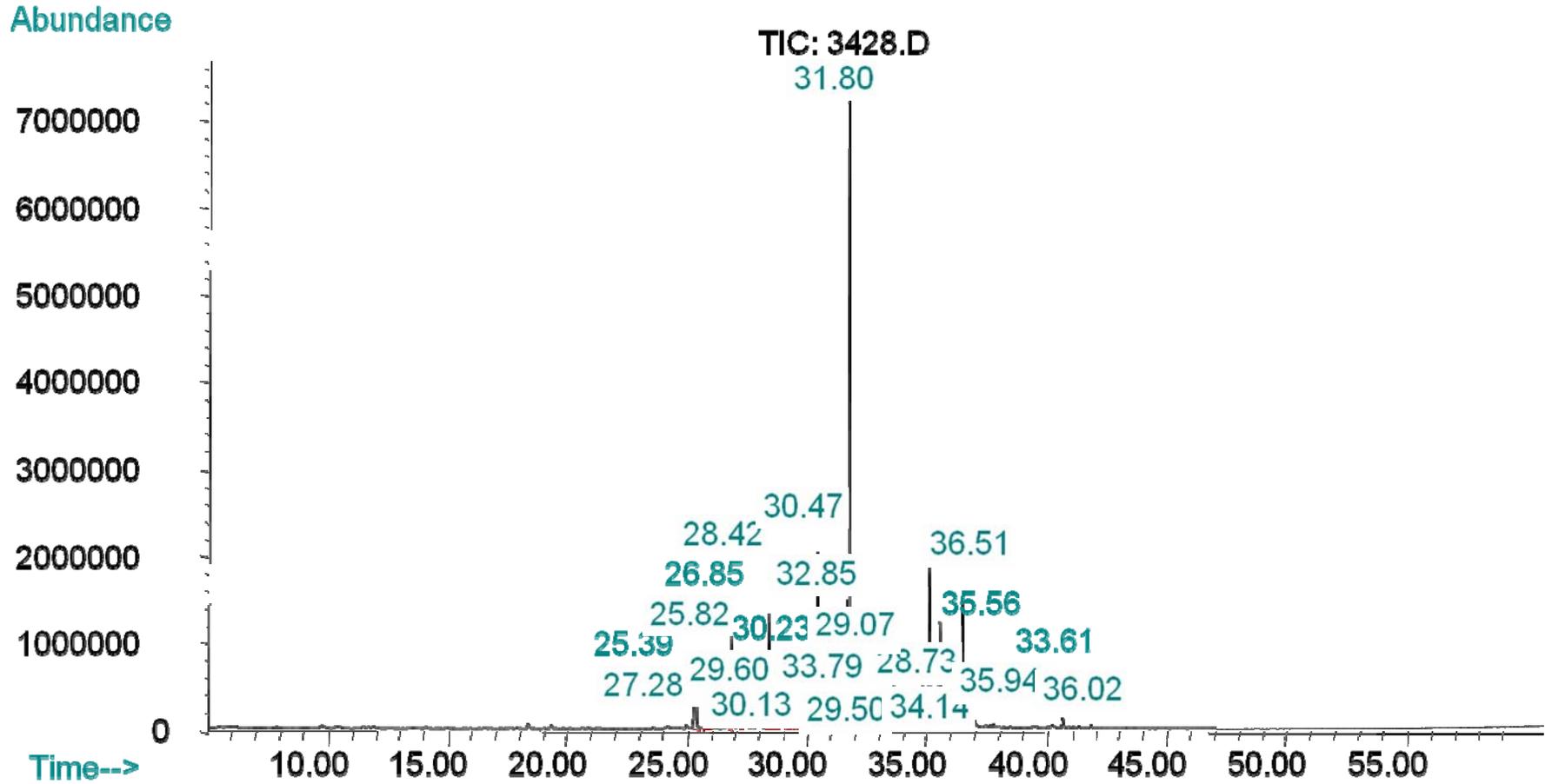
Time-->

8.3.2 *P. peltatum*: se identificaron 24 compuestos y el de mayor abundancia fue el 1S,CIS-Calameneno.

Cuadro No. 5

Tiempo de Retención (minutos)	Compuesto	% de abundancia
25.39	Ciclohexano- δ -elemeno	3.66
25.83	α -cubebeno	2.83
26.86	Triciclo- α -copaeno	2.88
27.28	β -cubebeno	1.46
28.42	β -cariofileno	5.22
28.73	Epi-biciclosesquifelandreno	1.68
29.07	(+)-aromadendrano	0.71
29.50	Naftaleno epsilon-muroleno	0.66
29.50	α -morfeno	0.66
29.60	α -humeleno	0.81
29.60	4,7,10-Cicloundecatrieno	0.81
30.13	Naftaleno δ -cadineno	0.73
30.23	α -amorfeno	1.80
30.23	Naftaleno γ -cadineno	1.80
30.47	D-germacrano	5.82
31.17	δ -cadineno	0.76
31.80	1S,CIS-Calameneno	24.32
32.85	Nerodilol	0.96
33.61	(-)-Espatulol	1.70
33.79	B-germacrano	0.49
34.14	Veridiflorol	0.68
35.94	α -cadinol	1.26
36.01	1,3,3-trimethyl-2-ciclohexanol	1.22
36.51	1,6-dimetil-4-(1-metil) Naftaleno	4.66

Gráfica No. 2



8.3.3 *P. diandrum*: se identificaron 42 compuestos y el de mayor abundancia fue el β - elemeno

Cuadro No. 6

Tiempo de Retención (minutos)	Compuesto	% de abundancia
9.78	α -pineno	0.74
11.02	Fenilmetan-benzaldehido	4.68
11.53	β -terpineno	0.95
12.79	β -pineno	0.82
12.79	γ -terpineno	0.82
23.98	Timol	0.15
24.98	Bicicloelemeno	0.30
25.82	α -cubeneno	0.31
25.82	α -ilangeno	0.31
26.86	α -copaeno	0.99
27.40	β -elemeno	21.12
28.46	Trans- β - cariofileno	9.23
28.75	B -cubebeno	0.75
29.08	Aloaromadendrano	0.75
29.33	Cadineno	2.04
29.49	Cicloisolongifoleno	0.55
29.61	α -humeleno	1.18
29.81	α -amorfenno	0.24
29.81	Aromadendrano	0.24
29.84	Epi-biciclosesquifelandrano	0.31
30.21	α -gurjuneno	1.94
30.21	β -patchouleno	1.94
30.35	(-)-ar-curcumeno	0.28
30.48	D-germacrano	2.71
30.74	β -selineno	2.82
30.99	Biciclogermacrano	7.26
31.18	B -bisaboleno	0.58

31.50	γ -cadineno	0.85
31.67	δ -cadineno	2.21
31.77	1S,CIS-calameneno	0.58
32.09	Cadina-1,4-dieno	0.23
32.23	α -cadineno	0.25
32.23	α -muroleno	0.25
32.61	Elemol	0.51
32.86	Nerolidol	1.94
33.08	Cis-asarona	0.51
33.66	Espatulenol	7.98
33.88	Eremofileno	1.96
35.36	Isoespatulenol	0.68
36.10	(+)-5-Epi-neointermedeol	5.04
40.68	Neofitadieno	0.77
40.88	6,10,14-trimethyl 2-pentadecaneno	1.12

8.4 Comparación de la Composición Química de los Aceites Esenciales entre las especies estudiadas:

Cuadro No. 7

<i>P. donnell smithii</i>	<i>P. peltatum</i>	<i>P. diandrum</i>
α -pineno	-----	α -pineno
β -pineno	-----	β -pineno
Triciclo α -copaeno	Triciclo- α -copaeno	-----
α -cubebeno	α -cubebeno	α -cubebeno
β -cubebeno	β -cubebeno	β -cubebeno
β -elemeno	-----	β -elemeno
-----	α -amorfenol	α -amorfenol
α -humeleno	α -humeleno	α -humeleno
α -copaeno	-----	α -copaeno
Aloaromadendrano	-----	Aloaromadendrano
D-germacrano	D-germacrano	D-germacrano
Aromadendrano	(+)-Aromadendrano	Aromadendrano
β -selineno	-----	β -selineno
B-germacrano	B-germacrano	-----
Biciclo - germacrano	-----	Biciclo-germacrano
Espatuleno	(-)-Espatuleno	Espatuleno
Isospatuleno	-----	Isospatuleno
Veridiflorol	Veridiflorol	-----
β -cariofileno	β -cariofileno	-----
Bicicloelemeno	-----	Bicicloelemeno

8.5 Actividad Citotóxica:

Se evaluaron los aceites esenciales a una concentración de 1.0mg/ml y se observó muerte total de los nauplios de *Artemia salina* en los tres aceites de las especies evaluadas, por lo que se realizó de nuevo la prueba con diferentes dosis, las cuales fueron a 0.5mg/ml, 0.25mg/ml y 0.125mg/ml y se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro No. 8

Evaluación de citotoxicidad a una concentración 1.0mg/ml:

Especie	Nauplios vivos al inicio de la prueba			Nauplios vivos al final de la prueba		
	<i>P. donnell smithii</i>	12	13	12	0	1
<i>P. peltatum</i>	11	11	13	2	4	6
<i>P. diandrum</i>	14	14	12	0	0	0

Cuadro No. 9

Evaluación de citotoxicidad a una concentración 0.5mg/ml:

Especie	Nauplios vivos al inicio De la prueba			Nauplios vivos al final de la prueba		
	<i>P. donnell smithii</i>	10	14	11	3	8
<i>P. peltatum</i>	14	13	11	6	3	5
<i>P. diandrum</i>	13	14	14	6	8	7

Cuadro No. 10

Evaluación de citotoxicidad a una concentración 0.25mg/ml:

Especie	Nauplios vivos al inicio De la prueba			Nauplios vivos al final de la prueba		
	<i>P. donnell smithii</i>	12	12	10	6	5
<i>P. peltatum</i>	12	10	12	7	6	8
<i>P. diandrum</i>	11	14	10	7	8	6

Cuadro No. 11

Evaluación de citotoxicidad a una concentración 0.125mg/ml:

Especie	Nauplios vivos al inicio De la prueba			Nauplios vivos al final de la prueba		
	<i>P. donnell smithii</i>	10	12	13	6	7
<i>P. peltatum</i>	11	14	11	6	7	7
<i>P. diandrum</i>	12	12	11	8	6	5

Cuadro No. 12

CL50 de las tres especies evaluadas:

Especie	DL50 mg/ml	Intervalo de confianza al 95%
<i>P. donnell smithii</i>	0.227	No presentó un intervalo de confianza
<i>P. peltatum</i>	0.306	0.059-0.766
<i>P. diandrum</i>	0.265	No presentó un intervalo de confianza

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se evaluaron tres especies del género *Piper*, siendo estas *Piper donnell smithii*, *Piper peltatum* y *Piper diandrum*. Se realizó un tamizaje fitoquímico el cual permitió identificar de los metabolitos secundarios presentes en las especies, se determinó la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, antraquinonas, aceites volátiles, principios amargos y cumarinas. En el cuadro No.2 se puede observar que la planta que presentó mayor cantidad de bandas en la cromatografía de capa fina para cada metabolito secundario fue *P. peltatum*, las otras dos especies presentaron resultados similares en cuanto al tamizaje.

En la extracción de aceite esencial se observó que *P. donnell smithii* presenta un mayor rendimiento de aceite (0.6%), seguida por *P. peltatum* (0.2%) y la que presentó menor rendimiento fue *P. diandrum* (0.1%). Luego que se realizó la extracción de los aceites, éstos se utilizaron para realizar la caracterización, es decir determinar que componentes contiene cada aceite y se determinó que en *P. donnell smithii* se encontraron 34 diferentes tipos de aceites esenciales siendo el de mayor cantidad el espatulenol, con respecto *P. peltatum* se determinaron 24 aceites, siendo el mayoritario el Cis-calamenano y con *P. diandrum* se encontraron 42 compuestos siendo el mayoritario β -elemeno. Se realizó un cuadro comparativo (Cuadro No. 7) con respecto a los compuestos encontrados y se puede observar que algunos de ellos se encuentran ya sea en las tres especies como es el caso de D-germacrano o solamente están presente en dos de ellas como el β -elemeno.

Estos compuestos se lograron caracterizar por medio de cromatografía de gases, el cual utiliza un software que contiene los diferentes aceites esenciales que una planta puede contener y los determina por medio de una lectura, la cual puede durar de 30 a 90 minutos, y al pasar el tiempo cuando el aceite pasa por el detector y éste lo reconoce, es allí donde especifica el tipo de aceite.

Con respecto a la actividad citotóxica se evaluaron los aceites esenciales de las tres especies a una concentración de 1mg/ml y se observó muerte total de los nauplios de *Artemia salina* en las especies estudiadas por lo que se realizó de nuevo la prueba con concentraciones menores, de 0.5mg/ml, 0.25mg/ml y 0.125mg/ml. Los resultados que se

obtuvieron con estas dosis se introdujeron a un programa el cual determina la dosis letal media de cada una de las plantas. La dosis letal media significa que la administración de una dosis de estas plantas puede provocar la muerte del 50% de personas que la consuman; los datos obtenidos fueron los siguientes para *P. donnell smithii* la CL50 fue de 0.227mg/ml, para *P. peltatum* de 0.306mg/ml y *P. diandrum* de 0.265mg/ml.

En *P. donnell smithii* y *P. diandrum* al ingresar los datos al programa Finney y obtener los resultados se logró observar que éstos no presentaron un intervalo de confianza, debido a que el comportamiento que la planta presentó con respecto a las muertes de los nauplios en las cuatro dosis investigadas, fue muy similar, por lo que la CL50 obtenida es un dato de referencia, es decir que la CL50 puede estar cerca del valor obtenido, ya sea para *P. donnell smithii* 0.227mg/ml y *P. diandrum* 0.265mg/ml. Con respecto a *P. peltatum* en sus resultados si se obtuvo el intervalo de confianza al 95% el cual fue de 0.059-0.766 y la concentración letal media obtenida es de 0.306mg/ml.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Por medio del tamizaje fitoquímico se logró identificar alcaloides, saponinas, flavonoides, antraquinonas, aceites volátiles, principios amargos y cumarinas, siendo *P. peltatum*, la especie que presentó mayor cantidad de los metabolitos secundarios.
- 10.2 La especie que presentó mayor rendimiento de aceites esencial fue *P. donnell smithii*, seguida por *P. peltatum* y por último se encuentra *P. diandrum* la cual presentó el menor rendimiento.
- 10.3 El aceite esencial mayoritario para cada especie fue para *P. diandrum* β -elemeno, para *P. donnell smithii* espatulenol y para *P. peltatum* el Cis-calamenano.
- 10.4 Los aceites esenciales de las tres especies presentaron actividad citotóxica contra *Artemia salina*, dando muerte total a los nauplios con una concentración de 1mg/ml..
- 10.5 La CL50 encontrada en las especies fue para *P. donnell smithii* de 0.227mg/ml, para *P. peltatum* de 0.306mg/ml y para *P. diandrum* 0.265mg/ml.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar con el estudio de las especies del género *Piper* enfocándose en el tamizaje fitoquímico para conocer más a fondo que tipos de metabolitos secundarios contienen estas especies.
- 11.2 Realizar un estudio farmacológico de las especies estudiadas para proporcionar información con respecto a los usos medicinales que se les pueda atribuir.
- 11.3 Continuar con el estudio de las otras especies que pertenecen a este género para aprovechar la los recursos naturales con los que contamos y hacer uso de los mismos.

12. REFERENCIAS

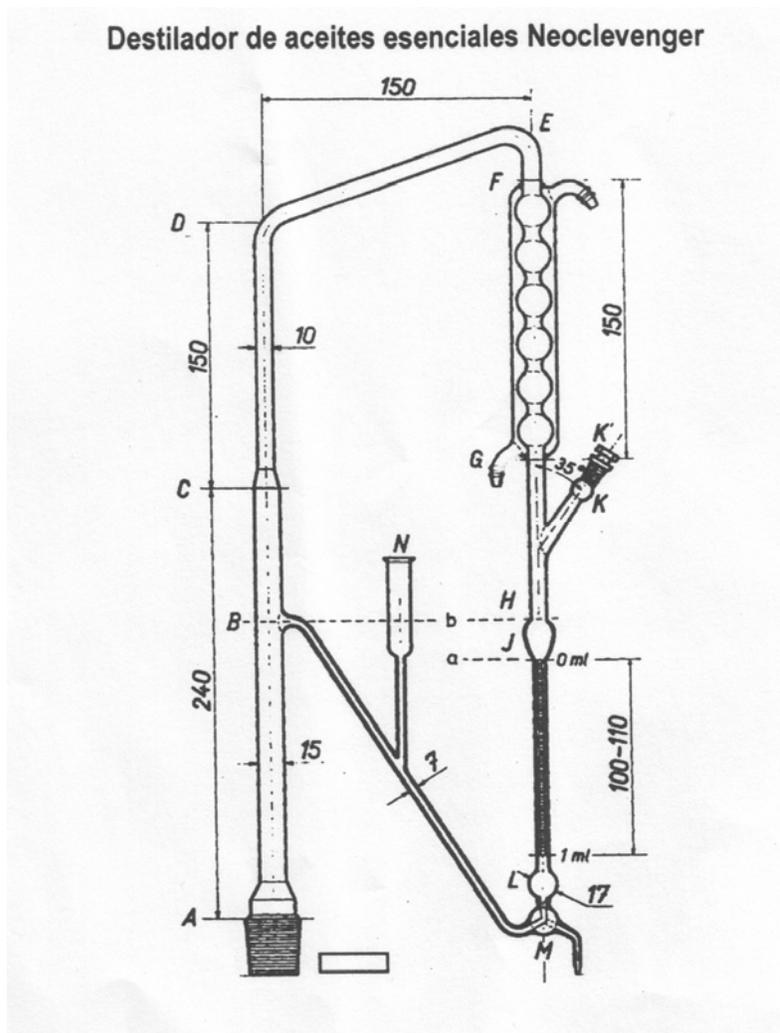
- 12.1 Navarro, G. 2004. Comprobación del Efecto Cicatrizante de *Peperomia Scutellaefolia* R. ET. P. , Aspecto Etnofarmacológicos, Botánicos y Estudio Químico. Elaboración y formato PDF por la Oficina General de Sistemas de Bibliotecas y Biblioteca Central.
- 12.2 Cicció, J. 2006. Constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Piper terrabanum* (Piperaceae). Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 26 P.
- 12.3 Soberón et al. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. Sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera, Pyralidae). Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM.
- 12.4 Cruz, S. 2005. Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de cinco especies nativas de *Piperaceas*. Tesis Maestría multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Facultad de Agronomía. 1, 10-11 P.
- 12.5 Standley PC. Steyermark JA. 1952. Flora de Guatemala. Fieldiana: Botany 24(3): 228-231, 296-297, 300-301, 312-314 P.
- 12.6 Cleaves, C. 2001. Etnobotánica Médica Participativa en siete comunidades de la zona de Influencia del Parque Nacional Laguna Lachúa Cobán, Alta Verapaz, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Biología) 184-185, 188 P.
- 12.7 Base de Datos Napralert 2005.
- 12.8 Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2da Edición. Perú. 24-33, 300 P.
- 12.9 Alonso, J. 1998. Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas. Argentina Ediciones SRL ISIS. 112-114 P.
- 12.10 Medinilla, B. 2001. Manual de Fitoquímica de la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia. 20-23 P.
- 12.11 Skoog et al. 2001. Química Analítica. 7ª. Edición. México. Editorial McGraw-Hill. 687-696 P.

- 12.12 Sharapin, N. 2000 Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1era. Edición. Colombia. 179-189, 198-204, 247 P.
- 12.13 Manual de Operaciones. Procedimiento Estándar de Operación. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales 2005.
- 12.14 Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Ed. Universitaria Guatemala. 39-40 P.
- 12.15 Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona. 515 P.
- 12.16 Real Farmacopea Española 2002 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 P.
- 12.17 Santa Cruz, L. Manual: Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. 92 P.
- 12.18 Vila, R & Reing, M. 2003. Métodos de Control de Calidad. Madaus, UB Virtual, Imicromat. 39 P.
- 12.19 Wagner, H. *et al.* 1984. Plant Drug Analysis. Berlin, Springer-Verlang, 320 p.
- 12.20 WHO 1998 Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO. 115 P.
- 12.21 Cañigueral, S.; Stashenko, E. E. 2000. Análisis de calidad de aceites esenciales. En: Arnaldo Bandoni (Ed.) Los recursos vegetales aromáticos. Capítulo XI. 197-232. P. La Plata: CYTED-EUNLP
- 12.22 Anderson, JE, Gotees CM & Mc Laughin JL. 1991. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2:107:111 P.
- 12.23 Cáceres, A et. al. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62:195-202 P.
- 12.24 Jaki, B. et. al. 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity, *Pharmaceutical Biol.* 31:138-143 P.
- 12.25 Meyer BN, Ferrigni NR & Putnam JI. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica* 45:31-34 P.
- 12.26 Michael A, Thompson CG&Abramovitz M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science* 123:464 P.

- 12.27 Solis PN et al. 1993. Toxicity assay using *Artemia salina* (Brine shirmp). *Planta medica* 59:250-252 P.
- 12.28 Wah Sam T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In. Colegate FM & Molineux RJ. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. Boca Raton, CRC Press, 441-456 P.

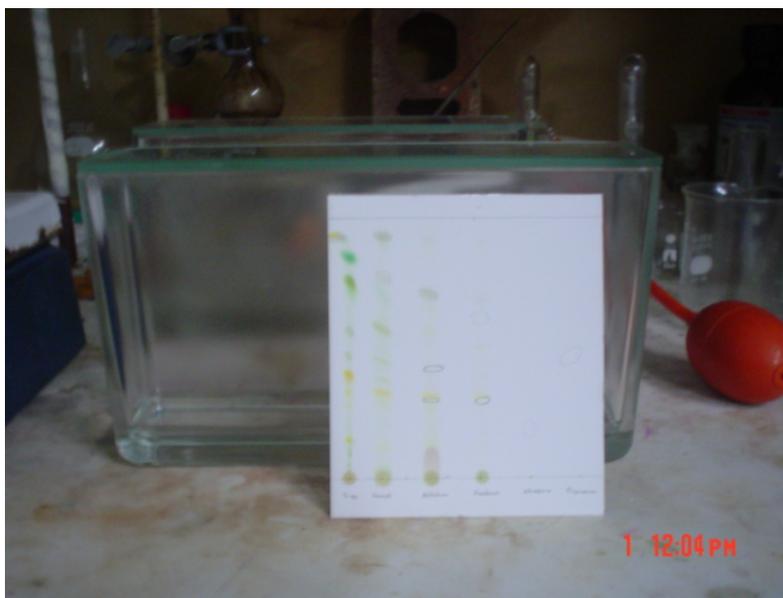
13. ANEXOS

Figura No. 1



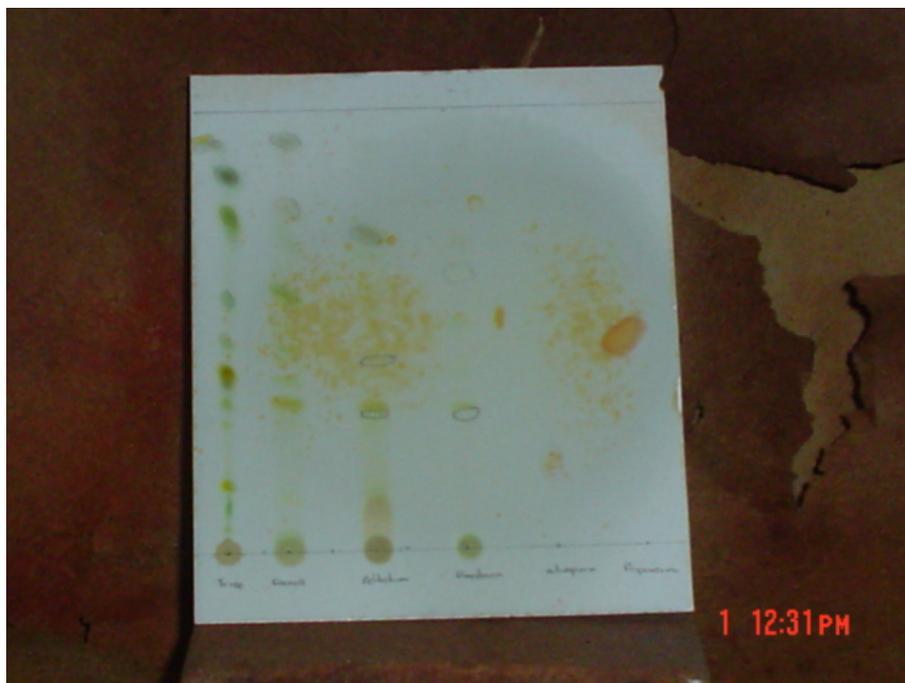
FOTOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Figura No. 2



Cromatografía de capa fina de Alcaloides

Figura No. 3



Cromatografía de capa fina de Alcaloides después de la detección

Figura No. 4



Cromatografía de capa fina de saponinas

Figura No. 5



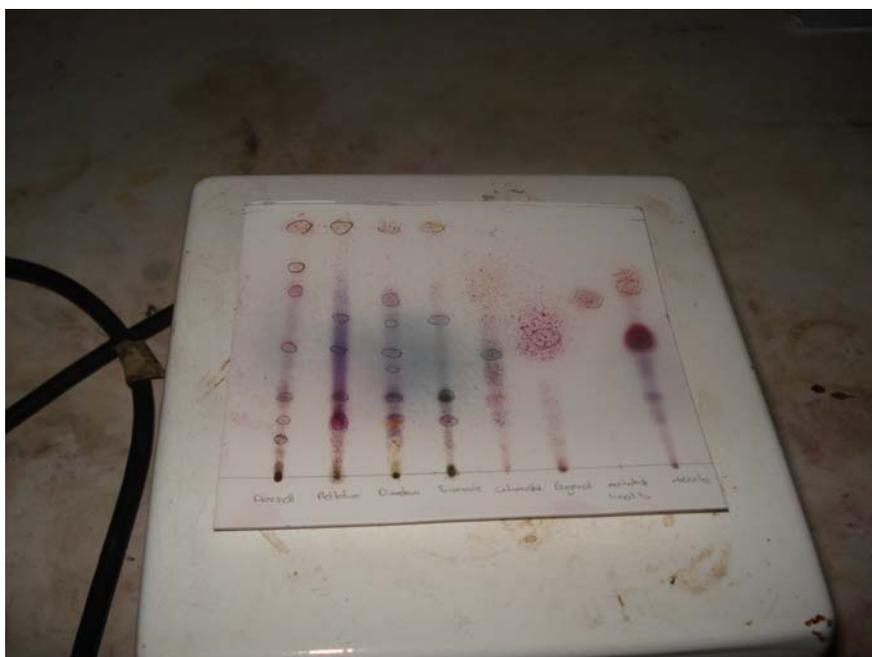
Investigación de flavonoides y antocianinas (prueba cualitativa)

Figura No. 6



Investigación de antraquinonas (Prueba de Borntäger)

Figura No. 7



Cromatografía de capa fina de Aceites volátiles

Figura No. 8



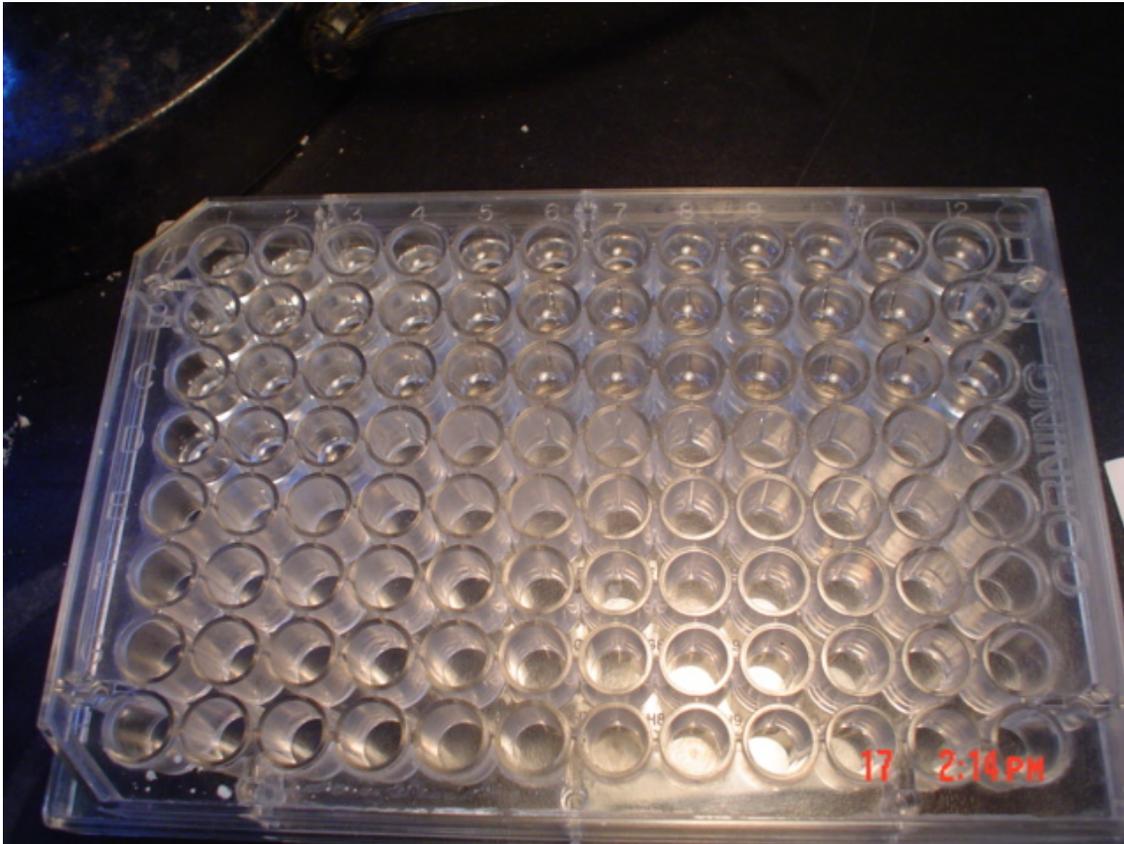
Cromatografía de capa fina de Principios amargos

Figura No. 9



Crecimiento de los nauplios de *Artemia salina*

Figura No. 10



Pozos en los cuales se colocan las concentraciones a investigar y se introducen los nauplios vivos.