

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

**TAMIZAJE FITOQUÍMICO, EXTRACCIÓN FRACCIONADA Y
EVALUACIÓN BIOCIDA DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO Y
METANÓLICO DE *Brosimum alicastrum* Swartz (RAMÓN) FRUTO, SEMILLA
Y HOJAS.**

Informe de Tesis.

Presentado por:

Darwin Miguel Tení Milián.

Para optar al título de

Químico Farmacéutico.

Guatemala 23 de mayo de 2008.

JUNTA DIRECTIVA

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

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Por ser un Dios de pactos y promesas, y darme las fuerzas, inteligencia y sabiduría para alcanzar este logro. Gracias papito lindo.

A MI PADRE

Por su apoyo incondicional durante todos los años de mi vida, desde mi niñez hasta el hombre que soy ahora. Gracias Lilo (Papi).

A MI MADRE

Por tus sacrificios y esfuerzos para sacarme adelante y hacerme un hombre de bien para lograr alcanzar este logro. Gracias Yoli (Mami).

A MIS HERMANOS

En especial a Marisol por ser una niña de bendición para nuestra familia. A Carlitos por ser la persona tan especial y llenar de alegría mi vida y de buenos momentos te quiero mucho. A Maribel por ser una persona muy especial. A Julio José por esos momentos llenos de alegría que me permitiste compartir. Gracia Trompudo.

A MIS ABUELOS

Miguel Milián Peña † (Papaguel), Carlota Dubón Vda. de Milián (Mamalota) por ese apoyo incondicional, oraciones y cuidados desde mi niñez hasta que Dios se los ha permitido. Llevando todos esos recuerdos en mi corazón Gracias.

Alfredo Tení (Papa Alfredo), Delia Aguayo de Tení † (Mama Delia) gracias por sus bendiciones.

A MI ESPOSA

Por apoyarme y desvelarse en todo momento durante nuestra época de estudiantes universitarios. Gorda te amo con todo mi corazón.

A MI HIJO

Por ser una bendición en nuestras vidas y llenar este momento de alegría e ilusión de poderte tener con nosotros. Y ser la fuente de inspiración y esfuerzo.

A ROSINA

Por abrirme las puertas de tu hogar y darme la oportunidad de cuidarme como un hijo, gracias por tu apoyo en momentos en que necesitaba. Gracias a tu familia por aceptarme en su hogar, especial mente a Doña Graciela (Tesda), Rubén, José Carlos.

A MI FAMILIA

A mis Tias Eroica, Gloria y Aura Violeta (lety) por sus consejos, bendiciones y cuidados. Siempre recordando las anécdotas compartidas con cada una de ellas.

A mis primos Maurico, Evelyn y Dafne por su apoyo y cariño.

A las familias Milián Dubón y Tení Aguayo.

Y Especialmente a la Familia Urizar Chinchilla por ese apoyo incondicional y los consejos dados.

A MIS AMIGOS

Rolando Orellana, Luís Morales, Hesler Acevedo, Ernesto Asturias, Edgar Cerezo por todos lo momentos compartidos. Con especial cariño a Ervin y David.

A MIS COMPAÑEROS Y COMPAÑERAS DE PROMOCIÓN

Por su amistad y los años competidos durante el tiempo de estudio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A Marcial Córdova por su colaboración y apoyo incondicional en la obtención de muestras. Gracias Chalo que Dios te bendiga y a tu familia.

A la Licda. Isabel Gaitán por su orientación para el desarrollo de esta tesis. Gracias Isa.

A la Licda. Aylin Santizo por su colaboración, amistad y compañerismo mostrados durante la realización de la tesis.

A mi Asesora Licda. Sully Cruz por su colaboración y apoyo en este trabajo de tesis.

A Lic. Armando Cáceres por su amistad y confianza, principalmente por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigadores.

Al departamento de citohistología por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al laboratorio Farmaya por proporcionarme sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al laboratorio LIPRONAT por permitirme el uso de sus instalaciones y reactivos para la realización de esta investigación.

A mi revisora Licda. Beatriz Medinilla Aldana por su importante ayuda en la realización de esta investigación.

INDICE

1. Resumen.....	7
2. Introducción.	9
3. Antecedentes	11
4. Justificación.	23
5. Objetivos.	24
6. Hipótesis.	25
7. Materiales y métodos.	26
8. Resultados.....	51
9. Discusión de resultados.....	72
10. Conclusiones.....	70
11. Recomendaciones.....	75
12. Referencias.	77
13. Anexos.....	82

1. RESUMEN

Hoy en día el uso de plantas medicinales en Guatemala ha tomado un auge para su utilización como una alternativa para aliviar los problemas de la salud. Por lo tanto esta investigación partió del interés de evaluar la actividad biocida del ramón (*Brosimum alicastrum Swartz*) y contribuir al estudio de los productos naturales en Guatemala, ya que el árbol de ramón tiene reportado varios usos medicinales como galactagogo, para el tratamiento del asma, vermífugo, antibacteriano, además se ha publicado poca literatura sobre su composición fitoquímica, esto permitió dar inicio a la investigación y poder caracterizar los metabolitos presentes en la planta.

A la fecha no existen informes sobre la actividad biocida, citotóxica en extractos obtenidos del ramón, derivándose de ello la importancia de la presente investigación, determinando la actividad antibacteriana, antilevadura, antifúngica, y la actividad citotóxica contra *A. salina*.

El ramón se recolectó en la Aldea El Caoba, municipio de Flores Departamento de Petén. Posteriormente se obtuvo el extracto diclorometánico y metanólico mediante percolación y concentración con rotavapor. A cada porción del extracto se le realizaron pruebas *in vitro* para determinar su actividad biocida y el tamizaje fitoquímico, para determinar la naturaleza de los componentes presentes en el extracto, en donde los extractos de fruto y hojas presentaron: flavonoides, cumarinas, lactonas insaturadas, esteroides, saponinas, principios amargos y aceites volátiles.

Se analizó cada uno de los extractos por diferentes ensayos preliminares de coloración pruebas específicas mediante cromatografía en capa fina. Se caracterizaron flavonoides en el extracto diclorometánico de las hojas, y sesquiterpenlactonas en el extracto metanólico de estas.

No se encontró actividad antibacteriana, antimicótica, antilevadura, ni citotóxica contra *A. salina* en los extractos diclometánicos y metanólicos del fruto, semilla y hojas de ramón (*B. alicastrum*), pues no se alcanzó significancia estadística ($p > 0.1$). Por ello se concluyó que dicha especie carece de actividad biocida.

2. INTRODUCCIÓN

Ante la necesidad del descubrimiento de nuevos productos farmacológicos que contribuyan a la salud de los seres humanos, surge el interés de investigar plantas nativas, ya que éstas constituyen un recurso valioso como materia prima para la producción de extractos o aislamientos de sustancias naturales puras activas farmacológicamente. El ramón (*B. alicastrum*) es una planta nativa de Guatemala, que desde la época de los Mayas la utilizaban como alimento y se le atribuyen popularmente varias propiedades como actividad antibacteriana y vermífuga, las cuales es importante validar científicamente para que puedan ser aprovechadas por los lugareños de las comunidades aledañas que tienen acceso a los árboles de ramón.

El uso múltiple que presenta la planta es un buen punto de partida para iniciar una investigación y poder comprobar las diferentes actividades que el fruto pueda presentar a nivel *in vitro*. Dentro de estas actividades se debe comprobar la actividad biológica del fruto y hojas para aportar información fitoterapéutica sobre el uso medicinal, la cual es muy escasa.

El ramón (*B. alicastrum*) es un árbol de grandes dimensiones que crece en los bosques húmedos del país, cerca de los sitios arqueológicos, especialmente en el departamento de Petén. No se cultiva ni requiere cuidados para crecer, ya que es de naturaleza silvestre, lo cual tiene que ser aprovechado para que su fruto, semilla (ambos comestibles) y hojas, sean utilizados al presentar una actividad farmacológicamente activa, lo cual pueda ser un aporte valioso para documentar el uso medicinal del mismo.

La elaboración de una investigación que aporte conocimiento científico al área de salud a nivel nacional, sobre sustancias naturales puras activas farmacológicamente, permitirá el desarrollo de un producto natural farmacológicamente activo y de mayor accesibilidad.

De los extractos diclorometánicos y metanólicos del fruto, semillas y hojas se evaluó la actividad biocida contra los diferentes microorganismos, hongos, bacterias y levaduras a través de una prueba de hipótesis binomial, para concluir que el o los extractos tienen actividad, con un ($\alpha= 0.10$). Y los que presentaron actividad se les realizó la concentración mínima inhibitoria (CIM).

Además se realizó la caracterización química, cromatografía en capa fina, ensayos micro y macro, análisis descriptivo de todas las variables observadas de cada uno de los extractos obtenidos.

La evaluación biocida y citotóxica de los extractos de las hojas, fruto y semilla determinaron el potencial de la planta validando su uso, con ello contribuir al estudio de la flora guatemalteca.

3. ANTECEDENTES

3.1. ANTECEDENTES HISTORICOS SOBRE EL RAMÓN, *Brosimum alicastrum Swartz*.

Para los Mayas del periodo clásico, uno de sus alimentos primordiales y básicos para su subsistencia fue el ramón, como también lo fue el maíz. Esta planta no fue aprovechada solamente por los Mayas, sino que también por los antiguos Cakchiqueles, quienes lo llamaron “Yximchéé” en su dialecto (Ixim=maíz, Chée=árbol) (1). Fue muy importante, ya que dieron a su ciudad principal este nombre. Hecho curioso es que las ruinas de Iximché se localizan dentro de la zona de vida del bosque muy húmedo montañoso bajo sub-tropical y se encontraron árboles de ramón alrededor y no en toda la zona. Esto hace suponer que fue sembrado por los Cakchiqueles a propósito, para su aprovechamiento, ya sea como alimento o con un sentido ceremonial (1).

3.2. ETIMOLOGIA:

El nombre de *Brosimum*, viene del griego *BROSIMOS* que significa comestible.

En el 1756, Browne describió dos especies que agrupo como *B. alicastrum*. Tiempo más adelante, Swartz en 1788, describió el género *Brosimum* y se basó en dos especies traídas de Jamaica, las cuales fueron: *B. alicastrum* y *B. spirium*.

3.3. IDENTIFICACIÓN.

Nombre Botánico: *Brosimum alicastrum Swartz*

Familia: Moraceae

Sinonimia: *Trophis racemosa*, *Brosimum latifolium Satandl*.

Nombre común: Ramón, ajushte, capomo, ajah, confitura, iximché, leche maría, masico, masiquilla, mojo, mujú, muñeco, nazareno, ojite, ojoche, ox, ujushte blanco, nuez de pan, ajah, tsotz-ax, ax, mo, talcoite (1).

3.4. BOTÁNICA

3.4.1. TAXONOMIA

Reino : Vegetal.

Subreino : Embryobionta

División : Magnoliophyta

Clase : Manoliopsida

Subclase : Hamamelidae

Orden : Urticales

Familia : Moraceae

Género : *Brosimum*

Especies : Este género cuenta con aproximadamente 28 especies.

Standley y Steyermarck, reportan para Guatemala, cuatro especies que son (11).

Brosimum alicastrum Swartz.

Brosimum panamense Pittier.

Brosimum costarricanum Liemb.

Brosimum terrabanum Pittier.

3.5. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es un árbol grande o pequeño hasta 40 m de altura; a la altura del pecho con un diámetro mayor a 1 m en algunos casos, copa ancha y densa, de color gris amarillento; hojas cortamente pecioladas, coriáceas, de color verde brillante cuando estén recién cortadas, glabras, enteras, casi oblongo elípticas a elípticas, principalmente de 7 a 14 cm. de largo y de 3-5.5 cm. de ancho, acuminadas o

abruptamente corto-acuminadas, algunas veces meramente agudas, obtusas en la base, los nervios laterales alrededor de 14 pares, estípulas caedizas hasta 1 cm. de largo; flores en cabezuelas, cerca de 1 cm. De largo corto pedunculadas, con numerosas flores masculinas y una sola femenina, estambres 1, ovario infero unilocular, estilo terminado con dos lóbulos estigmático; fruto drupa de 1.5 a 2.5 cm. De diámetro, de color amarillo o anaranjado, conteniendo una sola semilla alrededor de 15 mm de diámetro es muy rica en almidón no presenta olor ni sabor característico (2).

Es sub-perennifolio, al perder parte de su follaje en alguna época del año. El tronco es cilíndrico acanalado y sus raíces salientes sirven para darle apoyo al tronco. Contiene una savia lechosa. La corteza es lisa de color gris claro y la madera de color rojo brillante en la sección central del tronco y tallo y amarillenta en el resto (1).

3.6. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA

El ramón es una especie que se desarrolla en el bosque muy húmedo subtropical cálido. Necesita de una precipitación pluvial de 2/100 a 4/300 mm anuales y temperaturas entre los 21^o y 25^o C a una altitud de 80 a 1/600 m sobre el nivel del mar. Se adapta a climas desde semihúmedos hasta semiáridos; bosque húmedo subtropical, bosque muy húmedo subtropical, bosque muy húmedo tropical. Petén, Izabal, Alta Verapaz, El Quiché, San Marcos, Quetzaltenango, Retalhuleu, Mazatenango, Escuintla, Santa Rosa, Belice, Sur de México, San Salvador. Crece bien en suelos poco profundos o mal drenados, con fertilidad baja moderada y textura desde arcillosa hasta arenosa, aunque prefiere cerros cálidos y rocosos (1).

3.7. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las semillas contienen pequeñas cantidades de aceites volátiles, grasa, resina, cera, alcaloides, principios mucilaginosos, trazas de sacarosa y glucosa, dextrina, principios pépticos y albuminoides; ácido metarábico, almidón, celulosa y sales. Otros análisis fueron realizados en el Instituto Médico Nacional fechado en 1889 y referido a las hojas, no mencionan ningún glucósido ni alcaloide. Según este análisis, las mismas hojas tienen 9.8% de cenizas, en las cuales hay carbonato de cal, 49%: sílice, 3%; carbonato de potasio y sodio, 28%; fosfato de cal, 7%; otras sales, 13%: total. 100 (3).

3.8. USOS

3.8.1. Usos Medicinales

La savia se obtiene golpeando ligeramente el tronco de crecimiento joven para venderlo como "leche vegetal" a precios altos en farmacias de Guatemala. Es tomado como remedio para los desórdenes del estómago y como expectorante. También es un remedio popular en Yucatán, México. Se utiliza para aliviar ataques asmáticos, se diluye con agua azucarada, una decocción de hojas (8g en 180g de agua azucarada) se toma 2 cucharadas cada 2 horas para aliviar asma y bronquitis. La decocción de las semillas machacadas se toma de 3 a 4 veces al día como galactógeno (4).

El cocimiento de las hojas aumenta la secreción de la leche en las mujeres que están criando, es decir, se considera un buen galactagogo. Esta misma reputación tiene la planta en México, pero según Standley esto probablemente es una reminiscencia de la antigua teoría médica de las analogías. Los frutos son comestibles y muy nutritivos. Su látex diluido en agua es empleado en el asma y la bronquitis; sus frutos aumentan la leche (5).

3.8.2. Alimento

El ramón es un recurso valioso para la alimentación y a la fecha se le sigue dando esta utilidad y las personas que habilitan el suelo para pastizales suelen dejar los árboles para sombra y para forraje, cortando sus ramas en determinadas épocas del año; además es un buen recurso para el mantenimiento de la fauna silvestre.

En la época en que el maíz escasea, el fruto se usa para mezclarlo ya cocido con este grano para elaborar tortillas que no difieren en mucho al sabor de las tortillas hechas solamente de maíz; las semillas cocidas se comen con sal y tienen muy buen sabor, también son tostadas para hacer una bebida parecida al café. Se dice que el látex ha sido empleado como sustituto de la leche de vaca, por su sabor y solubilidad en agua (2).

Las semillas son comestibles cocinadas y trituradas en forma de harina, también tostadas para preparar una bebida similar al chocolate. Son ricas en proteína, aminoácido triptófano, hierro y vitamina C. Hoy en día su consumo es escaso pero fue un alimento base de los antiguos Mayas (6).

3.8.3. Forraje

El nombre de ramón se deriva del uso que se le da a sus hojas y semillas para forraje, debido a su alto contenido de proteína cruda, consumido por el ganado, especialmente el mular y caballar, vacuno, ovejas y cerdos, lo cual se remonta al tiempo de la colonia. Ya que éste era el recurso que utilizaban los chicleros para alimentar a sus bestias en la época de chiclería (2).

3.9. PRETAMIZAJE

Se entiende por pretamizaje a una serie de ensayos biológicos (bioensayos) generalmente *in vitro* que dan una idea preliminar de la posible bioactividad de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro. Las técnicas de pretamizaje pretenden orientar al farmacólogo, al químico y al farmacognosta con

técnicas relativamente sencillas, que no involucren animales, que tengan bajo costo y que pueden realizarse un número grande de muestra en forma rápida, sencilla, reproducible y de bajo costo (8).

3.10. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico constituye etapas iniciales en la investigación sobre plantas medicinales. Se entiende por tamizaje un conjunto de técnicas relativamente simples y de bajo costo que permiten al investigador evaluar la posible acción farmacológica, la toxicidad y los principales grupos químicos presentes en una planta (7).

El “screening” fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos de una planta y orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos en el sentido de los grupos de mayor interés (7).

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 un 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 la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados de tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación (7).

Diversos métodos de tamizaje fitoquímico están descritos en la literatura. Algunos evalúan pocos grupos de sustancias, en compensación, otros evalúan la presencia de compuestos de poco interés, como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos. La cantidad de material vegetal necesario para hacer las pruebas varía de 5 g a 200 g (7).

3.11. EXTRACCIÓN DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES.

3.11.1. Molienda

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una droga entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, debido a la pobre penetración del disolvente en el tejido vegetal, y sería igualmente muy lenta, una vez que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción. En el caso específico de la droga previamente dividida, tales membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo. Sin embargo, la división excesiva, con formación de polvos muy finos, puede causar problemas en el transcurso de la extracción. En los procesos de percolación existe compactación del polvo, lo que dificulta el paso de disolvente, dando como resultado una extracción incompleta de la droga. En los procesos de maceración las partículas muy finas pueden pasar al extracto dando a este una apariencia turbia. La filtración de estos extractos es difícil y lenta y se necesita adicionar auxiliares de filtración, como por ejemplo tierra de diatomeas; este proceso causa la retención de una parte del extracto. Este inconveniente puede ser solucionado en parte cuando se prensa o centrifuga el residuo (7).

La droga molida se clasifica de acuerdo con el tamaño de las partículas, el cual debe ser adecuado para el proceso de extracción. La molienda del material vegetal, independientemente de su naturaleza y del tipo de molino usado, da como resultado la producción de una cierta cantidad de partículas muy finas, las cuales deben ser separadas, por lo cual la operación de molienda debe ser seguida por el tamizaje del material obtenido. Las partículas que exceden el tamaño adecuado deben retornar al molino para ser reducidas aún más, descartándose también el polvo muy fino o, cuando las condiciones lo permiten, este polvo debe ser

almacenado y extraído aparte, y reunirse el material proveniente de varios lotes, en condiciones diferentes (7).

3.11.2. Extracción

Antes de empezar un proceso extractivo en una escala piloto o industrial, se debe definir la selectividad del disolvente a ser usado en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine, puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica. En el primer caso, normalmente se usa un disolvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el alcohol etílico o el metanol. El segundo caso se emplea un disolvente selectivo, de menor polaridad, como el hexano que sólo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares. La escogencia del disolvente de extracción así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia en cualquier proceso de fabricación, bien sea de productos fitoterapéuticos o bien sea de sustancias naturales aisladas (7).

La materia prima vegetal en la industria de fitofármacos está representada, en la mayoría de las ocasiones, por la droga seca. De esta manera, cuando la droga se pone en contacto con el disolvente se inicia uno proceso opuesto al proceso de secado que tiende a reconstituir el estado original de la célula. Inicialmente el disolvente penetra en la célula vegetal y expelle el aire contenido en el citoplasma, dándose inicio de forma al proceso extractivo.

La penetración del disolvente en la célula induce un momento bipolar en la moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. Es de esta manera como las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del disolvente. La capacidad de asociación puede expresarse en términos de la constante dialéctica (ϕ). Cuanto más polar sea un disolvente mayor será su respectiva constante dialéctica. Compuestos ionizables y/o altamente polares se disuelven en disolventes de elevada constante

dialéctica (ϕ); al igual que compuestos apolares se disolverán en disolventes de baja constante dieléctrica (ϕ) (7).

La salida del complejo “droga-solvente”, es el caso de células enteras, depende del equilibrio entre la concentración de este complejo en el interior y el exterior de la célula. Los procesos extractivos interfieren en la constante de equilibrio desplazándolo hacia el exterior de la célula (7).

En el proceso de escogencia de un disolvente determinado es necesario considerar aspectos relacionados con la selectividad, la facilidad de manipulación, el precio, la seguridad y los riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental. Sin embargo, el aspecto más importante a ser considerado es el grado de toxicidad del disolvente. En el supuesto caso en que parte del disolvente permanezca en el producto acabado, el disolvente debe ser aprobado por el órgano nacional responsable de registro del producto fitoterapéuticos. Por esta razón, los productos fitoterapéuticos son elaborados, principalmente, con mezclas hidro-alcohólicas (7).

Durante el proceso de extracción ocurren dos fenómenos paralelos: la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas, la disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas. Mientras la lixiviación de las sustancias de las células rotas es rápida, la difusión de las sustancias a través de la membrana de células intactas es lenta y requiere etapas de humedecimiento y ablandamiento para aumentar la permeabilidad de la membrana. Este proceso comprende tres etapas: la penetración del disolvente en la célula, la disolución de las sustancias extraíbles y la difusión de la solución fuera de la célula vegetal (7).

En el caso de aislamiento de productos naturales puros, pueden usarse otros disolventes orgánicos, incluso mezclas azeotrópicas. Estas mezclas mantienen la misma concentración relativa de sus componentes cuando alcanzan su punto de ebullición, y el punto de ebullición de la mezcla es inferior al del componente cuyo punto de ebullición es más alto, por lo cual pueden ser usados en procesos

extractivos, incluso del tipo Soxhlet, ya que no se presenta la separación de los componentes de la mezcla (7).

3.11.3. Proceso de extracción

Los procesos de extracción varían en función de la escala de producción, de la naturaleza y calidad de la materia prima y de la naturaleza del disolvente. Los procesos de extracción pueden ser divididos en dos grupos:

- Proceso que dan como resultado un equilibrio de la concentración entre el soluto y el residuo, y
- Procesos que agotan completamente la droga.

Los procesos que dan como resultado un equilibrio de la concentración son la maceración y la maceración dinámica. Los procesos que agotan completamente la droga son: la percolación, la repercolación y la extracción en contra corriente (7).

3.11.3.1. Percolación

En la manufactura de los extractos la percolación es el método más común. La materia cruda a extraer se reduce a pedazos de un tamaño apropiado, si es necesario, luego se mezcla íntimamente con una porción del disolvente especificado y se deja reposar por 15 minutos. La mezcla se trasfiere a un percolador y se añade cantidad suficiente del disolvente especificado para cubrir toda la masa sólida. La mezcla se deja percolar lentamente, cubriendo siempre la muestra con una capa de disolvente. El residuo puede ser sometido a presión y el fluido obtenido es combinado con el percolado. El percolado es concentrado, generalmente por destilación bajo presión reducida, de manera que los constituyentes de interés sean sometidos a la menor cantidad de calor posible (9).

La percolación consiste en hacer pasar el disolvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la droga con el disolvente siempre renovado. En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos, denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provisto de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del

disolvente. Según la Farmacopea Alemana, la capa de la droga debe ser igual a 5 veces el diámetro medio del equipo (7).

La percolación, en pequeñas escalas o en escala industrial, comprende una etapa preliminar de humedecimiento de la droga, fuera del cuerpo del percolador. Este procedimiento tiene como objetivo aumentar el contacto, facilitando el paso del disolvente y no permitiendo la formación de falsas vías, que perjudican la eficiencia del proceso. El humedecimiento de la droga aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células. El humedecimiento debe ser realizado fuera del percolador, ya que la droga puede hincharse excesivamente, principalmente cuando el disolvente es acuoso, y comprimirse contra las paredes del percolador, no permitiendo el paso del disolvente (7).

La precolación simple presenta, como desventaja, el alto consumo de disolvente. Por esta razón, en condiciones industriales, es preferible usar la técnica de la repercolación. La repercolación consiste en hacer recircular el mismo disolvente a través de la droga, por intermedio de bombas. Este procedimiento aumenta el tiempo de contacto de la droga con el disolvente y aumenta la eficiencia del proceso. En la repercolación se utiliza una batería de percoladores y los extractos menos ricos en sustancias extraíbles son utilizados para extraer nuevas porciones de la droga (7).

3.12. CITOTOXIDAD CON ARTEMIA SALINA.

La *Artemia salina* (camarón salino) es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son sensibles a gran variedad de sustancias, por lo que puede medirse fácilmente la toxicidad de extractos vegetales y servir para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple. Es una prueba útil, aunque no selectiva para ninguna molécula química y su correlación con otras actividades no ha sido bien estudiada. El procedimiento fue originalmente descrito por Michael *et al.* Y ha

sido adaptado por Meyer *et al.* como un útil bioensayo en la investigación química y biológica de productos naturales (8).

Interpretación: Analizar los datos en un programa de computadora para cálculo de probit prueba de Finney para determinar los valores de dosis letal media (DL50). Los valores menores de 1,000 ppm se consideran activos (8).

3.13. ANTIMICROBIANOS.

La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimiento *in vitro* o *en vivo* (8).

3.14. BIOCIDA.

Sustancia que destruye la vida vegetal (13). Agente que mata a un organismo. En un término genérico, ya que normalmente se emplean palabras más específicas, como bactericida, cuando destruye bacterias; fungicida, si son mohos, o virocida, cuando la acción letal afecta a un virus (14).

Los biocidas son sustancias preparadas que contengan una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinado a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medio químico o biológico (15).

Tomando en cuenta la importancia de la actividad biocida que puede presentar una planta, y al no haber encontrado en la revisión bibliográfica estudios realizados que comprueben la actividad biocida del ramón es interesante desarrollar un trabajo de investigación que lo compruebe.

4. JUSTIFICACIÓN

El ramón *B. alicastrum* es una planta nativa de Guatemala. Se ha utilizado desde el período clásico por los Mayas, quienes le han atribuido propiedades medicinales y alimenticias. El estudio de dicha planta representa un aporte de gran importancia para su utilización en las áreas cercanas en donde se desarrolla de una forma silvestre o cultivada.

Motivo para iniciar la investigación, lo cual permitió evaluar la actividad biocida y composición fitoquímica que presentó el ramón, ya que no se encuentra reportado en la bibliografía consultada estudios que demuestren que el ramón tenga una actividad biocida, por lo tanto se genera información que permite documentar el potencial del ramón y validar su uso medicinal, contribuyendo así al estudio de plantas medicinales nativas guatemaltecas.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Evaluar la actividad biocida del ramón *B. alicastrum* con el propósito de contribuir al estudio de la flora guatemalteca.

5.2. ESPECIFICOS

- 5.2.1. Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos diclorometánico y metanólico del fruto y hojas del *B. alicastrum*.
- 5.2.2. Evaluar la actividad citotóxica con *A. salina* de los extractos diclorometánico y metanólico del fruto y hojas del *B. alicastrum*.
- 5.2.3. Evaluar la actividad antibacteriana mediante el método de dilución de los extractos metanólicos y diclorometánicos del fruto y hojas del *B. alicastrum*.
- 5.2.4. Evaluar la actividad antimicótica *in vitro* de los extractos diclorometánico y metanólico del fruto y hojas del *B. alicastrum*.
- 5.2.5. Evaluar la actividad antilevadura *in vitro* de los extractos diclorometánico y metanólico del fruto y hojas del *B. alicastrum*.

6. HIPÓTESIS

Tanto el extracto diclorometánico como el metanólico del fruto, semilla y hojas del *B. alicastrum* (ramón) poseen actividad biocida *in vitro*, y algunos metabolitos secundarios.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIALES

7.1.1. Universo de estudio

- Universo: Material vegetal de la especie *B. alicastrum* procedente de la aldea El Caoba, Municipio de Flores, Departamento de Petén. Elevación promedio: 344 nsm Latitud: 17° 00' 57.8" Longitud: 89° 40' 27.5"
- Colectó: Darwin Miguel Teni Milián, Marcial Cordova Alvarez Coordinador de campo de biología para WCS (Sociedad de Conservación para la vida Silvestre), 9-03-2007.
- Determinó: EDC Luis Álvarez 12-03-2007.
- Muestra: Extractos del fruto y hojas.

7.1.2. Recursos humanos

- Investigador: Prof. Darwin Miguel Teni Milián.
- Asesor: Licda. Sully Margot Cruz.

7.1.3. Recursos materiales

7.1.3.1. Extracción fraccionada

- Percolador de vidrio o acero inoxidable.
- Rotavapor (balón de evaporación, condensador, bomba de vacío, refrigerante y balón de colecta.).
- Disolvente orgánico: (metanol, diclorometano).
- Balanza analítica.
- Desecadora.

7.1.3.2. Concentración usando rotavapor

- Rotavapor (balón de evaporación, condensador, bomba de vacío, refrigerante y balón de colecta.).

- Sistema de enfriamiento o circulación de agua.
- Disolvente orgánico (metanol y diclorometano).
- Balón de 1000 mL
- Computadora.
- Materiales de escritorio.

7.1.3.3. Tamizaje fitoquímico

- Reactivos específicos para cada metabolito (tamizaje fitoquímico).
- Disolventes orgánicos según el ensayo.
- Ácidos, bases, disolventes y estándares según el caso.
- Cristalería (vasos de precipitar, tubos de ensayo, erlenmeyer, micropipetas, pipetas, probetas).
- Perillas de succión.
- Papel filtro.
- Baño de María.
- Cámaras cromatográficas.
- Cromatofolios de aluminio de silica gel 60 F254 o placas de vidrio.
- Micropipetas de 5 μ L. o capilares.
- Asperjador de vidrio.
- Estufa.
- Agitador magnético.
- Lámpara de luz UV.
- Regla.

7.1.3.4. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

- Agar Muller Hinton.
- Agua desmineralizada.
- Asa de níromo.
- Autoclave.

- Cajas de petri simples.
- Caldo tripticasa soya.
- Campana bacteriológica.
- Campana bacteriológica con flujo laminar.
- Etanol al 50%.
- Incubadora a 36°C.
- Mechero.
- Pipetas automáticas.
- Puntas amarillas de 200 uL.
- Puntas azules de 1000 uL.
- Plantilla para siembra.
- Refrigeradora.
- Solución salina.
- Tubos de tapón de rosca de 15 mL

7.1.3.5. Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

- Agar Saboraud.
- Agar-agar.
- Agitador.
- Alcohol al 50%.
- Autoclave.
- Cajas de petri simples.
- Cámara de Neubauer.
- Campanillas de Durham.
- Dextrosa.
- Etanol al 50%.
- Fosfato diácido de potasio.
- Incubadora a 27°C.

- Incubadora a 37°C.
- Papel parafilm.
- Peptona.
- Pipetas automáticas.
- Puntas amarillas de 200 μ L.
- Puntas azules de 1000 μ L.
- Refrigeradora.
- Regla graduada en mm.
- Sulfato de sodio.
- Tubos con tapón de rosca de 15 mL
- Viales.

7.1.3.6. Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

- Agar Muller Hinton.
- Agar Saboraud.
- Agua desmineralizada.
- Asa de nicromo en argolla.
- Autoclave.
- Cajas de petri.
- Caldo tripticasa soya.
- Etanol al 50%.
- Incubadora a 36°C.
- Pipetas automáticas.
- Puntas amarillas de 200 μ L.
- Puntas azules de 1000 μ L.
- Refrigeradora.
- Solución salina isotónica.
- Tubos de tapón de rosca.

7.1.3.7. Concentración inhibidtoria mínima (cim)

- Agar Muller Hinton.
- Asa de nicromo.
- Autoclave.
- Cajas de petri cuádruples.
- Caldo tripticasa soya.
- Etanol al 50%.
- Incubadora a 36°C.
- Pipetas automáticas.
- Puntas amarillas de 200 μ L.
- Puntas azules de 1000 μ L.
- Refrigeradora.
- Solución salina.
- Tubos de tapón de rosca de 15 mL

7.1.3.8. Citotoxicidad con *A. salina*

- Lámpara con bombilla de 60 watts.
- Huevos de nauplios.
- Alcohol.
- Pipetas automáticas.
- Puntas amarillas de 200 μ L.
- Agua de mar.
- Vaso de precipitar 200 mL.
- Pecera

7.2. MÉTODOS

7.2.1. Extracción fraccionada

Procedimiento

1. Preparación de la Planta

- Pesar el material vegetal.
- Colocar la droga vegetal previamente molida dentro de un recipiente resistente al disolvente a utilizar.
- Añadir la cantidad necesaria de disolvente para remojar la planta antes de colocarla en el percolador.
- Dejar reposar 24 horas.

2. Preparación del percolador

- Lavar y secar el percolador a utilizar.
- Colocar una tapa de algodón en la parte inferior del percolador.
- Colocar sobre el algodón un pedazo de papel filtró en forma de cono.
- Colocar dentro del percolador la planta molida y empapada según el paso 1
- Agregar el mismo disolvente para completar el volumen, (disolvente apolar), el disolvente quedo 3 cm sobre la planta.
- Agitar suavemente para acomodar la planta.
- Tapar el percolador y se dejo reposar 24 horas.

3. Recuperación y concentración del extracto.

- Abrir la llave del percolador con un goteo intermedio y se recibir en un recipiente adecuado o directamente en el balón de concentración del rotavapor.
- Colocar el balón de concentración en el rotavapor.
- Marcar la temperatura y presión adecuadas según el disolvente que se

utilizo.

- Accionar el rotavapor según el PEO específico, se recupero el disolvente y se agrego de nuevo al percolador, se repitió el proceso anterior. Esto se conoce como fracción I.
- Desarrollar una extracción exhaustiva hasta que el efluente obtenido fue incoloro.
- Destapar el percolador 24 horas para que se evaporara el disolvente que quedado.
- Agregar el segundo disolvente menos polar y se repetir el proceso anterior. Esto se conoce como fracción II.
- Hacer de la misma forma con todos los disolventes a utilizar, e ir numerado las fracciones obtenidas.

7.2.2. Concentración usando rotavapor

Procedimiento:

- Verificar que estén conectadas todas las conexiones eléctricas.
- Colocar el balón colector y se fijo con la llave respectiva.
- Revisar el nivel de agua del baño de calentamiento.
- Encender el baño y se mantener la temperatura entre 40-50°C,
- Revisar que la llave de alimentación del refrigerante estuviera cerrada.
- Colocar el balón con la muestra y sujetar el vástago con la llave correspondiente.
- Encender el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada.
- Conectar un sistema de enfriamiento para el refrigerante.
- Encender la bomba de vacío durante el tiempo necesario para

iniciar la destilación.

- Cuando haya iniciado la destilación, se apagar la bomba de vacío.
- Encender la bomba de vacío cuantas veces sea necesario hasta que se haya agotado el disolvente del balón de evaporación.
- Aplicar vaselina al vástago rotatorio, a todas las llaves y juntas esmeriladas.
- Mantener el sistema de refrigeración a baja temperatura, con recambio periódicos de los hielos.

7.2.3. Tamizaje fitoquímico

Procedimiento

a. Investigación de alcaloides

Ensayos macro y semimicro: Pesar 1 g material vegetal. Agregar 2 gotas de solución 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 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)

- 1.36 g de HgCl_2 /60 ml H_2O
- 5 g KI /10 ml H_2O

- Mezclar y diluir a 100 mL

Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)

- 8 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /20 ml HNO_3
- 27.2 g KI/50 ml H_2O
- Mezclar, reposar, decantar supernadante. Diluir a 100 mL

Wagner (yodo-yoduro de potasio)

- 1.27 g I_2 + 2g KI/5 ml H_2O
- Diluir a 100 mL

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

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-amonio concentrado (90:7:3).

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

Reactivo de Dragendorff:

Zonas cafés o naranjas en VIS, los colores no son estables.

b. Investigación de flavonoides y antocianinas

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

Tubo 1: agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

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

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

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

Tubo 5: 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 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60 °C.

Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄ como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05 % 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 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

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

Solución 1: solución metabólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP).

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

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

c. Investigación de antraquinonas

Prueba de Bornträger:

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

Prueba de Bornträger modificado:

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

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

Estándar: solución al 0.1 % en metanol de antraquinonas (10 µL). (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 254 nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o roja-café.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 %.

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.

d. Investigación de cumarinas

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

Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal adicionar 10 mL de metanol y calentar 30 minutos en baño de maría. Filtrar y evaporar hasta 1 mL.

Aplicar 20 µL en una cromatoplaque de silica gel 60 F₂₅₄. Utilizar como estándar canela en metanol al 1 %, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina.

Fase móvil. Tolueno-acetato de etilo (93:7); tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 mL de tolueno y 50 mL de éter son mezclados durante 5 min con 50 mL 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 254 nm 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.

e. Investigación de cardenólicos y bufadienólicos

Presencia de lactonas insaturadas: Extraer 10 g de material vegetal con 30 mL de etanol o metanol al 80 % y filtrar. Colocar tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 mL) sobre un papel filtro. Secar y agregar unas gotas del reactivo Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 %.

Presencia de azúcares 2-desoxigenadas: Evaporar 10 mL del extracto etanólico o metanólico, eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo.

Secar el residuo y agregar 3 mL de reactivo Keller-Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo.

Observar la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo).

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

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8), acetato de etilo-metanol-etanol-agua (81:11:4:8).

Detección:

Sin tratamiento químico: Fluorescencia por cardenólidos en UV-265 nm, la mayor fluorescencia es debida a los bufadienólidos. Los glicósidos cardíacos no fluorescen en UV-365 nm.

Detección del anillo lactónico de los cardenólidos: reactivo de Kedde, zonas rosa o azul violeta en vis, los bufadienólidos no reaccionan.

Reactivo de Kedde: 5 mL de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 3 % en etanol, mezclado con 5 mL de NaOH 2M.

f. Investigación de esteroides o triterpenoides

Reacciones de color

Liebermann Burchard: Aplicar unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en la que las saponinas triterpenoidales dan color rosado o púrpura.

Resultados (verde, azul verdoso) posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.

Ácido tricloroacético: Se le añade a la muestra unos cristales de ácido tricloroacético.

Resultado: color naranja, rojo, rojo oscuro, triterpenos tetracíclicos y esteroides desarrollan color a 60 °C, triterpenos pentacíclicos a 110 °C.

Carr-Price: 1 mg de muestra en cloroformo se le agrega 2 mL de tricloruro de antimonio al 30 % en cloroformo.

Resultado: color azul, posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.

g. Investigación de saponinas

Prueba de espuma:

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

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

Tubo 3: 2 mL de agua.

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

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

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).

h. Investigación de principios amargos

Cromatografía en capa fina: Calentar 1 g de material vegetal con 10 mL de metanol en baño de maría a 60 °C por 10 minutos. Evaporar y filtrar a 2 mL. Aplicar en la cromatoplaça. Estándar: artemisina al 1 % en metanol (20 µL).

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

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

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

i. Investigación de taninos

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

Tubo 1: testigo.

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

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

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

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

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

j. Investigación de glicósidos cianogénicos

Prueba de Guignard: Colocar 2 a 5 g de material vegetal pulverizado en un erlenmeyer de 125 mL y humedecer con agua; adicionar 1 mL de cloroformo. Aparte, introducir una tira de papel Whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente secar. La tira de papel húmedo insertarla en el

erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar a una distancia de 1 cm de la muestra. Doblar el papel y tapar el erlenmeyer con un corcho. Calentar en baño de maría a 37 °C durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo-café).

k. Investigación de aceites volátiles

Cromatografía en capa fina:

Método A:

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

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

Método B:

Pesar 10-50 g (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 50 µL (1:10) en cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3 µL).

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

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

l. Investigación de esteroides insaturados

En sayos macro y semimicro:

Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 %. Filtrar y concentrar a sequedad. Remover pigmentos vegetales con porciones de 10 mL de éter de petróleo hasta que el éter salga incoloro. Adicionar 10 mL de benceno y agitar durante unos minutos. Decantar en un tubo y secar con sulfato de sodio anhidro. Filtrar y evaporar a sequedad. Agregar 10 mL de

cloroformo, secar con sulfato de sodio anhidro, filtrar y dividir el filtrado en 3 tubos:

Tubo 1:

Agregar 3 gotas de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (Liebermann-Buchard).

Tubo 2:

Ensayo de anillo agregar ácido sulfúrico concentrado (Prueba de Salkowski).

Tubo 3: testigo.

Usar como estándar una solución de colesterol en cloroformo 0.1 %. Observar cambios de colores inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un período de una hora.

Prueba de anillo. En presencia de esteroides insaturados, formación de un anillo rojo cereza en la interfase.

m. investigación de sesquiterpenlactonas

Prueba de Legal:

1-2 mg de muestra en etanol o agua se le agrega 1 ml de solución fresca de nitroprusiato de sodio 0.5 % en agua y 1-4 gotas de KOH 2N. Se presenta colores característicos rojo oscuro, para lactosas α y β insaturadas.

Prueba de Baljet:

Preparación de reactivo:

- a) 1 g de ácido pícrico en etanol al 95 %.
- b) 10 g de NaOH en 100 mL de agua.

Se mezcla a y b y se añade a la muestra unas gotas del reactivo, se presenta un color rojo claro a oscuro.

Cromatografía en Capa Fina:

Fase Móvil:

Cloroformo: éter etílico (5:1), cloroformo: metanol (99:1), éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo (2:2:1).

Detección: Se puede emplear diferentes reveladores tales como: vapores de yodo, solución acuosa de permanganato de potasio al 5 %, ácido sulfúrico concentrado o al 50 %, vainilla al 1 % en etanol, luego del calentamiento de la placa por 5 minutos a 100-105 °C aparecerán manchas verdes, amarillas, marrones, rojas o azules.

7.2.4. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

Procedimiento

1. Preparación de Agar-Planta

- Preparar tubos con 9.0 mL de agar de Mueller Hinton.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min/ dejar enfriar a 50 °C y agregar 1.0 mL de la solución del extracto disuelto. Esta debe tener una concentración de 10 mg/mL La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL
- Agitar y verter en cajas de Petri estériles/ dejar solidificar e incubar a 36 °C por 24 horas/ para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

2. Preparación del Inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Muller Hinton inclinado, incubar 36 °C durante 24 horas.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya/ incubar a 36 °C durante 48 horas.
- Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1:100).
- Sembrar en caja de petri según la plantilla a utilizar.

3. Demostración de la Actividad Antibacteriana

- Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

Dejar reposar durante 5-10 min e incubar a 36 °C durante 24 horas.

- Utilizar como control negativo 9 mL de agar de Muller Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50 %.

4. Interpretación de Resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

6.2.5. Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

Procedimiento

1. Preparación de medio de cultivo

- Preparar tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud.
- Esterilizar durante 15 minutos a 121 °C, dejar enfriar a 50 °C y agregar 1.5 mL del extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL
- Verter en cajas de petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36 °C durante 24 horas para verificar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

2. Preparación de inóculo

- Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes: Dextrosa 0.6 g, Na₂SO₄ 0.3 g, KH₂P0₄ 0.3 g, Peptona 0.3 g, Agar-agar 6.0 g.

- Agregarlo a 300 mL de agua, disolver/ verter 6 mL en tubos con tapón de rosca/ esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25 °C para descartar contaminación.
- Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27 °C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).
- Agregar a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.
- Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- Llevar la suspensión a 100 esporas/ μl = 1×10^5 esporas/mL (aprox. 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

3. Inoculación de Hongos filamentosos en placa

- Abrir cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Dirham de 5 mm de diámetro. En forma equidistante.
- Tomar 30 mL de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27 °C por 14 días.
- Hacer un total de 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo.

4. Lectura e interpretación de los resultados

- Medir el diámetro de la colonia el hongo en mm.
- Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

- Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75 %.

7.2.6. Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

Procedimiento

1. Preparación de medio de cultivo

- Preparar tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton.
- Esterilizar a 121 °C durante 165 min, dejar enfriar a 50 °C y agregar 1.0 mL de extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL
- Guardar en refrigeración hasta el momento de uso.

2. Preparación del inóculo

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

3. Inoculación de levaduras en placa

- Inocular con asa la suspensión de levaduras en cada sección según plantilla.
- Incubar a 36 °C durante 48 h.
- Para el control negativo/ sembrar.

4. Lectura e interpretación de los resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

7.2.7. Concentración inhibitoria mínima (cim)

Procedimiento

1. Preparación de Agar-Planta

- Preparar tubos con 3.6, 3.8, 3.9 y 4 mL de agar Muller Hinton.
- Esterilizar a 121°C durante 15 min. dejar enfriar a 50 °C agregar la solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/ml) en una caja cuadrilata de la siguiente manera:

3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg/ml

3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/ml

3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/ml

Un cuadrante con 4.0 mL de agar con control negativo.

- Dejar solidificar e incubar a 36 °C por 24 horas/ para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta momento de usar:

2. Preparación del Inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Muller Hinton inclinado, incubar 36° C durante 24 horas.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, incubar a 36 °C durante 48 horas.
- Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1:100).

3. Demostración de la concentración mínima

- Inocular tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja, dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36 °C durante 24 horas.

4. Interpretación de resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

7.2.8. Citotoxicidad con *artemia salina*

Preparación del agua de mar

1. Disolver 35 g de la sal de mar en un litro de agua destilada.
2. Hacer una marca en el vaso de precipitar para indicar el volumen de agua.
3. Hervir por 30 minutos y completar el volumen que se evaporó según la marca.
4. Filtrar y refrigerar hasta el momento de usar, es estable por un mes a temperatura de 6-8 °C.

Cultivo de *Artemia salina*

1. Colocar en un vaso de precipitar 200 mL del agua y airear por 30 minutos.
2. Colocar el agua en la pecera y agregar 40 mg de jebecillos en el área cerrada (lado oscuro).
3. Incubar por 48 horas temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas).

Determinación de la Citotoxicidad

1. Pesar 0.040 g del extracto a ensayar y disolver con 4 mL de agua de mar con 10-15 nauplios.
Control negativo: 100 µl de agua de mar/ 100 µl de agua de mar con 10-15 nauplios.
2. Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
3. Contar en el estereoscopio o microscopio el número de nauplios muertos.

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

4. Interpretación: Calcular el % 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 del 50 %, repetir la prueba utilizando

Dosis: de 1.0 0.5 y 0.25 mg/Kg peso. Obtener los valores de X y Y en cada concentraciones y determinar el valor de CL₅₀ con el programa de computadora. Finney (DOS).

Si el % es menor del 50 % la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL

7.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

7.3.1 Actividad antibacteriana, antimicótica, antilevadura *in vitro*

A. Diseño

Se realizó un diseño totalmente al azar, con cuatro réplicas como mínimo para microorganismo los cuales son los siguientes:

1. *Aspergillus niger*.
2. *Aspergillus fumigatus*.
3. *Sporothrix schenckii*.
4. *Fonsecaea pedrosoi*.
5. *Trichophyton rubrum*.
6. *Staphylococcus aureus*.
7. *Salmonella typhi*.
8. *Bacillus subtilis*.
9. *Pseudomonas aeruginosa*.
10. *Escherichia coli*.
11. *Mycobacterium smegmatis*.

12. *Candida albicans*.

13. *Cryptococcus neoformans*.

B. Análisis

Prueba de hipótesis binomial, empleando un $\alpha = 0.10$ (90% de confianza) esperando que los que de los cuatro ensayos, los cuatro sean negativos, para concluir que el o los extractos tienen actividad.

De los que presenten actividad se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM), los cuales se realiza de igual manera que la antibacteriana.

7.3.2. A. salina. Ensayo cuandal.

A. Diseño. Con réplicas como mínimo de tres, a dosis de una concentración

B. Análisis. Se realiza un análisis de regresión no paramétrico con base en transformación probítica y se determina la DL50 por el método de Finney.

7.3.3. Tamizaje fitoquímico.

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables observadas:

- Investigación de alcaloides.
- Investigación de flavonoides y antocianinas.
- Investigación de antraquinonas.
- Investigación de cumarinas.
- Investigación de cardenólicos y bufadienólicos.
- Investigación de esteroides o triterpenoides.
- Investigación de saponinas.
- Investigación de principios amargos.
- Investigación de taninos.
- Investigación de glicósidos cianogénicos.
- Investigación de aceites volátiles.
- Investigación de esteroides insaturados.
- Investigación de sesquiterpenlactonas.

8. RESULTADOS

8.1. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA.

Muestra: 1 kg de fruto de *B. alicastrum* y 0.5 kg de hojas de *B. alicastrum*.

Procedencia: Aldea El Caoba, municipio de Flores Departamento de Petén.

Elevación promedio: 344 nsnm latitud: 17° 00' 57.8" longitud: 89° 40' 27.5".

Colectó: Darwin Miguel Teni Milián, Marcial Cordova Alvarez Coordinador de campo de biología para WCS (Sociedad de Conservación para la vida Silvestre), 9-03-2007.

Determinó: EDC Luis Álvarez 12-03-2007.

Registro: 1,019 HERBARIO FARMAYA.

8.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Tabla No. 1. Porcentaje de Humedad en Pulpa y Semilla

No. de lecturas.	Muestra	Porcentaje de humedad.
1	Pulpa y semilla	7.43
2	Pulpa y semilla	7.45
3	Pulpa y semilla	7.40
4	Pulpa y semilla	7.43

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Media: 7.42, Variación: 0.000375, Desviación Estándar: 0.0193, Coeficiente de variación: 0.2601.

Tabla No. 2. Porcentaje de Humedad en Pericarpio

No. de lecturas.	Muestra	Porcentaje de humedad.
1	Pericarpio	8.70
2	Pericarpio	8.68
3	Pericarpio	8.70
4	Pericarpio	8.72

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Media: 8.70, Variación: 0.0017, Desviación Estándar: 0.0412, Coeficiente de variación: 0.4735.

Tabla No. 3. Porcentaje de Humedad en Hojas

No. de lecturas.	Muestra	Porcentaje de humedad.
1	Hojas	7.05
2	Hojas	7.07
3	Hojas	7.04
4	Hojas	7.06

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Media: 7.05, Variación: 0.00015, Desviación Estándar: 0.0122, Coeficiente de variación: 0.1730.

8.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Tabla No. 4. Porcentaje de rendimiento de los extractos en diclorometano y metanol

		Gramos de muestra	Gramos de extracto	Porcentaje de rendimiento
Extracto diclorometánico	Pericarpio	299.20	4.00	1.34
	Pulpa y semilla	266.90	3.60	1.35
	Hojas	118.40	3.40	2.87
Extracto metanólico	Pericarpio	299.20	64.10	21.42
	Pulpa y semilla	266.90	15.60	5.84
	Hojas	118.40	10.60	8.95

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente.

* Para el cálculo del porcentaje de rendimiento ver anexo No. 1.

8.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

8.4.1. Investigación de alcaloides

Tabla No. 5. Determinación de alcaloides con reactivo de Mayer's, Dragendorff, Wagner.

Extracto	A: Reactivo de Mayer's	Resultado de Mayer's	B: Reactivo de Dragendorff	Resultado Dragendorff	C: Reactivo de Wagner.	Resultado Wagner.	D: testigo
Metanol pulpa y semilla.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	Ligera coloración amarilla pálida.	Negativo.	Coloración amarilla fuerte, formación de coloide, dos fases	Negativo.	Verde pálido
Diclorometano pulpa y semilla.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	Formación de coloide amarillo.	Negativo.	Coloración rosada.	Negativo.	Verde pálido
Metanol pericarpio.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	Coloración amarilla fuerte, formación de coloide, dos fases	Negativo.	Verde pálido
Diclorometano pericarpio.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	Coloración rosada.	Negativo.	Amarillo
Metanol hojas.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	No existe cambio de coloración ni presencia de precipitado.	Negativo.	Coloración amarilla fuerte, formación de coloide, dos fases	Negativo.	Verde pálido
Diclorometano hojas.	Turbidez en comparación al testigo, coloración verde-amarillo	Negativo.	Coloración amarillo-verde más turbia que el testigo.	Negativo.	Coloración rosada.	Negativo.	Verde olivo
Papaverina	Incolora.	Negativo.	Formación de dos fases color amarillo en el fondo, presencia de precipitado, indica la presencia del alcaloide papaverina.	Positivo.	Formación de dos fases coloración naranja.	Positivo.	Incoloro.
Atropina	Coloración crema presencia del alcaloide atropina.	Positivo.	Formación de coloide fases, coloración amarilla.	Positivo.	Formación de dos fases coloración naranja.	Positivo.	Incoloro.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. A: reactivo de Mayer's (color blanco a crema). B: reactivo de Dragendorff (color rojo a naranja). C: reactivo de Wagner (color marrón). D: testigo (extracto diluido en solvente respectivo)

8.4.1.1. Cromatografía en capa fina sin tratamiento químico.

Tabla No. 6. Determinación de alcaloides en capa fina sin tratamiento químico.

Extracto	Rf	Observaciones.
Metanol pulpa y semilla.	---	No presenta fluorescencia.
Diclorometano pulpa y semilla.	0.15 0.46 0.86	Florescencia aqua. Florescencia violeta. Florescencia aqua.
Metanol pericarpio.	---	No presenta fluorescencia.
Diclorometano pericarpio.	0.15 0.47 0.80	Florescencia aqua. Florescencia violeta. Florescencia aqua.
Metanol hojas.	---	No presenta fluorescencia.
Diclorometano hojas.	0.9	Mancha oscura.
Papaverina	---	No presenta fluorescencia.
Atropina	0.50	Florescencia amarilla.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente.

8.4.1.2. Cromatografía en capa fina con revelador Dragendorff.

Tabla No. 7. Determinación de alcaloides en capa fina con revelador Dragendorff.

Extracto	Rf	Observaciones.	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	---	No presenta zonas coloreadas.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	---	No presenta zonas coloreadas.	Negativo.
Metanol pericarpio.	---	No presenta zonas coloreadas.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	---	No presenta zonas coloreadas.	Negativo.
Metanol hojas.	---	No presenta zonas coloreadas.	Negativo.
Diclorometano hojas.	---	No presenta zonas coloreadas.	Negativo.
Papaverina	0.31	Zonas naranja.	Positivo.
Atropina	0.50	Zonas naranja.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Fase móvil: tolueno, acetato de etilo, dietilamina (35:10:5). Revelador: reactivo de Dragendorff manchas naranja.

8.4.2. Investigación de flavonoides y antocianinas.

Tabla No. 8. Prueba Macro y semimicro en 0.5 ml de ácido sulfúrico, Cloruro férrico al 10%, para leucoantocianinas, con magnesio metálico y ácido clorhídrico.

Extracto	Tubo No.1	Resultado	Tubo No.2	Resultado	Tubo No.3	Resultado	Tubo No.4	Resultado	Tubo No.5
Metanol pulpa y semilla.	Incoloro.	Negativo.	Amarillo cristalino.	Negativo.	Amarillo cristalino.	Negativo.	Amarillo cristalino.	Negativo.	Amarillo cristalino.
Diclorometano pulpa y semilla.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.
Metanol pericarpio.	Amarillo cristalino.	Negativo.	Amarillo cristalino.	Negativo.	Amarillo cristalino.	Negativo.	Amarillo cristalino.	Negativo.	Amarillo cristalino.
Diclorometano pericarpio.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.	Negativo.	Incoloro.
Metanol hojas.	Formación de precipitado, no cambia de color.	Positivo.	Verde oscuro (Igual que testigo)	Negativo.	Verde oscuro (Igual que testigo)	Negativo.	Verde oscuro (Igual que testigo)	Negativo.	Verde oscuro
Diclorometano hojas.	No presentó precipitado ni cambio en su coloración.	Negativo.	Verde pálido (Igual que testigo)	Negativo.	Verde pálido (Igual que testigo)	Negativo.	Verde pálido (Igual que testigo)	Negativo.	Verde pálido

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. A: tubo 1: 0.5 mL de ácido sulfúrico. B: tubo 2: 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10% (p/v). C: tubo 3: 0.5 mL de ácido clorhídrico y calentar en baño maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas). D: tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado. E: tubo 5: testigo. (+) cambios de color y formación de precipitado comparado con el testigo

Tabla No. 9. Determinación de flavonoides y antocianinas en cromatografía en capa fina.

Extracto	Rf	Observaciones.
Metanol pulpa y semilla.	0.90	Fluorescencia de color violeta-azul.
Diclorometano pulpa y semilla.	0.90 0.93	Fluorescencia de color violeta-azul. Fluorescencia de color aqua.
Metanol pericarpio.	0.29 0.90 0.94	Fluorescencia verde. Fluorescencia azul. Fluorescencia naranja.
Diclorometano pericarpio.	0.90	Fluorescencia azul
Metanol hojas.	0.95	Fluorescencia naranja.
Diclorometano hojas.	0.90 0.95	Fluorescencia azul. Fluorescencia naranja.
Quercetina	0.95	Fluorescencia naranja.
Rutina	0.35	Fluorescencia naranja.
Acido Clorogénico	0.53 0.85	Fluorescencia verde. Fluorescencia verde
Hyperósido	0.31 0.70	Fluorescencia naranja. Fluorescencia naranja.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, etilmetilcetona, agua (25:2.5: 1:10:5). Revelador: reactivo de productos naturales (NP/PEG). Florescencia, zonas azules o amarillas. Dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

8.4.3. Investigación de Antraquinonas.

Tabla No. 10. Prueba de Bornträger.

Extracto	Observaciones	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	Separación de ambas fases. Fase bencénica con una apariencia opaca	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	La fase bencénica presenta una apariencia amarillo claro.	Negativo.
Metanol pericarpio.	La fase bencénica no cambia de color.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	La fase bencénica no cambia de color.	Negativo.
Metanol hojas.	La fase bencénica no cambia de color.	Negativo.
Diclorometano hojas.	La fase bencénica no cambia de color.	Negativo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

8.4.4. Investigación de Cumarinas.

Tabla No. 11. Prueba macro y semimicro para la determinación de cumarinas.

Extracto	Observaciones	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	Fluorescencia azul.	Positivo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Fluorescencia azul.	Positivo.
Metanol pericarpio.	Fluorescencia verde.	Positivo.
Diclorometano pericarpio.	Fluorescencia azul.	Positivo.
Metanol hojas.	Fluorescencia azul.	Positivo.
Diclorometano hojas.	Fluorescencia naranja.	Negativo.
Estándar de Cumarina	Fluorescencia azul.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Positivo: Fluorescencia azul o verde.

Tabla No. 12. Determinación de cumarinas en cromatografía en capa fina.

Extracto	Rf	Observaciones.	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	---	No presentó fluorescencias.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	0.025 0.062 0.11 0.40	Fluorescencia violeta. Fluorescencia aqua. Fluorescencia celeste. Fluorescencia celeste.	Positivo.
Metanol pericarpio.	---	No presento fluorescencias.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	0.025 0.10 0.25 0.42	Fluorescencia violeta. Fluorescencia celeste. Fluorescencia naranja pálido. Fluorescencia verde.	Positivo.
Metanol hojas.	---	No presento fluorescencias.	Negativo.
Diclorometano hojas.	0.25 0.41	Fluorescencia naranja. Fluorescencia naranja.	Positivo.
Ácido cafeinóico	---	No fue afín a la fase móvil.	Negativo.
Estándar de Cumarina	0.062 0.42 0.56	Fluorescencia acua. Fluorescencia verde. Fluorescencia verde.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Fase móvil: tolueno y acetato de etilo (46:3.5). Revelador: hidróxido de potasio 5% en etanol, UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

8.4.5. Investigación de cardenólidos y bufadienólicos.

Tabla No. 13. Prueba Macro y Semimicro en Lactonas Insaturadas.

Extracto	Reactivo de Kedde 0.1 mL	Reactivo de Kedde 0.2 mL	Reactivo de Kedde 0.3 mL	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	Mancha.	Mancha con anillo púrpura.	Mancha con anillo púrpura.	Positivo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Mancha rosado-naranja.	Mancha rosado-naranja.	Mancha rosado-naranja.	Positivo.
Metanol pericarpio.	Mancha rosado-naranja con ligera formación de anillo púrpura.	Mancha rosado-naranja con ligera formación de anillo púrpura.	Mancha rosado-naranja con ligera formación de anillo púrpura.	Positivo.
Diclorometano pericarpio.	Mancha rosado-naranja con la presencia de anillo púrpura bien marcado.	Mancha rosado-naranja con la presencia de anillo púrpura bien marcado.	Mancha rosado-naranja con la presencia de anillo púrpura bien marcado.	Positivo.
Metanol hojas.	Mancha rosado-naranja sin la formación del anillo púrpura.	Mancha rosado-naranja sin la formación del anillo púrpura.	Mancha rosado-naranja sin la formación del anillo púrpura.	Positivo.
Diclorometano hojas.	Mancha rosado-naranja sin la formación del anillo púrpura.	Mancha rosado-naranja sin la formación del anillo púrpura.	Mancha rosado-naranja sin la formación del anillo púrpura.	Positivo.
Digoxina	Mancha con anillo púrpura.	Mancha con anillo púrpura.	Mancha con anillo púrpura.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Positivo mancha o anillo púrpura.

Tabla No. 14. Prueba Macro y Semimicro en Azúcares 2-desoxigenadas.

EXTRACTO	Reactivo de Keller-Killiani	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	Formación de de dos fases la superior incolora y la inferior marrón.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Formación de de dos fases la superior incolora y la inferior naranja.	Negativo.
Metanol pericarpio.	Coloración café pálido	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	Formación de de dos fases la superior incolora y la inferior café pálida.	Negativo.
Metanol hojas.	Formación de de dos fases la superior incolora y la inferior café.	Negativo.
Diclorometano hojas.	Formación de de dos fases la superior incolora y la inferior verde oscura-café.	Negativo.
Digoxina	Anillo púrpura en la interfase	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Positivo: anillo púrpura.

Tabla No. 15. Determinación de Cardenólidos y Bufadienólicos en cromatografía en capa fina.

Extracto	Rf	Observaciones.	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	0.25	Fluorescencia aqua.	Positivo.
Diclorometano pulpa y semilla.	0.81	Fluorescencia violeta-verde intenso.	Positivo.
Metanol pericarpio.	0.25	Fluorescencia aqua.	Positivo.
Diclorometano pericarpio.	0.81	Fluorescencia violeta-naranja intenso.	Positivo.
Metanol hojas.	0.22	Fluorescencia aqua.	Positivo.
Diclorometano hojas.	0.87	Fluorescencia naranja.	Positivo.
Digoxina	0.75	Fluorescencia aqua.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Fase móvil: acetato de etilo, metanol, agua. (36:7.5:4). Revelador: reactivo de Kedde, reactivo de Kedde, zonas rosa o azul violeta en vis, los bufadienólidos no reaccionan.

8.4.6. Investigación de esteroides o triterpenoides.

Tabla No. 16. Determinación de esteroides o triterpenoides con reactivo Libermann Burchard.

Extracto	Libermann Burchard	Testigo	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	No hubo cambio de coloración.	Amarillo cristalino	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Coloración verde pálido	Incoloro	Positivo.
Metanol pericarpio.	No hubo cambio de coloración.	Amarillo cristalino	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	Coloración azul-verdoso.	Incoloro	Positivo.
Metanol hojas.	No hubo cambio de coloración.	Verde oscuro	Negativo.
Diclorometano hojas.	Verde intenso.	Verde pálido	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. (+): Saponinas triterpenoidales dan color rosado o púrpura, verde azul verdoso posible esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados.

Tabla No. 17. Prueba macro y semimicro de esteroides o triterpenoides con ácido tricloroacético.

Extracto	Ácido tricloroacético	Testigo	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	No hubo cambio de coloración.*	Amarillo cristalino	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Coloración verde a 60°C.*	Incoloro	Positivo.
Metanol pericarpio.	No hubo cambio de coloración.*	Amarillo cristalino	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	Coloración verde a 60°C.*	Incoloro	Positivo.
Metanol hojas.	No hubo cambio de coloración.*	Verde oscuro	Negativo.
Diclorometano hojas.	Verde intenso.*	Verde pálido	Negativo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. (+) color naranja, rojo, rojo oscuro, triterpenos tetracíclicos y esteroides desarrollan color a 60°C, triterpenos pentacíclicos a 110°C.

* No presentaron coloración a 110°C.

8.4.7. Investigación de Saponinas.

Tabla No. 18. Prueba macro y semimicro para la determinación de Saponinas prueba de espuma.

Extracto	Observaciones	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	No se formó espuma.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	No se formó espuma.	Negativo.
Metanol pericarpio.	No se formó espuma.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	No se formó espuma.	Negativo.
Metanol hojas.	Presencia de espuma 0.5 cm.	Negativo.
Diclorometano hojas.	No se formó espuma.	Negativo.
Control 2mL de saponinas (0.5%)	Formación de espuma 1 cm.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Positiva: espuma mayor a 3cm

Tabla No. 19. Determinación de Saponinas en cromatografía en capa fina.

EXTRACTO	Rf	Observaciones.	RESULTADO
Metanol pulpa y semilla.	---	No presentó zonas rojas	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	0.88	Zonas con fondo rojo	Positivo.
Metanol pericarpio.	---	No presentó zonas rojas	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	0.88	Zonas con fondo rojo	Positivo.
Metanol hojas.	---	No presentó zonas rojas	Negativo.
Diclorometano hojas.	0.88	Zonas con fondo rojo	Positivo.
Estándar de saponinas	0.88	Zonas con fondo rojo	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Fase móvil: Cloroformo, metanol, agua. (64:50:10). Revelador: Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas, rojas

8.4.8. Investigación de principios amargos.

Tabla No. 20. Determinación de principios amargos en cromatografía en capa fina.

Extracto	Rf	Observaciones.	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	0.81	Fluorescencia violeta	Negativo.
	0.87	Fluorescencia acua	
	0.90	Fluorescencia naranja	
Diclorometano pulpa y semilla.	0.81	Fluorescencia violeta	Negativo.
	0.87	Fluorescencia acua	
Metanol pericarpio.	0.92	Fluorescencia naranja	Positivo.
Diclorometano pericarpio.	0.83	Fluorescencia violeta	Negativo.
	0.90	Fluorescencia amarillo-naranja	
Metanol hojas.	0.92	Fluorescencia naranja	Positivo.
Diclorometano hojas.	0.92	Fluorescencia naranja	Positivo.
Extracto de <i>Neurolaena lobata</i>	0.92	Fluorescencia naranja	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Fase móvil: acetato de etilo, metanol, agua. (35:7.5:4). Revelador: vainillina ácido sulfúrico. (+): Zonas rojas-violetas, cafés-rojas, azules-verdes.

8.4.9. Investigación de taninos.

Tabla No. 21. Prueba macro y semimicro para taninos.

Extracto	Tubo no. 1 testigos	Tubo no. 2 solución de gelatina al 1%	tubo no. 3 solución de gelatina en sal	Tubo no. 4 solución de cloruro ferrico al 10%	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	Amarillo cristalino.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Amarillo cristalino.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	Negativo.

Extracto	Tubo no. 1 testigos	Tubo no. 2 solución de gelatina al 1%	tubo no. 3 solución de gelatina en sal	Tubo no. 4 solución de cloruro ferrico al 10%	Resultado
Metanol pericarpio.	Amarillo cristalino.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	Amarillo.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	Negativo.
Metanol hojas.	Amarillo cristalino.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	Negativo.
Diclorometano hojas.	Amarillo verdoso.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	No presentó precipitado ni cambio de coloración.	Negativo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. (+) Formación de precipitado y/o cambio de coloración. Tubo 1: Testigo extracto en solvente respectivo. Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v). Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10 por ciento). Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

8.4.10. Investigación de glicósidos cianogénicos.

Tabla No. 22. Prueba de Grignard.

Extracto	Prueba de grignard	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	Coloración amarilla no cambia.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Coloración amarilla no cambia.	Negativo.
Metanol pericarpio.	Coloración amarilla no cambia.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	Coloración amarilla no cambia.	Negativo.
Metanol hojas.	Coloración amarilla no cambia.	Negativo.
Diclorometano hojas.	Coloración amarilla no cambia.	Negativo.
Testigo	Coloración amarilla cambia a rojo-café	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. (+) Se observa de amarillo a rojo-café.

8.4.11. Investigación de aceites volátiles.

Tabla No. 23. Determinación de aceites volátiles en cromatografía en capa fina.

Extracto	Rf	Observaciones.	RESULTADO
Metanol pulpa y semilla.	---	No fue afín a la fase móvil.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	0.39 0.82	Coloración marrón. Coloración marrón.	Positivo.
Metanol pericarpio.	---	No fue afín a la fase móvil.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	0.39 0.82	Coloración marrón. Coloración marrón.	Positivo.
Metanol hojas.	---	No fue afín a la fase móvil.	Negativo.
Diclorometano hojas.	0.39	Coloración marrón.	Positivo.
Nerol	0.33	Coloración marrón.	Positivo.
1-8-cineol	0.56	Coloración rosada.	Positivo.
p-cimeno	---	No fue afín a la fase móvil.	Negativo.
Eugenol	0.55	Coloración amarillo-naranja.	Positivo.
Limoneno	0.27 0.62	Coloración azul. Coloración rosada.	Positivo.
Citronelal.	0.25 0.33 0.77	Coloración marrón. Coloración violeta. Coloración amarilla-naranja	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Fase móvil: tolueno y acetato de etilo (46:3.5). Revelador: vainillina ácido sulfúrico, Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

8.4.12. Investigación de esteroles insaturados.

Tabla No. 24. Prueba de Liebermann-Buchard y de Salkowski.

Extracto	Tubo No.1	Tubo No.2	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	Incoloro.	Formación de interfase de color rosado pálido.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	Interfase de color rosado pálido.	Interfase de color naranja.	Negativo.
Metanol pericarpio.	Incoloro	Interfase de color rosado pálido.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	Interfase de color café	Interfase de color café	Negativo.
Metanol hojas.	Interfase color verde-musgo	Interfase color verde-musgo	Negativo.
Diclorometano hojas.	Interfase color verde	Verde pálido.	Negativo.
Estándar de colesterol en cloroformo 0.1%	Primera coloración rosado pálido luego de agitación coloración azul-verde.	No se forma la interfase con anillo pero si la presencia de una coloración naranja.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. Tubo No.1 agregar 3g de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado. (Liebermann-Buchard). Tubo No.2 agregar ácido sulfúrico concentrado (Prueba de Salkowski). Positivo: Formación de un anillo rojo cereza en la interfase.

8.4.13. Investigación de sesquiterpenlactonas.

Tabla No. 25. Prueba de Badljet.

Extracto	Prueba de badljet.	Resultado
Metanol pulpa y semilla.	(-) Coloración amarilla.	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	(-) Coloración amarilla pálida.	Negativo.
Metanol pericarpio.	(-) Coloración amarilla.	Negativo.
Diclorometano pericarpio.	(-) Coloración amarilla.	Negativo.
Metanol hojas.	(-) Coloración marrón con la presencia de precipitado.	Negativo.
Diclorometano hojas.	(-) Coloración verde oscuro.	Negativo.
Neurolena	Coloración naranja.	Positivo.
Aucubina	Coloración naranja.	Positivo.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. (+): Presencia de un color rojo claro a oscuro

Tabla No. 26. Resumen de resultados del Tamizaje Fitoquímico

EXTRACTOS	Alcaloides	Flavonoides y Antocianinas	Antraquinonas	Cumarinas	Cardenólicos y Bufadienólicos Lactonas Insaturadas.	Cardenólicos y Bufadienólicos en Azúcares 2-desoxigenadas.	Esteroides o Triterpenoides
METANOL							
PULPA Y SEMILLA	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo.	Positivo	Negativo	Negativo
PERICARPIO	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
HOJAS	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
DICLOROMETANO							
PULPA Y SEMILLA	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
PERICARPIO	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
HOJAS	Negativo	Positivo.	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	Tabla 5-10	Tabla 11-16	Tabla 17	Tabla 18-19	Tabla 20 y 22	Tabla 21 y 22	Tabla 23 y 24

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente.

Tabla No. 27. Resumen de resultados del Tamizaje Fitoquímico

EXTRACTOS	Saponinas	Principios Amargos	Taninos.	Glicósidos Cianogénicos	Aceite Volátiles	Esteroles Insaturados	Sesquiterpenlactonas
METANOL							
PULPA Y SEMILLA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PERICARPIO	Negativo	Positivo.	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
HOJAS	Negativo	Positivo.	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
DICLOROMETANO							
PULPA Y SEMILLA	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
PERICARPIO	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
HOJAS	Positivo	Positivo.	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	Tabla 25 y 26	Tabla No. 27	Tabla 28-29	Tabla 30	Tabla 31	Tabla No. 32	Tabla No. 33

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente.

8.5. TAMIZAJE ANTIBACTERIANO *in vitro*.

Tabla No. 28. Tamizaje antibacteriano *in vitro* a 1mg/mL.

Extracto/Bacteria	A	B	C	D	E	F	Actividad biocida
Diclorometano pericarpio.	_*	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	_*	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Metanol pericarpio.	_*	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Metanol pulpa y semilla.	_*	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Diclorometano hojas.	_*	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Metanol hojas.	_*	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Control	_*	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.

Fuente: Experimental. (+) Actividad positiva sin crecimiento microbiano. (-) Actividad negativa con crecimiento microbiano. A: *Staphylococcus aureus*. B: *Salmonella typhi*. C: *Mycobacterium smegmatis*. D: *Bacillus subtilis*. E: *Pseudomonas aeruginosa* F: *Escherichia coli*.

NOTA: * "p > 0.10"

8.6. TAMIZAJE ANTIMICÓTICO *in vitro* a 1mg/mL.

Tabla No. 29. Tamizaje antimicótico *in vitro*.

Extracto/Hongo	A	B	C	D	E	Actividad biocida
Diclorometano pericarpio.	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Metanol pericarpio.	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Metanol pulpa y semilla.	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Diclorometano hojas.	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Metanol hojas.	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.
Control	_*	_*	_*	_*	_*	Negativo.

Fuente: Experimental. (+) Actividad positiva sin crecimiento microbiano. (-) Actividad negativa con crecimiento microbiano. A: *Aspergillus niger*. B: *Aspergillus fumigatus*. C: *Trichophyton rubrum*.

D: *Sporothrix schenckii*. E: *Fonsecaea pedrosoi*.

NOTA: * "p > 0.10"

8.7. TAMIZAJE ANTILEVADURA *in vitro*

Tabla No. 30. Tamizaje antilevadura *in vitro* a 1mg/mL.

Extracto/Levadura	A	B	Actividad biocida
Diclorometano pericarpio.	_*	_*	Negativo.
Diclorometano pulpa y semilla.	_*	_*	Negativo.
Metanol pericarpio.	_*	_*	Negativo.
Metanol pulpa y semilla.	_*	_*	Negativo.
Diclorometano hojas.	_*	_*	Negativo.
Metanol hojas.	_*	_*	Negativo.
Control	_*	_*	Negativo.

Fuente: Experimental. (+) Actividad positiva sin crecimiento microbiano.

(-) Actividad negativa con crecimiento microbiano. A: *Candida albicans*.

B: *Cryptococcus neoformans*

NOTA: * "p > 0.10"

8.8. CITOTOXICIDAD CON *Artemia salina*Tabla No. 31. Citotoxicidad con *A. salina* 1mg/mL

No. De replicas	Nauplios incubados.			Camarones muertos			Resultados		
	1	2	3	1	2	3			
Extracto							X	Y	%
Diclorometano pericarpio.	11	13	10	0	3	0	3	34	8.82
Diclorometano pulpa y semilla.	11	12	13	0	2	0	2	36	5.56
Metanol pericarpio.	14	10	13	1	0	1	2	37	5.41
Metanol pulpa y semilla.	11	10	14	1	1	1	3	35	8.57
Diclorometano hojas.	11	13	15	1	0	1	2	39	5.13
Metanol hojas.	12	10	11	0	2	0	2	33	6.06
Control negativo	13	11	14	0	0	0	0	38	0.00
DMSO	14	12	11	1	2	1	4	37	10.81

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. X: número de camarones muertos en los tres pozos. Y: número total de camarones en los tres pozos (Y). %: de camarones muertos. Se considera con actividad cuando hay muerte en el 50 % de los nauplios.

Tabla No. 40. Citotoxicidad con *Artemia salina* 1mg/mL

No. De replicas	Nauplios incubados.			Camarones muertos.			Resultados		
	1	2	3	1	2	3			
Extracto							X	Y	%
Diclorometano pericarpio.	10	11	12	0	2	1	3	33	9.09
Diclorometano pulpa y semilla.	13	10	11	0	0	0	0	34	0.00
Metanol pericarpio.	12	10	14	0	0	1	1	36	2.78
Metanol pulpa y semilla.	11	10	14	0	0	1	1	35	2.86
Diclorometano hojas.	12	13	15	0	4	0	4	40	10.00
Metanol hojas.	12	11	14	0	0	2	2	37	5.41
Control negativo	10	11	14	0	0	0	0	35	0.00
DMSO	14	13	12	1	1	3	0	39	0.00

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. X: número de camarones muertos en los tres pozos. Y: número total de camarones en los tres pozos (Y). %: de camarones muertos. Se considera con actividad cuando hay muerte en el 50 % de los nauplios.

Tabla No. 41. Citotoxicidad con *Artemia salina* 1mg/mL

No. De replicas	Nauplios incubados			Camarones muertos			Resultados		
	1	2	3	1	2	3			
Extracto							X	Y	%
Dicloro-metano pericarpio.	14	12	13	0	0	0	0	39	0.00
Dicloro-metano pulpa y semilla.	15	12	11	0	0	1	1	38	2.63
Metanol pericarpio.	13	14	14	0	1	1	2	41	4.88
Metanol pulpa y semilla.	10	14	14	0	0	0	0	38	0.00
Diclorometano hojas.	10	12	15	2	0	0	2	37	5.41
Metanol hojas.	11	12	10	0	0	0	0	33	0.00
Control negativo	10	11	10	0	0	0	0	31	0.00
DMSO	13	12	11	3	4	2	0	36	0.00

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente. X: número de camarones muertos en los tres pozos. Y: número total de camarones en los tres pozos (Y). %: de camarones muertos. Se considera con actividad cuando hay muerte en el 50 % de los nauplios.

9. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la actividad biocida y se realizó el tamizaje fitoquímico de cinco extractos de la planta conocida popularmente como: ramón (*B. alicastrum*. Swartz)

Con respecto al porcentaje de rendimiento, en la tabla No. 4 puede observarse que el metanol, fue el mejor disolvente extractor en comparación con el diclorometano. Dentro de los extractos metanólicos, el obtenido del pericarpio fue el que presentó el mayor rendimiento. En el pericarpio y hojas se encontró los siguientes metabolitos secundarios: principios amargos, flavonoides en hojas, cumarinas, cardenólidos y Bufadienólicos lactonas insaturadas en fruto y hojas. Aunque los porcentajes de rendimiento de los extractos diclorometánicos es bajo, este solvente permitió extraer en fruto y hojas algunos metabolitos secundarios de interés como: flavonoides en hojas, cumarinas en el fruto, cardenólidos y bufadienólicos lactonas insaturadas, esteroides, saponinas, aceites volátiles y sesquiterpenlactonas solo en hojas.

En cuanto a la determinación de alcaloides en la tablas No. 5 a 10 se puede observar los diferentes pruebas y reactivos utilizados para comprobar su presencia en los diferentes extractos de *B. alicastrum*, cuyos fueron negativos. Aunque según un estudio realizado en los años 1889 en el Instituto Médico Nacional se encontraron alcaloides en *B. alicastrum*. Sin embargo, no se especifica los alcaloides que contiene, ni la metodología utilizada. Si se asume que se realizaron pruebas preliminares, este resultado concuerda con los descritos en las Tablas No. 5-9; ya que en dichos ensayos se observaron precipitados y cambios de color con los diferentes reactivos. Sin embargo por ser una prueba presuntiva, puede dar falsos positivos, debido a la presencia de proteínas u otros compuestos que reaccionan con dichos reactivos. Es por ello que se realizó la cromatografía en capa fina para confirmar su presencia. Sin embargo no fue posible observar las manchas

características con el reactivo de Dragendorff. Por tanto se descarta la presencia de alcaloides en hojas y frutos de *B. alicastrum*.

Según las pruebas realizadas en el laboratorio, las hojas y frutos de *B. alicastrum* no presentan antraquinonas (tabla No. 17), azúcares 2-desoxigenadas (tabla No. 21 y 22), taninos (tabla No. 28 y 29), glicósidos cianogénicos (tabla No. 30), esteroides insaturados (tabla No. 32) y sesquiterpenlactonas (Tabla No. 33). De acuerdo a la revisión bibliográfica revisada, esto coincide con publicaciones anteriores.

Como puede observarse en las tablas de la 11 a la 16, las hojas del extracto diclorometánico y metanólico, presentan flavonoides, probablemente de tipo quercetina, ya que su R_f coincide con el estándar utilizado. Además presentó una fluorescencia naranja en la cromatografía de capa fina. En la tabla No. 18 y 19 los extractos metanólicos y diclorometánicos de frutos y hojas se observa la presencia de cumarinas, excepto para el extracto diclorometánico de hojas. Las lactonas insaturadas se encuentran presentes en todos los extractos obtenidos (tabla No. 20 y 22). Los esteroides con doble enlace $C=C$ (tabla No. 23-24), saponinas (tabla No. 25 y 26) y aceites volátiles (tabla No. 31) fueron identificados únicamente en el extracto diclorometánico de frutos y hojas.

Algunos de los metabolitos identificados en los extractos investigados del *B. alicastrum* están relacionados con la actividad biocida, especialmente las saponinas, flavonoides, y aceites volátiles; por lo tanto los resultados obtenidos en esta investigación constituyen un aporte importante al respecto de las mismas, ya que son grupos de metabolitos que dan como resultado una actividad biocida positiva, aunque en la presente investigación no se obtuvo una actividad biocida positiva, esto fue comprobado en las diferentes pruebas *in vitro* para determinar la actividad biocida pero ninguno de los extractos presentó dicha actividad ($p > 0.10$). Se esperaba que el extracto diclorometánico mostrara mayor actividad biocida, ya que algunas especies vegetales que presentan esta actividad poseen saponinas y

aceites volátiles como metabolitos secundarios. También se observa la presencia de principios amargos en el extracto metanólico de frutos y para ambos extractos obtenidos de las hojas.

Para obtener un perfil más completo del comportamiento de los extractos obtenidos, se determinó a través de nauplios de *A. salina* que la planta Ramón *B. alicastrum* no presenta una toxicidad menor a 1000 ppm, por cual no puede ser utilizada para destruir células anormales de organismos vivos. Es decir, que no posee actividad citotóxica.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. Se determinó mediante ensayos *in vitro*, que la especie *B. alicastrum* no presenta actividad biocida contra bacterias, levaduras, hongos, ni citotoxicidad contra *A. salina*. ($p > 0.10$)
- 10.2. El extracto metanólico del fruto de *B. alicastrum* presenta cumarinas, lactonas insaturadas y principios amargos.
- 10.3. El extracto metanólico y diclorometánolico de hojas de *B. alicastrum* presenta flavonoides tipo quercetina.
- 10.4. El extracto diclorometánico del fruto de *B. alicastrum* presenta cumarinas, lactonas insaturadas, esteroides con doble enlace C=C, saponinas y aceites volátiles.
- 10.5. El extracto diclorometánico de hojas de *B. alicastrum* presenta lactonas insaturadas, esteroides con doble enlace C=C, saponinas, principios amargos, aceites volátiles.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1** Realizar otro tipo de estudios como la determinación de actividad antioxidante, actividad contra otros microorganismos debido a los metabolitos encontrados y las propiedades que presenta el fruto.
- 11.2** Realizar la determinación de los aceites volátiles encontrados en el fruto a través de cromatografía de gases para determinar los constituyentes presentes.
- 11.3** Continuar con estudios fitoquímicos para el aislamiento y elucidación de los metabolitos secundarios encontrados.
- 11.4** Evaluar la especie en diferentes épocas de colecta, lugares de procedencia y disolventes de extracción para determinar si presenta variabilidad la actividad biológica y composición fitoquímica.

12. REFERENCIA

- 12.1. Guauhitemala. 1991. Guatemala, Asociación Becaria Guatemalteca. ed. Piedra Santa, v. I. pp: 24, 25.
- 12.2. Aguilar , J. M & Aguilar M. A. 1992. Árboles de la Biosfera Maya Peten. Guía para las especies del Parque Nacional Tikal Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología, Centro de Estudios Conservacionistas (CECON). pp: 161, 272.
- 12.3. Martínez, M. 1992. Las Plantas Medicinales de México. 6^a ed. Botas. pp: 61.
- 12.4. Morton, J.F. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America. Estados Unidos. Editorial Charles C. Thomas Publisher. pp: 141.
- 12.5. Roig, J.T. Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba. 2 Ed. Cuba. Editorial científico-técnica. 471. p
- 12.6. Geilpus, F. 1989. El Árbol al Servicio del Agricultor. Manual de Agroforesteria para el Desarrollo Rural; Guías de Especies. Santo Domingo. v. II. 657. p
- 12.7. Sharapin, N. 2,000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 1er. Ed. Santafé de Bogota, D.C. Colombia. pp: 195, 196.

- 12.8. Cáceres, A. 1,996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1ed. Guatemala. Editorial Universitario USAC. Reimpresión 1999. pp: 39.
- 12.9. Solís, P.N., *et al.* Manual de Caracterización de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. 1996 44 p.
- 12.10. Universidad Blas Pascal Enero 2001. Córdoba República de Argentina: Todo ambiente. Disponible <http://www.ubp.edu.ar>
- 12.11. Standley, P.C. & Steyermark, J.A. 1946. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. Chicago natural history museum. v. IV. 493. p
- 12.12. Ministerio de educación. Mayo 2003. Técnicas de Comprobación de actividad terapéutica. Disponible: <http://www.plantasmedicinales.org>
- 12.13. Collocott, T.C. Diccionario Científico y Tecnológico. Barcelona. Ediciones Omega, S.A./Casanova. Tomo I. 189. p
- 12.14. Ignacio, J.A. Diccionario de Medicina. Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra. Madrid. Espasa Calpe, S.A. 1996. 149. p
- 12.15. Jimmy W. & Larry. 2005. La Enciclopedia Libre Wikipedia. <http://www.es.wikipedia.org>

- 12.16. Aragón U.R. 1990. Estudio de caracterización Preliminar del Ramón *Brosimum B. alicastrum Swart*), *in situ* en el Bosque muy Húmedo sub-tropical Cálido de Petén. Guatemala. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. pp: 14-16.
- 12.17. Asenjo, M. C. 1992. Estudio de Caracterización y usos de la Semilla del Árbol Ramón *Brosimum B. alicastrum Swartz*. Guatemala. 3-11 p. Tesis Licenciada en Nutrición. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Nutrición.
- 12.18. Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega. 515. p
- 12.19. Medinilla, B. 1996. Manual de Laboratorio de Farmacognosia. Guatemala: USAC. 38. p
- 12.20. Real Farmacopea Española. 2002 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801. p
- 12.21. Sharapin, N. 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 27. p
- 12.22. 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
- 12.23. CYTED. 1993. Manual de Técnicas de Investigación. Bogotá, Proyecto X-1, s/p.

- 12.24. España, S.M. *et al.* 1994 Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 5. vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia*. 65: 273-274. p
- 12.25. Mitscher, L.A. Darker S, & Gollapudi, A. 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 1025-1041. p
- 12.26. Mitscher, L.A. *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*. 35: 157-166. p
- 12.27. Brancato, F.P. & Holding, N.S. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *J. Mycol.* 848-863. p
- 12.28. Burlingame, E.M. & Reddish, G.P. 1973. Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *J. Lab. Clin. Med.* 649-653. p
- 12.29. Mac Rae, W.D. *et al.* 1998. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 143-172. p
- 12.30. MacCarthy, P. *et al.* 1992. Antifungal activity of meridine. A natural product from the marine sponge. *J. Nat. Prod.* 1644-1668. p
- 12.31. Vanbrenseghem, R. De Vroey, C. & Takashio, M. 1970. Production of macroconidia by *Microsporium ferrugineum* OTA 1922. *Sabouraudia*. 252-56. p

- 12.32. Brancato, F.P. & Holding, N.S. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *J. Mycol.* 848-863. p
- 12.33. Burlingame, E.M. & Reddish, G.P. 1973. Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *J. Lab. Clin. Med.* 649-653. p
- 12.34. Anderson, J.E. Gotees, C.M. & Mc Laughlin, J.L. 1991. Ablind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis.* 107-111. p
- 12.35. Jaki, B. *et al.* 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity, *Pharmaceutical Biol.* 138-143. p
- 12.36. Meyer, B.N. Ferrigni, N.R. & Putnam JI. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica.* 31-34. p
- 12.37. Michael, A. Thompson C.G. & Abramovitz, M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science.* 464. p
- 12.38. Solis, P.N. *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Médica.* 250-252 p.
- 12.39. Wah Sam, T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In. Colígate FM & Molineux RJ. *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination.* Boca Raton, CRC Press. 441-456. p

13. ANEXOS

13.1. Cálculos para determinar el porcentaje de rendimiento de los extractos

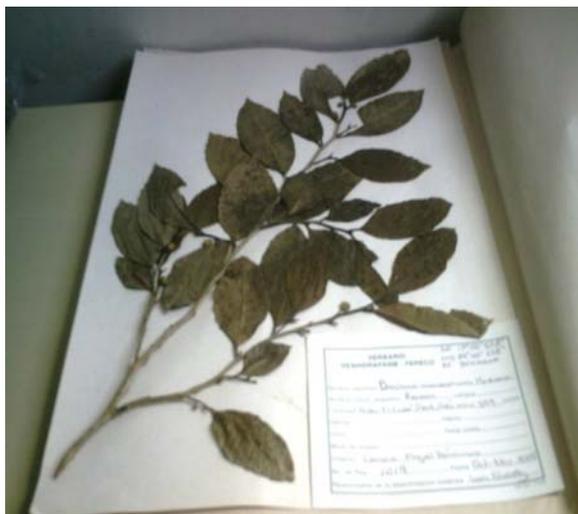
$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{g de extracto}}{\text{g de muestra}} * 100$$

13.2 Fotografías.

Fotografía No. 1. Árbol de ramón *B. alicastrum*.



Fotografía No. 2. Herborización de ramón *B. alicastrum*.



Fotografía No. 3. Dibujo de la herborización de ramón *B. alicastrum*.



Fotografía No. 4. Frutos de ramón *B. alicastrum*.



Darwin Miguel Tení Milián
Autor.

Licda. Sully Margot Cruz M.A
Asesora.

Licda. Beatriz Medinilla Aldana
Revisora.

Lic. Estuardo Serrano Vives
Director de Escuela.

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.
Decano.