

Dk
06
+(2693.)

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

**TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LAS PARTES AÉREAS (HOJAS,
TALLO, FLORES Y FRUTO) DE *Garrya corvorum*
Standl. & Steyerm. (GARRYACEAE) ESPECIE ENDÉMICA DE
GUATEMALA**

Presentado por

Carol Ivón Villatoro Castillo

Para optar al título de

Química

Guatemala, Mayo de 2008

JUNTA DIRECTIVA.

Dr. Oscar Cóbar 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.

DEDICATORIA

- A Dios; porque me das las herramientas y a las personas idóneas en el tiempo justo para poder realizar los anhelos de mi corazón. En momentos que estaba por desmayar tú fuiste quien me dio aliento para seguir adelante.
- A mis Padres; Juan Daniel y Argelia. Ustedes son el mejor regalo que Dios me ha dado en la tierra. Gracias porque los principios y valores que me dieron son resultado de lo que soy ahora; gracias por su apoyo incondicional, está es la mejor herencia que me han dejado
- A mis Hermanos; Danny, Kike y Jorge, gracias por su amor.
- A mis Tíos y Primos; por su apoyo y por sus consejos.
- A mis Catedráticos; Licenciadas Diana Pinagel, Idolly Carranza, Nohemí Orozco, gracias por darme ánimos.
- A mis compañeros de clase. Con mucho cariño.
- A mis amigos. Sirley Villafuerte, Lucky Gramajo, Walter González, Luis Roberto Santizo, Mercy Pérez, Jimmy Boror y Keren de Boror, Kennet García, Nadya Domínguez, Edgar Garcia, Elisandra Hernández Evelyn Borrayo, Roxana de Gandarias, Ana Lucrecia Aquino y Etelvina Tzep. Los llevo siempre en mi corazón.
- A mis compañeros de Trabajo. Por confiar en mí y siempre apoyarme.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de Tesis, Licda. Nohemí Orozco e Ing. Mario Véliz.

A la Escuela de Química de la Facultad de Farmacia.

A el Departamento de Química Orgánica "Sara Basterrechea de Monzón".

A el Herbario BIGU, de la Escuela de Biología.

A el Departamento de Toxicología.

A el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la Universidad San Carlos de Guatemala.

ÍNDICE

CONTENIDO

PAGINA

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción	2
III.	Antecedentes	4
	Generalidades de la especie en Estudio <i>Garrya corvorum</i>	4
	Definición de Tamizaje Fitoquímico.....	5
	Descripción de los principales Metabólitos Secundarios.....	6
IV.	Justificación	16
V.	Objetivos	17
VI.	Hipótesis	18
VII.	Materiales y Métodos.....	19
VIII.	Resultados	33
IX.	Discusión de Resultados.....	38
X.	Conclusiones.....	40
XI.	Recomendaciones	41
XII.	Referencias	42
XIII.	Anexos	45
	1. Estructuras básicas de las familias de metabólitos secundarios en estudio	45
	2. Componentes identificados en los aceites esenciales de flores	
	Y fruto por cromatografía de gases.....	50
	3. Componentes identificados en los aceites esenciales de Hojas	
	Y tallo por Cromatografía de gases.	50
	4. Cromatogramas del ensayo por cromatografía de gases	51
	5. Preparación de los reactivos en el procedimiento.....	52
	6. Fotografías de la especie en estudio <i>Garrya corvorum</i>	54
	7. Fotografías de Cromatografía en capa fina y algunos metabolitos	55
	8. Glosario.....	56

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
1. Tabla VII. No. 1. Pruebas a realizar a las diferentes familias De Metabólitos Secundarios.....	32
2. Tabla VIII. No. 1 Resultados del Tamizaje fitoquímico de hojas y tallos de la Especie <i>Garrya corvorum</i>	33
3. Tabla VIII. No. 1 Resultados del Tamizaje fitoquímico de flores y fruto de la Especie <i>Garrya corvorum</i>	35
4. Comparación de las pruebas entre el Tamizaje de hojas y tallo y flores y Fruto de la especie <i>Garrya corvorum</i>	37
5. Figura XIII. No.1 Estructuras Químicas de algunos miembros de la Familia de los Alcaloides.....	45
6. Figura XIII. No. 2 Estructura básica de los flavonoides.....	45
7. Figura XIII. No. 3 Estructura química de uno de los flavonoides más Comúnmente hallados en la naturaleza, la quercetina.	46
8. Figura XIII. No. 4. Estructura química general de la familia de lactonas Sesquiterpénicas	46
9. Figura XIII. No. 4 Estructuras básicas de varias clases de flavonoides.....	47
10. Figura XIII. No. 5. Varios ejemplos de diferentes clases de flavonoides	47
11. Tabla XIII. No. 1. Ejemplos de diferentes clases de flavonoides Naturales Y algunas de las fuentes vegetales	47
12. Figura XIII. No. 6. Varios ejemplos de diferentes clases de antocianinas Naturales	48
13. Tabla XIII. No. 2. Ejemplos de diferentes clases de antocianinas naturales y algunas de las fuentes vegetales más conocidas.....	48
14. Figura XIII. No 7. Estructura básica de la familia de las Antraquinonas	48
15. Figura XIII. No 8. Núcleos básicos de compuestos antracénicos	49
16. Figura XIII. No 9. Estructuras Químicas de algunos miembros de la familia de las Cumarinas.....	49

17.	Figura XIII. No. 10 Estructuras Químicas de algunos miembros de la familia de monoterpenos y sesquiterpenos contenidos en los Aceites esenciales.....	49
18.	Imagen X No. 1. Rama con brotes florales femeninas.....	56
19.	Imagen X No.2. Imagen tomada del espécimen de M. Veliz 6143.....	56
20.	Imagen X No. 33 rama estéril de <i>Garrya corvorum</i>	56

I. RESUMEN

La investigación realizada es un estudio exploratorio descriptivo de la caracterización de los grupos o familias de metabolitos secundarios presentes en la especie endémica local de Guatemala *Garrya corvorum* Standl. & Steyerm. (Garryaceae).

El objetivo de la investigación fue la determinación cualitativa por la técnica de tamizaje fitoquímico, de las familias principales de metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas (hojas, tallo, flores y fruto) de la especie *Garrya corvorum*. El estudio fue desarrollado en tres pasos principales; el primero consistió en la búsqueda inicial, caracterización botánica y colecta de las partes aéreas de la planta en la meseta alta de la sierra de los Cuchumatanes, el segundo paso fue el secado, molienda y cribado de la muestra por separado, es decir de las hojas y tallos por un lado y flores y fruto por otro. El tercer paso; consistió en el desarrollo de dos tamizajes fitoquímicos para la determinación cualitativa individual de la presencia o ausencia de familias de metabolitos secundarios más importantes en un estudio fitoquímico que incluyeron, el primero las hojas y tallos, y el segundo las flores y frutos. Las familias de metabolitos secundarios estudiados son: alcaloides, flavonoides y antocianinas, antraquinonas, cumarinas, cardenólicos y bufadienólicos, esteroides o triterpenoides, saponinas, principios amargos, taninos, glicósidos cianogénicos, aceites volátiles, esteroides insaturados, sesquiterpenlactonas y valepotriatos. Ambos tamizajes fitoquímicos se realizaron utilizando ensayos macro y semi-micro (reacciones de coloración o formación de precipitados para la identificación de las familias de metabolitos en general y algunas pruebas específicas para algunos metabolitos de mayor interés), cromatografía en capa fina convencional y para la identificación de aceites volátiles se utilizó la técnica de cromatografía de gases.

Los resultados obtenidos de los dos tamizajes fitoquímicos evidencian la presencia de siete de trece grupos de las familias de metabolitos secundarios estudiados que son; alcaloides, flavonoides y antocianinas, cumarinas, cardenólicos y bufadienólicos, taninos, esteroides insaturados y aceites volátiles.

II. INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen una amplia gama de recursos naturales renovables en Guatemala, lo que determina que el país se encuentre entre uno de los de mayor diversidad florística en la región Mesoamericana. Las plantas son empleadas en diversos modos: medicinal, aromático, ceremonial o industrial. El uso de plantas en medicina es una alternativa a la que los guatemaltecos han recurrido desde hace muchas generaciones por lo que el proceso de la valoración de la biodiversidad se ha enfatizado en el desarrollo de técnicas de aprovechamiento para especies cuyo producto de interés socioeconómico es el terapéutico, como reemplazantes de las respectivas partes de la planta.

Como parte de la diversidad florística de Guatemala se encuentra la especie *Garrya corvorum* Standl. & Steyerm. perteneciente a la familia Garryaceae, endémica de la región de Xemal, Sierra de los Cuchumatanes, Huehuetenango, que crece en riscos y en los bosques de Juníperos de rocas calizas de 3,300 a 3,700 metros de altura. La especie endémica en estudio fue declarada como una de las especies de la lista roja de Guatemala (en peligro de extinción). El aprovechamiento de los recursos naturales en forma sostenible se visualiza como una alternativa del desarrollo del país; una de las etapas iniciales para el aprovechamiento de una especie es la investigación fitoquímica que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y /o fraccionamiento para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

En Guatemala, no existen investigaciones fitoquímicas que informen sobre las familias de metabolitos secundarios presentes en *Garrya corvorum*. Esto hace importante la investigación porque se convierte en la primera investigación fitoquímica desde que la especie fue tipificada en Guatemala (en el año 1943). Además la especie a estudiar es una especie endémica presente en el listado de especies de flora silvestre amenazadas de extinción (Lista Roja de Flora) realizado por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) Guatemala; clasificada en el apéndice 2 (esto significa que se puede aprovechar comercialmente con un manejo controlado por el CONAP).

La investigación planteada permitió un mejor aprovechamiento de los recursos naturales con los que cuenta el país y propició una reforestación y conservación de la especie, así como la validación del conocimiento popular en el uso de plantas medicinales.

El presente trabajo contribuyó a la realización del estudio exploratorio y caracterización de los tipos de familias de metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas (hojas, tallo, flores y fruto) de la planta *Garrya corvorum*. La investigación constó de tres pasos principales; el primero

consistió en la colecta de la especie; la especie fue colectada en el periodo de octubre a noviembre en la meseta alta de la sierra de los Cuchumatanes, el segundo consistió en secar las partes colectadas de la planta 20 días y molerlas; el tercero consistió en la realización de dos tamizajes fitoquímicos (hojas y tallos y flores y frutos) para la determinación cualitativa individual de la presencia o ausencia de familias de metabolitos secundarios. Las familias de metabolitos secundarios determinados cualitativamente fueron: alcaloides, flavonoides y antocianinas, antraquinonas, cumarinas, cardenólicos y bufadienólicos, esteroides o triterpenoides, saponinas, principios amargos, taninos, glicósidos cianogénicos, aceites volátiles, esteroides insaturados, lactonas sesquiterpénicas y valepotriatos. Ambos tamizajes fitoquímicos se realizaron utilizando ensayos macro, semi-micro, cromatografías en capa fina convencionales y para la identificación de aceites volátiles, se utilizó la técnica de cromatografía de gases.

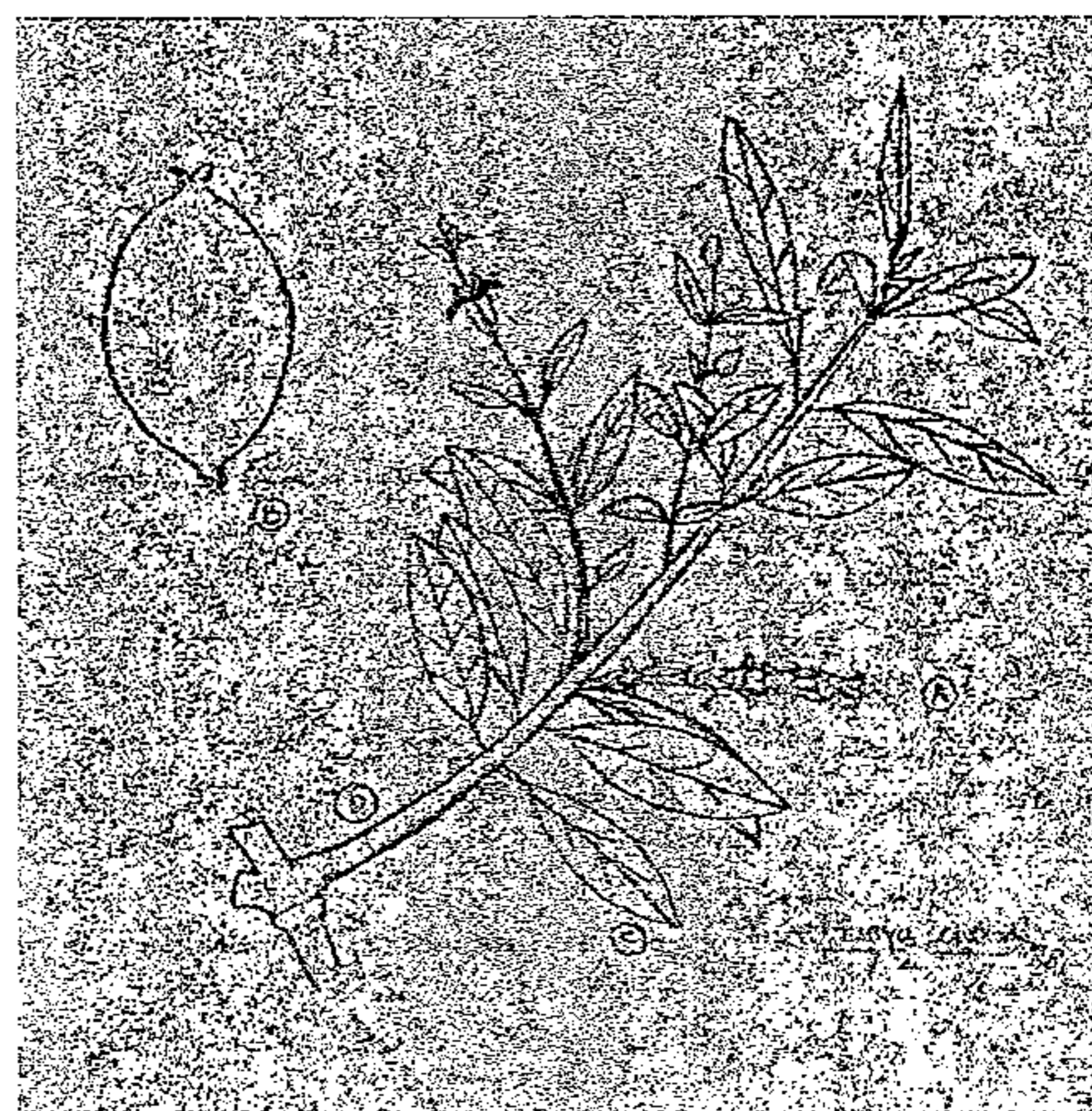
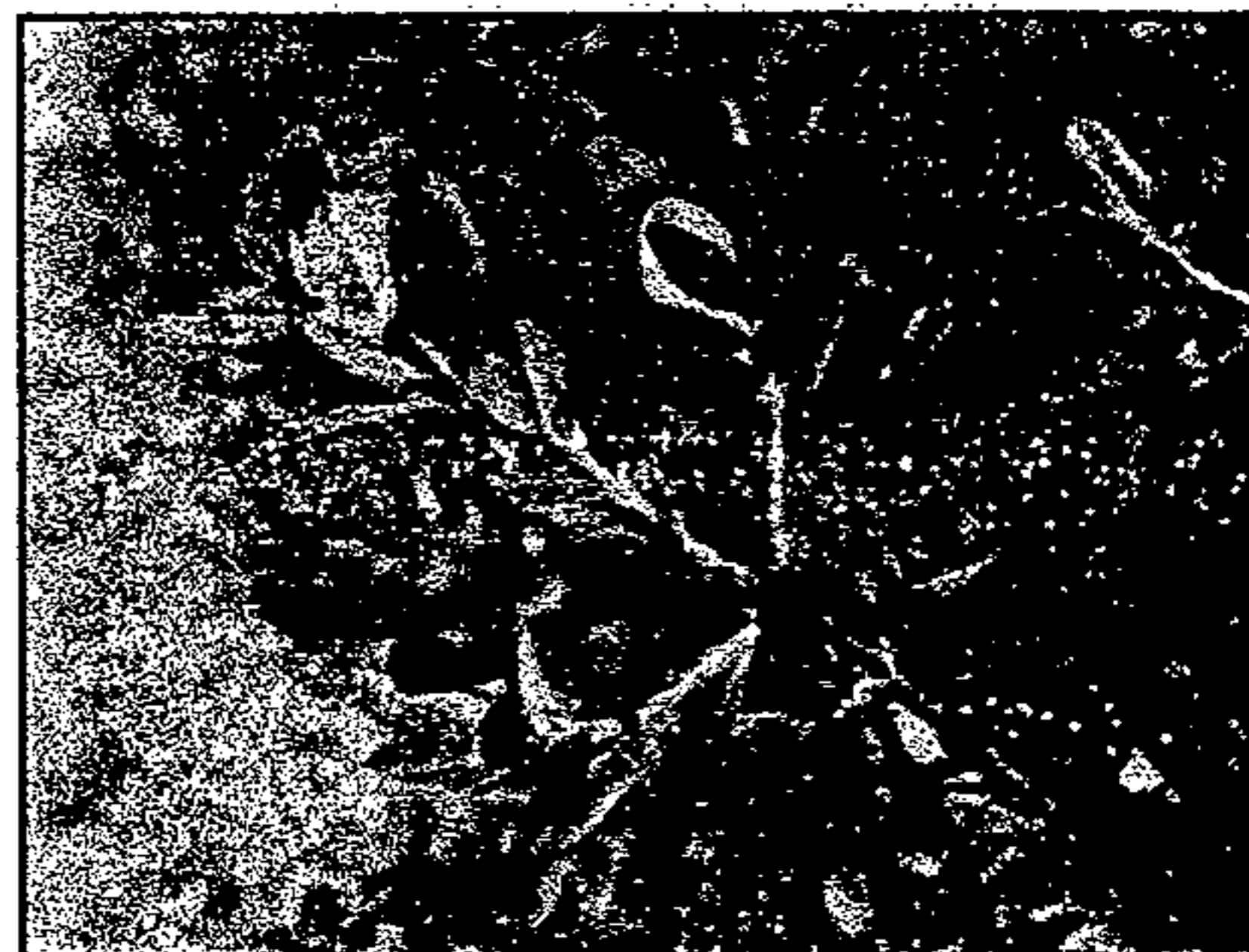
III. ANTECEDENTES

Generalidades de especie arbórea en estudio *Garrya corvorum*:

Descripción Taxonómica de *Garrya corvorum* Standl. & Steyer. (Garryaceae).

Clasificación botánica:

Reino: Plantae
 Subreino: Embriobionta
 Clasificación: Magnoliophyta
 Clase: Magnoliopsida
 Subclase: Rosidae
 Orden: Cornales
 Familia: Garryaceae
 Genero: *Garrya*
 Especie: *Garrya corvorum*
 Standl. & Steyer.



Nombre común: Esta especie es conocida en su lugar de origen (Sierra de los Cuchumatanes) como Ovinato (13).

Distribución Geográfica: la especie es endémica de la región y crece de 3300 a 3700 metros de altura en la región de Xemal, Sierra de los Cuchumatanes, Huehuetenango, Guatemala. (13).

Descripción botánica general de la familia Garryaceae.(13): "Son arbustos o árboles, los jóvenes tienen ramas semi cuadrangulares, la rama de los mayores son cilíndricas; todos poseen hojas, pétalos, son rectos u ondulados, resistentes, coráceos, con pétalos congénitos en la base, no poseen secuencia de la zona más baja de una hoja joven, flores pequeñas, dioicas, estambres no sésiles, pistilos sésiles o casi sésiles, arreglados como racimos, axilares principalmente, bracteadas de adelante, a menudo congénitos en la

base, las flores separadas o en racimos de tres flores; 4 sépalos, en la flor posee estambres, pétalos sin traslape, a veces colocados de forma continua en el ápice, estambres 4, filamentos no unidos, las anteras unidas de la base, alargadas- elíptico o lineal, hacia el interior, abertura espontánea en la madurez por grietas longitudinales; ningún sépalo en el pistilo, ovario en forma de huevo u oblongo, 1-célula, inferior, los 2 estilos definidos, recto o recurvo, con pequeñas proyecciones; 2 óvulos, suspendido del ápice de la célula, anátropo; fruta abundante, en forma de huevo (ovoide) o sub esférico, inclinado y con 2-4 pequeños lóbulos de cáliz en la base, 1-2 siembras, el endospermo carnoso, abundante; minuto de embrión, los cotiledones oblongos, radícula cilíndrica”.

Descripción botánica de la Especie *Garrya corvorum*: “Arbusto o árbol pequeño de 2 a 15 metros de porte, ramas negruzcas, lustrosas; hojas coriáceas, oblongo o elíptico-oblongo, de 2.5 a 4.5 centímetros de largo, de 1 a 1.5 centímetros de ancho, obtusas o subagudas en el ápice y apiculada, obtusa o angostamente redondeada en la base, lustrosa y también grabras arriba, la venación impresa, densamente pilosa abajo, en subadpresos, pelos largos, blanquecinos, los nervios laterales incospicuas, las venas obsoletas; amentos estaminados de 3 a 3.5 centímetros de largo, cortamente pedunculados, simples, terminales, solitarios, densamente pilosos con largos pelos blanquecinos, las brácteas muy anchamente ovaladas, connados abajo, de 8 milímetros de largo o menos, cuspidado-agudas”.(13)

Estudios realizados de Plantas nativas de Guatemala: En Guatemala, se han realizado estudios sobre diversidad de plantas, que investigan acciones farmacológicas y terapéuticas; sin embargo, existen escasas investigaciones de estudios fitoquímicos que informen sobre la presencia de metabolitos secundarios en las plantas. Un estudio amplio por F. Ronquillo (1992) y colaboradores describe un total de 69 especies vegetales de uso medicinal en Guatemala, de estas plantas se reporta su contenido de macro nutrientes y algunas vitaminas. (31) Sin embargo el estudio no indica si las plantas fueron analizadas por los investigadores, ni reporta la fuente de información, ni la metodología de cuantificación. En el estudio realizado no se encuentra el reporte de ningún miembro de la familia garryaceae y por lo tanto tampoco la especie *Garrya corvorum*. Otros estudios de plantas nativas del país, se han limitado al análisis del contenido de macro nutrientes y minerales. (5)

Definición de Tamizaje Fitoquímico:

- 1) **Tamizaje fitoquímico:** Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/ o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la

extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y análisis por cromatografía en capa fina. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.(18).

Descripción de los Principales Metabolitos Secundarios:

1. **Definición de metabolitos Secundarios:** Es una sustancia que es producida por rutas metabólicas secundarias del vegetal, normalmente se considera que no son esenciales para el funcionamiento de la célula vegetal. (10,12,18). Frecuentemente los metabolitos secundarios son responsables de efectos específicos que un vegetal ejerce sobre otros organismos, por lo que con frecuencia el termino principio activo se utiliza como sinónimo de metabolito secundario. En todas las especies están presentes al mismo tiempo principios activos y sustancias indiferentes que son llamadas "lastre" que determinan la eficiencia del medicamento vegetal en cuestión de acelerar o hacer más lenta la absorción de los primeros en el organismo. (3) Los metabolitos secundarios no se distribuyen de una manera uniforme en la planta, sino en estructuras específicas como en flores, hojas, raíces, fruto o en la corteza. (3,5,25).

2. **Metabolitos secundarios más comunes en las plantas:**

Alcaloides: Son sustancias básicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno usualmente forman parte de un sistema heterocíclico (Anexo Figura X No.1), siendo su clasificación amplia y variada. Se encuentran en las plantas casi siempre en forma de sales, combinados con los ácidos más simples de los vegetales.

Usos y propiedades más comunes de los alcaloides: "Aproximadamente 30 de los alcaloides conocidos se usan en medicina. Por ejemplo, la atropina, que se obtiene de la belladona, dilata las pupilas; la morfina es un calmante; la quinina es un remedio específico para la malaria; la nicotina es un insecticida potente y la reserpina un tranquilizador. Estos compuestos constituyen, con los heteróxidos y los antibióticos, la mayor parte de los principios activos de las plantas medicinales. Son sustancias de origen biológico y sobre todo de origen vegetal, ya que en el reino animal se encuentran raramente representadas". (2,21)

Flavonoides: Sustancias que contienen una misma composición química base, todos contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico denominado flavona, y están ordenados bajo un sistema $C_6C_3C_6$ (Anexo Figura X. No. 2). Entre sus funciones fisiológicas se encuentran la inhibición de sistemas enzimáticos y contribuyen a la polinización. Muchas veces los flavonoides son la respuesta adaptativa de las plantas a la intensa radiación ultravioleta. Estos componentes protegen a las plantas de los

nocivos efectos de estos rayos solares. Otras veces estos componentes presentan unos sabores desagradables por lo que constituirían una ventaja sobre los animales herbívoros que rechazarían estos alimentos. Algunos dan el color amarillo y el nombre general a estos principios es *flavus*, en latín significa amarillo. De este nombre deriva la palabra flavonoide. Otros son los que proporcionan la coloración rojiza de las yemas, de los rebrotes o de las hojas en otoño, también son los responsables de los colores de muchos frutos. Muchas variedades de color en las flores dependen de la acidez del medio; un medio ácido proporciona coloraciones rojas fuertes, un medio alcalino dará la coloración azul y un medio neutro, proporcionará el violeta. Estas variaciones explican porqué una misma planta, como la hortensia, varía de color según donde esté plantada. Se han descubierto más de 600 flavonoides; todos ellos parecen tener un papel muy importante en la alimentación humana.(27)

Usos y propiedades más comunes de los flavonoides: Entre estas propiedades podríamos mencionar:

Antioxidantes la mayoría de ellos, y especialmente las catequinas del té verde, tienen una alta capacidad para neutralizar los radicales libres e impedir los perniciosos efectos que estos ejercen en la salud de nuestro organismo. Usados como complementos en combinación muchas veces con la vitamina C pueden ser capaces de neutralizar ciertos virus como los del herpes.

Anticancerosas muchos flavonoides se han mostrado tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas.

Cardiotónicas tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina.

Fragilidad capilar; mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que estos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado.

Antitrombóticas la capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares. Disminución de la concentración de colesterol; su capacidad para disminuir el colesterol y los triglicéridos supone una ventaja en la salud del aparato circulatorio. Protección del hígado; algunos flavonoides han demostrado su poder protector contra las enfermedades del hígado.

Protección del estómago ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kamferol, tienen propiedades de inhibir la formación de úlceras al proteger la mucosa gástrica.

Antiinflamatorias y analgésicas la hesperidina y otros flavonoides, por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se han utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. (27)

Antocianinas: Son flavonoides que se encuentran en algunos frutos que van del color rojo al azul como los arándanos, las cerezas, las ciruelas o las uvas (anexo No. 2). Su labor fundamental es la protección de los capilares de la retina, desempeñando un papel fundamental en la conservación de la buena vista.

Usos y propiedades más comunes de las antocianinas: Poseen propiedades antivirales, hemostáticas, por lo que pueden desempeñar un papel positivo en las infecciones y en la detención del sangrado. Protegen el corazón de las enfermedades cardiovasculares y tienen, como el resto de flavonoides, un valor antioxidante.(18)

Antraquinonas: Constituyen el grupo más grande de sustancias de tipo quinona presentes en la naturaleza, suelen ser compuestos de color rojo-anaranjado. Las quinonas son muy abundantes en la naturaleza, en el reino vegetal se encuentran tanto en vegetales superiores como en hongos y bacterias. Dependiendo del grado de complejidad de su estructura química pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas (Anexo Figura X. No. 7 y 8) El grupo de las benzoquinonas tiene escaso interés desde el punto de vista de la fitoterapia, aunque sí es necesario conocer su importante poder alergizante. Muchas benzoquinonas y algunas naftoquinonas se comportan como haptenos, que al combinarse con los grupos amino o tiol de las macromoléculas pueden inducir dermatitis por sensibilización. Las naftoquinonas, localizadas preferentemente en vegetales superiores, se encuentran en las plantas frescas en forma heterosídica, liberándose la genina durante el proceso de desecación.

Usos y propiedades más comunes de las antraquinonas: Pueden presentar actividades farmacológicas de aplicación a la terapéutica, como es el caso de la plumbagina de la drosera, que parece ser eficaz en el tratamiento de la tos, o la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) de las hojas y fruto del nogal (Juglandaceae) que presenta actividad antibacteriana y fungicida. También algunas naftoquinonas pueden ser empleadas en cosmética como colorantes naturales, como ocurre con la juglona también con actividad fungicida, presente en las hojas de alheña o henna (*Lawsonia inermis* L. Lythraceae) que además de ser un importante fungicida se fija a los grupos tiólicos de la queratina capilar proporcionándoles un color rojo-anaranjado. Las antraquinonas son, pues, quinonas tricíclicas derivadas del antraceno y constituyen el grupo más interesante de quinonas. Pueden llevar funciones hidroxílicas en su estructura en diversas posiciones: si poseen dos grupos hidroxilo (OH^-) en las posiciones 1 y 2, tienen propiedades colorantes; si éstos se encuentran en las posiciones 1 y 8, el efecto es laxante. Las antraquinonas con propiedades laxantes estimulantes deben llevar en su estructura además de los dos grupos hidroxilo (OH^-), un radical en el carbono de posición 3 y

pueden tener o no, sobre el carbono de posición 6, un radical hidroxilo y metoxi. Generalmente en los vegetales se encuentran en forma heterosídica, es decir, unidas a azúcares, mayoritariamente a la glucosa, en ocasiones ramnosa y solo ocasionalmente algún azúcar diferente, en unión O-heterosídica (por los hidroxilo de las posiciones 1 y 8, a veces 6). Aparecen también C-heterósidos, es decir, uniones directas carbono-carbono (C-10), o más de un azúcar sobre la misma molécula en diversas posiciones (a la vez O- y C-heterósido).(1,7)

Cumarinas: Son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas. Se caracterizan por el sistema benzo alfa pirona y su carácter lactónico hace que sean solubilizadas por disoluciones alcalinas con la aparición de un color amarillo y comprenden otra clase de compuestos C_6C_3 (Anexo Figura X. No. 9).

Usos y propiedades más comunes de las cumarinas: Estudios han relacionado el comportamiento animal y la concentración de antioxidantes endógenos con el envejecimiento biológico, como consecuencia del tratamiento farmacológico con cumarinas. Se ha revisado el estado actual de los conocimientos sobre: teorías de envejecimiento, radicales libres y peroxidación tisular, antioxidantes, y cumarinas como potenciales agentes antioxidantes. La cumarina, y las plantas que la poseen son aromáticas. El dicumarol es un anticoagulante preparado ahora por síntesis y empleado en terapéutica. Su presencia en *Melilotus officinalis* puede provocar un síndrome hemorrágico en el ganado. El esculetol combinado bajo forma glucosídica (esculósido), tiene propiedades vitamínicas P (aumenta la resistencia y disminuye la permeabilidad de los capilares sanguíneos); es un tónico venoso. Las furocumarinas, son ictiotóxicas. Algunas como los psolarenos, la xantotoxina o la bergaptina, tienen propiedades fotosensibilizantes y son responsables de fenómenos de alergia o de dermatosis en personas que manipulan las plantas en las que se encuentran. Las pirano cumarinas son antiespasmódicas. Sirven para la caracterización de diversas plantas. (11)

Taninos: Se refieren a un grupo de sustancias químicas de origen vegetal que poseen en común un anillo aromático, no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol, acetona, poco solubles en alcohol deshidratado, de sabor astringente, y teniendo la propiedad común de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable al fijarse sobre sus proteínas. Entre los tipos más comunes de taninos se encuentran:

Taninos Hidrolizables: Son ésteres de ácidos fenólicos y de monosacaridos sencillos. Antiguamente se les llamaba taninospirogálicos, por que procedían del pirogalol por destilación seca.

Galotaninos: Son ésteres del ácido gálico y del ácido digálico con dos monosacáridos sencillos: generalmente la glucosa, a veces la hamamelosa (derivada de la ribosa. A

este grupo pertenece el tanino de la Nuez de Agalla, la glucogalina del Ruibarbo, el hammamelitanino de las hojas de hammamelis, los taninos de los Arces entre otros.

Elago-Taninos: Se sabe que ciertas materias taninas, producen un depósito insoluble, aunque el tanino constituido por el ácido gálico, sería una de los oligosacaridos de los vegetales vivientes. A este grupo, pertenecen el litraritanino de la Salicaria, los taninos de los frutos de las Combretáceas exóticas del género Terminalia.

Taninos Condensados: Son taninos condensados no hidrolizables o taninos "catéquicos". Estas sustancias no son hidrolizadas por los ácidos ni por la tanasa, los ácidos fuertes con calor o los agentes de oxidación, los convierten en sustancias rojas u oscuras, las flobafenas, insolubles en la mayor parte de los solventes. Derivan de los catecoles por condensación de las moléculas, y están siempre acompañados de catecoles en las plantas frescas. A este grupo pertenecen los taninos de las plantas: Cachú, fresno, eucaliptus, cola, quinina, ratania, etc. En estas plantas, la proporción de flobafenos, aumenta en el curso de la conservación.

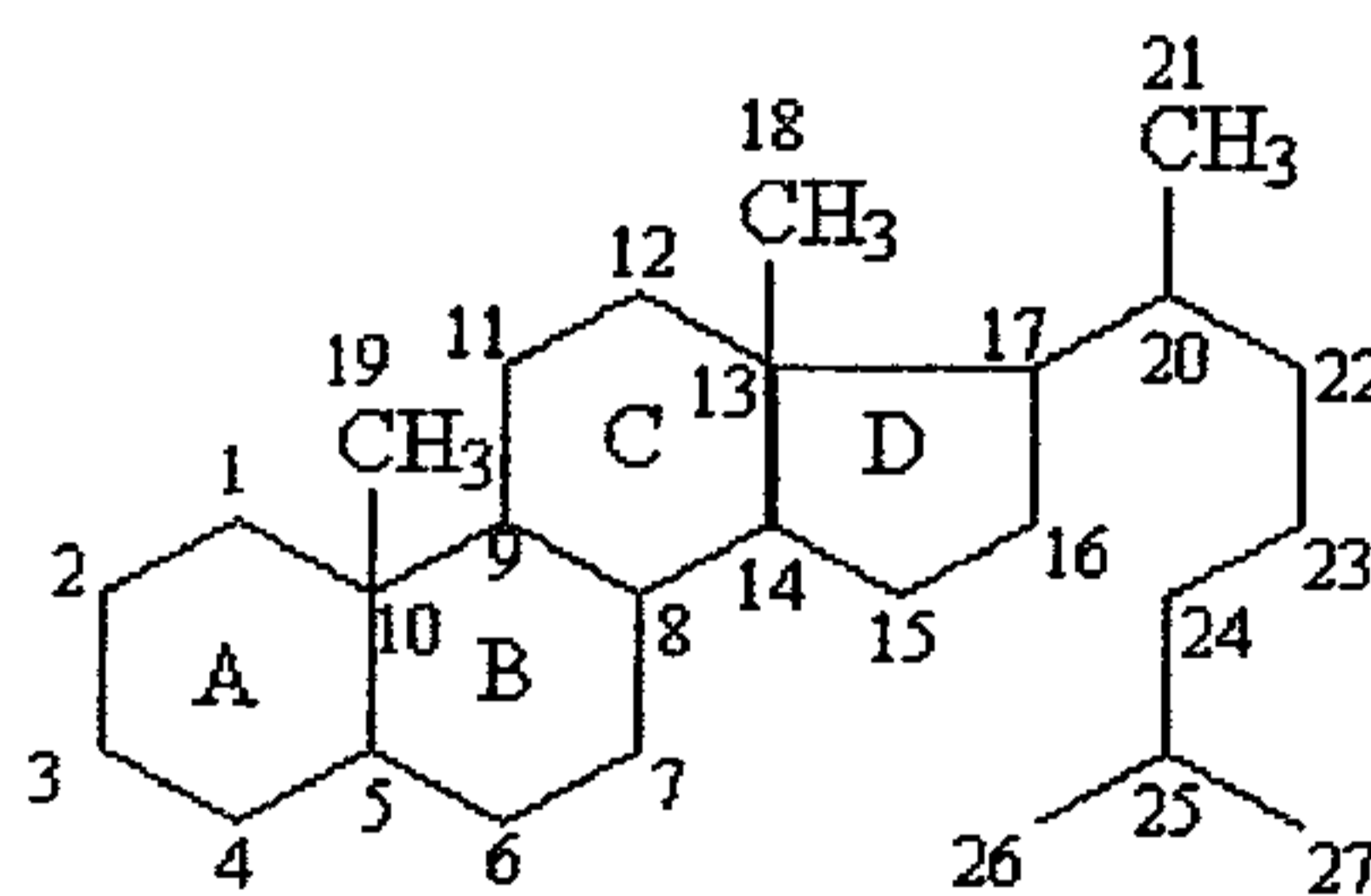
Taninos Diversos: cafe-taninos: El ácido clorigénico y sus derivados, presentes de manera notable en los granos del café, en la nuez vómica, en las hojas de Solanáceas (tabaco), del té, del maté, y constituido por la unión, bajo la forma de depsida, de una molécula de ácido caféico y de una molécula de ácido quínico. Posee numerosos isómeros sin las propiedades de los taninos. (6)

Aceites Volátiles: Estos productos, llamados comúnmente esencias, son sustancias olorosas volátiles contenidas en los vegetales. Su volatilidad las diferencia de los aceites fijos que provienen de los lípidos. Son particularmente abundantes en las Coníferas, Rutáceas, Umbelíferas, Mirtáceas y Labiadas. Se encuentran sobre todo en las sumidades (ápices) florales (Lavanda, Menta, Melisa), pero también en las raíces o rizomas (Cúrcuma, Jengibre) en las cortezas (Canelas), en la leña (Sasafrás), en los frutos (pimientos, limones) en las semillas (nuez moscada). En climas calurosos el contenido de aceite esencial de las plantas es mayor. Bajo el nombre de esencias, se designa también a los productos olorosos no formados por el vegetal, pero provenientes de la hidrólisis enzimática de los heterósidos (Anexo Figura X. No. 10). Se obtienen generalmente por destilación y extracción por vapor de agua en un destilador, o por expresión de los frutos en los cítricos, o por solventes volátiles o por el método "enfleurage" en el que los órganos frágiles son puestos en contacto con un cuerpo graso que se impregna de la esencia. (4)

Usos y propiedades más comunes de los aceites volátiles: Las plantas con aceites esenciales y en particular las especies, son conocidas desde la antigüedad; algunas originarias de Extremo Oriente, han jugado un importante papel histórico. Las pimientos,

el jengibre, la nuez moscada, las canelas, siempre han tenido un gran valor en el mercado por su empleo en la alimentación y en la licorería, ejerciendo un efecto estimulante sobre el apetito y las digestiones. Entre las plantas con esencias, se encuentran antisépticos empleados en las enfermedades de vías respiratorias (eucaliptus, niaouli) ó urinarias (buchú, sándalo); eupépticas y carminativas; estimulantes del Sistema Nervioso Central, pudiendo ser convulsivantes a altas dosis (anís); estomáquicas (*Menta, Melisa, Verbena*); antiespasmódicas (camomila); coleréticas (romero, sauce); vermífugas (chenopodium, tomillo). Algunas esencias a bajas dosis son emenagogas y abortivas a altas dosis, como ocurre en la tuya, la absenta, la sabina. Muchas esencias son insecticidas. Algunas son rubefacientes y revulsivas en uso externo con la esencia de trementina, otras son antisépticas y cicatrizantes como la esencia de lavanda; otras son estimulantes del cuero cabelludo como la de romero, o antiinflamatorias como la de matricaria que debe esta propiedad a los azulenos. La esencia de clavo es anestésica y desinfecta la pulpa dentaria. (4)

Esteroles Insaturados: Son los más abundantes. Estructuralmente se consideran derivados del colestano (de 27 carbonos). Se caracterizan por tener (1) un grupo hidroxilo en posición β (por encima del plano del papel) en el C3, lo que les da cierto carácter anfipático y (2) una cadena lateral de 8 átomos de carbono en el C17. (20)



colestano

Se presentan habitualmente en la membrana plasmática de todos los seres vivos (excepto las eubacterias), donde su función es la de regular la fluidez de la bicapa lipídica.

El colesterol está ampliamente distribuido entre los animales, y es un componente habitual de la membrana plasmática, donde contribuye a regular su fluidez. Con mucha frecuencia aparece esterificado a ácidos grasos, y es la forma en que normalmente se almacena o se transporta por la sangre. El colesterol es el precursor metabólico de otros esteroides como los calciferoles, las hormonas esteroideas y los ácidos biliares. Una vez

sintetizado, el organismo animal es incapaz de romper el sistema de anillos, de modo que es excretado como tal. Por este motivo, al ser poco soluble, el colesterol tiende a precipitar en el endotelio de los vasos sanguíneos, formando las placas de ateroma que dan lugar a la arterioesclerosis, una de las causas de mortalidad más frecuentes en los países desarrollados. Los esteroides más abundantes en las plantas superiores son el sitosterol y el estigmasterol, mientras que en levaduras y otros microorganismos eucariotas se encuentra el ergosterol. (20)

Usos y propiedades mas comunes de los esteroides insaturados: Los calciferoles (vitaminas D) son esteroides implicados en la absorción de calcio por parte del intestino de los animales superiores. Su deficiencia provoca el raquitismo, una enfermedad en la cual el calcio ingerido en la dieta no es absorbido por el intestino, lo que provoca que los huesos liberen calcio al plasma sanguíneo, alterando el proceso normal de osificación. La forma activa de esta hormona es el 1, 25- dihidroxicolecalciferol. Son muy abundantes en el aceite de hígado de bacalao.(4)

3. Fundamento Químico de las reacciones de los metabolitos secundarios:

a) Reacciones de Alcaloides: La mayoría de los alcaloides precipitan en sus disoluciones neutras o ligeramente ácidas mediante el reactivo de Mayer (disolución de yoduro potásico-mercúrico); con el reactivo de Wagner (disolución de yodo en yoduro potásico); con disolución de ácido tánico; por el reactivo de Hager (disolución saturada de ácido pícrico); el reactivo de Dragendorff (disolución de yoduro potásico-bismútico). Estos precipitados pueden ser amorfos o cristalinos y son de color variado: crema (Mayer), amarillo (Hager), castaño-rojizo (Wagner y Dragendorff). La cafeína y algunos otros alcaloides no dan estos precipitados. Debe ponerse cuidado en la realización de estos ensayos de alcaloides, puesto que los reactivos dan también precipitados con las proteínas. Durante la extracción de los alcaloides a partir de la planta y subsiguiente evaporación, unas proteínas no serán extraídas y otras se insolubilizarán (desnaturalización) por el proceso de evaporación, pudiendo separarse por filtración. Si el extracto original se ha concentrado a pequeño volumen y los alcaloides se extraen, a partir de una disolución alcalina, por medio de un disolvente orgánico, pasando después a una disolución diluida (tartárica, por ejemplo), la disolución final estará desproteinizada y será adecuada para el ensayo de los alcaloides.

Las reacciones coloreadas son muchas veces útiles: por ejemplo el color amarillo que da la colchicina con ácidos minerales o el color violeta-azulado a rojo, producido por los alcaloides indólicos cuando se tratan con ácidos sulfúrico y p-dimetilaminobenzaldehído.

Estas reacciones se fundamentan en la propiedad que tienen los alcaloides de combinarse con los metales pesados bismuto, mercurio o con el yodo. Todos los alcaloides precipitan con sales de platino, tricloruro de oro, ácido pícrico, taninos. (17)

b) Reacciones de Flavonoides: Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado. (28)

Extracción. Tiene que ir combinada con estabilización. Se hace con etanol al 96% p/v, para que teniendo en cuenta el agua de la droga quede en una concentración del 85% p/v en la que las enzimas coagulan y no actúan. Después se sigue extrayendo con etanol al 85% p/v, hasta que no se observe color. Para evitar la hidrólisis por ácidos de la planta se añade carbonato cálcico. (28)

Purificación. Para eliminar otras sustancias extraídas como pigmentos y grasas. Se evapora el extracto a sequedad y se extraen los pigmentos con éter de petróleo. Los extractos pueden llevar también polímeros de proteínas o hidratos de carbono, que se pueden eliminar por: precipitación añadiendo sulfato de amonio, precipitación con alcohol de alta concentración, filtración por columnas de Sephadex que primero elimina los polímeros y después los monómeros. (28)

Separación. Puede hacerse utilizando una extracción con butanol que prácticamente extrae todos los flavonoides. La precipitación con acetato de plomo, con el que los flavonoides forman complejos y precipitan cuando poseen 2 hidroxilos en posición orto. La adsorción en carbón activado, a partir de extracciones acuosas de flavonoides retiene componentes aromáticos; para desorberlas se usa agua saturada de fenol, que desplaza a los flavonoides del carbón activado. También se pueden realizar adsorciones sobre poliamidas y adsorción sobre PVP, que logrará la separación de los componentes de interés donde después se recurre a la cromatografía en columna para separar los flavonoides individualmente. (28)

Caracterización e identificación. Para la identificación de flavonoides se utilizan reacciones de coloración; como las que utilizan tricloruro de hierro, tricloruro de azufre y tricloruro de aluminio; estas reacciones presentan absorbancia en el espectro ultravioleta

por lo que pueden ser identificadas mediante la técnica de espectrofotometría UV-visible. Además existen reacciones de color específicas para determinar el tipo de flavonoide al que pertenece y reacciones de color para comprobar la existencia de sustituyentes en la posición orto. (28)

Valoración. Se realiza por colorimetría con diferentes reactivos como Mg/HCl y Tricloruro de aluminio. Generalmente se presentan varios problemas en este paso debido a que los flavonoides presentan una gran variación estructural y esto hace que en colorimetría se genere una gran cantidad de colores propios de cada flavonoide. (28)

c) Reacciones de Antocianinas: El color a un pH determinado es función de los sustituyentes. Al aumentar el número de hidróxilos en el anillo β se intensifica el color azul mientras que la presencia de grupos metoxilo (OCH_3) genera el color rojo. Son muy reactivas, el ion flavilio es deficiente en electrones y reacciona rápidamente. Generalmente son reacciones de decoloración no deseadas El color de las antocianinas es función del pH además de su estructura. Algunas de ellas a pH ácido son de color rojo, a pH básico de color azul y a pH neutro son incoloras. Las antocianinas también pueden reaccionar con el ácido ascórbico natural o añadidos provocándose la degradación de ambos compuestos. (28)

Con aminoácidos, azúcares, o fenoles las antocianinas reaccionan por condensación y dan lugar a compuestos muchos más complejos que pueden tener otro tipo de coloración. Algunos piensan que estos compuestos contribuyen al color de los vinos. El color de las antociancinas también se ve afectado por la acción de enzimas como glucosidasas que rompen enlaces entre el ión flavilio y el azúcar. Otras reacciones muy frecuentes son las producidas cuando las antocianinas tienen grupos hidróxilo vecinales. Se produce con metales que pueden aparecer en las latas de conserva (estaño). (28)

Reacciones de Cumarinas:

Propiedades:

- a) Las cumarinas son sólidos cristalizables, blancos o amarillentos, algunos son sublimables.
- b) Las hidroxycumarinas sencillas son solubles en etanol, acetato de etilo y agua b) Las pirano y furanocumarinas son solubles en agua en etanol, pero también en disolventes orgánicos apolares: éter de petróleo.
- c) Las hidroxycumarinas sencillas presentan al ultravioleta fluorescencia azul o verde.

d) Lo más típico es el anillo de lactona, que se puede aprovechar para la identificación pero también para la extracción. (17)

Detección de Cumarinas por su anillo de Lactona. El clorhidrato de hidroxilamina en presencia de tricloruro de hierro es bastante específico para lactonas, pero poco sensible. Las cumarinas sublimables se pueden detectar poniendo la droga en agua en un tubo de ensayo, se tapa con papel filtro impregnado con NaOH, se calienta el tubo y después se observa el papel filtro al ultravioleta, tiene que observarse una fluorescencia, donde la sosa juega el papel de aumentar la intensidad de la fluorescencia. (17)

Extracción: A partir de las plantas desecadas, como hay variación de estructura y solubilidad, es mejor hacer extracción con distintos disolventes, empezando por los menos polares y aumentando progresivamente: Éter de petróleo, cloroformo, éter, acetato de etilo, metanol y agua. (17)

Purificación: Se usan distintas columnas cromatográficas con distintos adsorbentes y una vez aislados se hace la caracterización por espectroscopía. Para las hidroxycumarinas, extraemos con álcali diluido y caliente, se abre el anillo de lactona y se forman las sales correspondientes del ácido hidroxicinámico, para lavar las impurezas el álcali diluido se extrae con éter, acidificamos y la cumarina vuelve a formarse. Se extrae con éter la cumarina pero es frecuente que existan otros ácidos fenólicos junto a la cumarina. Para eliminarlos, se extrae con bicarbonato de sodio, ahí pasarán los ácidos y en el éter quedarán las cumarinas puras. (17)

Ensayos: Normalmente la extracción se hace con metanol caliente y se lleva el extracto a cromatografía. Se pueden usar reacciones de color: a) clorhidrato de hidroxilamina más tricloruro de hierro b) Ester amino etílico del ácido difenilbórico. (17)

e) Reacciones de Taninos: Se reconocen con las reacciones con tricloruro de hierro y ácido fosfowolfrámico, el reconocimiento se realiza mediante reacciones de color y pulverizando por cromatografía. (28)

IV. JUSTIFICACIÓN

Las plantas constituyen una amplia gama de recursos naturales renovables en Guatemala, que actualmente están amenazadas por la fragmentación del paisaje y por la tendencia a consumirlas entre otros factores; como parte de estos recursos se encuentra la especie *Garrya corvorum* perteneciente a la familia Garryaceae. En la actualidad el aprovechamiento de estos recursos naturales en forma sostenible se ha visualizado como una alternativa del desarrollo del país. Uno de los aprovechamientos de este recurso consiste en la realización de un conjunto de pruebas químicas preliminares sencillas llamadas tamizaje fitoquímico, que se realizan con el objeto de detectar familias de compuestos presentes en esta planta que ejercen una acción terapéutica y que pueden ser obtenidas para la elaboración de productos farmacéuticos. Y por lo tanto tienen ventaja sobre los fármacos sintéticos ya que son de origen natural

En Guatemala, (según las revistas y libros más importantes de Flora de Guatemala) no existen investigaciones fitoquímicas que informen sobre las familias de metabolitos secundarios presentes en *Garrya corvorum*. Esto hace importante la investigación porque se convierte en la primera investigación fitoquímica desde que la especie fue descrita en Guatemala en el año 1943. Además, la especie a estudiar es una especie endémica local presente en el listado de especies de flora silvestre amenazadas de extinción (Lista Roja de Flora) realizado por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP), Guatemala; clasificada en el apéndice 2 (eso significa que se puede aprovechar comercialmente con un manejo controlado por el CONAP).

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General:

Determinar cualitativamente las familias de metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de la planta *Garrya corvorum* Standl. & Steyerm. (Garryaceae) utilizando la técnica de tamizaje fitoquímico

B. Objetivos Específicos:

- B.1. Determinar cualitativamente por la técnica de tamizaje fitoquímico; las familias de metabolitos secundarios mas importantes presentes en tallos y hojas de la planta *Garrya corvorum*.
- B.2. Determinar cualitativamente por la técnica de tamizaje fitoquímico; las familias de metabolitos secundarios mas importantes presentes en flores y frutos de la planta *Garrya corvorum*.
- B.3. Generar información química y farmacológica de la planta *Garrya corvorum* que sirvan como instrumento de referencia para futuros estudios.

VI. HIPÓTESIS

Por ser un estudio exploratorio descriptivo no se plantea ninguna hipótesis sobre la distribución de las variables, que en este caso serán las familias de metabolitos secundarios determinados en la especie estudiada.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de Trabajo

1. Población:

Especie vegetal *Garrya corvorum* (hojas tallos, flores y frutos); especie endémica de la región de Xemal, Sierra de los Cuchumatanes, Huehuetenango.

2. Muestra:

200 g hojas y tallos de *Garrya corvorum* y 200 g flores y frutos de *Garrya corvorum*. La especie debe ser colectada en el periodo de octubre a noviembre, en la meseta alta de la sierra de los Cuchumatanes, durante el transcurso del día.

B. Materiales

1. Recursos Humanos

- Tesista: Carol Ivón Villatoro Castillo
- Asesores: Licenciada en Química Nohemí Orozco M.A.
Ingeniero Agrónomo Mario Esteban Véliz Pérez

2. Recursos Materiales

a) Reactivos:

REACTIVO	CALIDAD
Tricloruro férrico	Grado reactivo
Solución de ácido bórico en anhídrido acético	Grado reactivo
Hidróxido de potasio	Grado reactivo
Hidróxido de potasio alcohólico	Grado reactivo
Peroxido de Hidrógeno	Grado reactivo
Hidróxido de amonio	Grado reactivo
Reactivo de Kedde	Grado reactivo
Reactivo de Keller-Killian	Grado reactivo
Anhídrido acético en ácido sulfúrico	Grado reactivo
Tricloruro de Antimonio	Grado reactivo
Artemisina en metanol	Grado reactivo

REACTIVO	CALIDAD
Picrato de Sodio	Grado reactivo
Cloruro de Sodio	Grado reactivo
Solución de gelatina	Grado reactivo
Sulfato de sodio anhidro	Grado reactivo
Anhídrido acético en ácido sulfúrico	Grado reactivo
Colesterol en cloroformo	Grado reactivo
Nitroprusiato de sodio en agua	Grado reactivo
Hidróxido de potasio	Grado reactivo
Reactivo de Baljet	Grado reactivo
Reactivo de Mayer	Grado reactivo
Reactivo de Dragendorff	Grado reactivo
Hidróxido de sodio	Grado reactivo
Ácido Clorhídrico	Grado reactivo
Etol	Grado reactivo
Cloroformo	Grado reactivo
Dietilamina	Grado reactivo
m-butanol	Grado reactivo
Ácido Acético	Grado reactivo
Metanol	Grado reactivo
Agua	Grado reactivo
Acetato de etilo	Grado reactivo
Tolueno	Grado reactivo
Ácido Nítrico	Grado reactivo
Éter de petróleo	Grado reactivo
Hexano	Grado reactivo
Benceno	Grado reactivo

b) Equipo:

i) Equipo instrumental:

- Balanza Scientech, modelo 1-10971, $\pm 0.0015g$.
- Lámparas UV de mano IECSA, modelo 95-0004-09, LUV 254 nm y LUV 365 nm.
- Cromatografo de gases Hewlett Packard 6890
- Molino Thomas Wiley Mill Estándar, Modelo No. 3, provisto de un tamiz.

ii) Cristalería y otro equipo:

- Baño de María
- Estufa con agitación magnética marca Orthmann
- Ampolla de separación de 250 mL
- Vaso de Precipitados de 200 mL de pirex
- Vaso de Precipitados de 50 mL de pirex
- Varilla de agitación de vidrio de 30 cm de largo
- Embudo de vidrio mediano
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Micropipetas de vidrio
- Cápsulas de porcelana pequeña
- Mortero con pistilo
- Agitador magnético analógico
- Cámara Cromatográfica
- Termómetro de mercurio con un rango de medición de -10 a 400 °C
- Papel filtro Whatman No. 1 Qualitative
- Papel aluminio
- Papel indicador de pH
- Tijeras
- Cromatoplasmas TLC 10 x 20 cm. Silica Gel 60 (espesor 0,25 mm)
- con indicador UV. De fase estacionaria
- Mangueras de propileno reforzada para uso con bomba de vacío
- Mangueras de hule
- Evaporador rotatorio

C. MÉTODO1. **Diseño de Investigación:**

El presente trabajo consiste en un estudio exploratorio descriptivo de la caracterización de los grupos o familias de metabolitos secundarios de las partes aéreas (hojas, tallo, flores y fruto) de la planta *Garrya corvorum*. El estudio consta de tres pasos principales; el primero consiste en la colecta de la planta en la meseta alta de la sierra de los Cuchumatanes; el segundo paso es la preparación de la muestra, dejar secar las partes colectadas de la planta 20 días, molerlas y hacer pasar por un tamiz de malla 24; el tercer paso consiste en la realización de dos estudios fitoquímicos, que incluyen el primero las hojas y tallos, y el

segundo las flores y frutos (se hace de esta forma porque se ha determinado que existe mucha similitud entre los componentes químicos de hojas y tallos así como entre flores y frutos); para la determinación cualitativa individual de la presencia o ausencia de familias de metabolitos secundarios. La familia de metabolitos secundarios a determinar cualitativamente son: alcaloides, flavonoides y antocianinas, antraquinonas, cumarinas, cardenólicos y bufadienólicos, esteroides o triterpenoides, saponinas, taninos, glicósidos cianogénicos, aceites volátiles, esteroides insaturados, sesquiterpenlactonas y valepotriatos. Ambos tamizajes fitoquímicos se realizan utilizando ensayos macro, semi-micro, cromatografía en capa fina convencional y para la identificación de aceites volátiles se utilizara la técnica de cromatografía de gases. La metodología empleada es la sugerida por el manual de operaciones del LIPRONAT y algunos otros métodos alternativos, considerados necesarios en el momento de realizar el estudio. Por ejemplo si las pruebas no fueran concluyentes se buscaron pruebas alternas para poder asegurar la presencia o ausencia de determinada familia de metabolitos.

2. Procedimiento

- a. Búsqueda inicial y caracterización botánica: Con base a la literatura se establecen los lugares donde habita y las características botánicas de la especie endémica en estudio *Garrya corvorum*; se toman fotos de la planta de la colección que se encuentra en el herbario BIGU de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia como referencia para la identificación en el campo (debe tomarse en cuenta que la identificación de la planta no se realiza con las fotografías tomadas sino que estas solo sirven como guía para la búsqueda).
- b. Selección de la Muestra: Para la selección de la muestra se utilizará un método de muestreo no probabilístico por conveniencia.
- c. Recolección de la especie *Garrya corvorum*: La colecta se realizará en la sierra de los Cuchumatanes, en jurisdicción del caserío Tierra Blanca, aldea Xemal, del municipio de Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, a una altura aproximada de 3800 SNM. La muestra debe recolectarse en el transcurso del periodo del mes de octubre a noviembre; que es la época en que la planta inicia a dar fruto. Al terminar de florecer se puede encontrar únicamente con hojas verdes. Luego de recolectar, la muestra debe almacenarse en pliegos de papel periódico evitando la exposición al sol y no se debe utilizar bolsas plásticas para su almacenaje para evitar reacciones secundarias y crecimiento de hongos dentro de éstas por acción del calor y falta de oxígeno.

d. Secado y molienda: Luego de recolectar la muestra se deja secar durante 20 días a temperatura ambiente con suficiente ventilación, evitando la exposición a la luz solar; secar aproximadamente el doble del material a utilizar; las partes aéreas, tallo y hojas se sujetan con un hilo de la parte de los tallos y se cuelgan para desecar; las flores y frutos se dejan secar en el papel periódico. Una vez seco el material; este se tritura manualmente para disminuir el tamaño de los tallos de la planta, posteriormente se reduce el tamaño de la partícula en un molino Wiley-Mill Estándar Modelo No 3 y el producto se pasa por un tamiz de malla No 24 para obtener un tamaño de partícula menor a 1 mm para el inicio de los análisis macro y semi-micro del tamizaje fitoquímico.

e. Tamizaje Fitoquímico de hojas, tallo, flor y fruto de la especie *Garrya corvorum*: El estudio incluye la realización de dos tamizajes fitoquímicos, el primero hojas y tallos y el segundo las flores y frutos; para determinar por separado la presencia o ausencia de metabolitos secundarios. Los tamizajes fitoquímicos se realizan utilizando ensayos macro, semi-micro y cromatografía en capa fina convencional sugerido por el manual de operaciones del LIPRONAT. También se emplea la técnica de cromatografía de gases para la determinación de aceites volátiles. El Procedimiento del Análisis Cualitativo de los metabolitos Secundarios es el descrito a continuación:

i) **Investigación de Alcaloides:** Ensayos macro y semimicro: pesar 1 g de material vegetal. Agregar 2 gotas de disolución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego añadir 25 mL de metanol a 60°C. Filtrar con papel filtro Whatman 1 y acidificar el filtrado con 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

Se considera positivo si forma un precipitado color blanco-crema

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff

Se considera positivo si forma un precipitado color rojo a naranja

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner

Se considera positivo si forma un precipitado color marrón

Tubo 4: testigo (tubo que no se le agrego ningún reactivo revelador de alcaloides con el fin de comparar una coloración inicial y final en los tubos anteriores).

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

Estas son reacciones de formación de complejos, se fundamentan en la propiedad que tienen los alcaloides de combinarse con los metales pesados Bi, Hg o con el yodo. Todos los alcaloides precipitan con sales de platino, tricloruro de oro, ácido pícrico, taninos.

Cromatografía de 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 cromatoplaque de sílica gel 60 F₂₅₄, utilizando como estándar 10 µL de una disolución de atropina y papaverina al 1% en metanol.

Fase móvil: cloroformo-dietilamina (90:10)

Detección sin tratamiento químico, utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm como resultado positivo se tiene fluorescencia. Utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 365 nm como resultado positivo se tiene fluorescencia azul o amarilla.

ii) **Investigación de flavonoides y antocianinas:** Ensayos macro y semi-micro, extraer de 3 g de material vegetal 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 7 tubos:

NUMERO DE TUBO	REACTIVO A AGREGAR	RESULTADO POSITIVO (Coloración)
1	0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.	Coloración amarilla, indica presencia de flavonas y flavonoles
2	3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 % (p/v).	Azul, verde negro; presencia de compuestos fenólicos, taninos
3	0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de María por 5 minutos	Coloración roja indican la presencia de leucantocianidinas; y coloración marrón indican presencia de catequinas
4	5 mg de magnesio metálico y 0.5 de ácido clorhídrico concentrado	Tonos rojos indican la presencia de posibles taninos

5	Agregar 5 gotas de hidróxido de sodio 1 N	Coloración roja en fase acuosa posible presencia de antraquinonas y naftoquinonas
6	5 ml de disolución de ácido bórico en anhídrido acético al 3%	Coloración amarilla o amarilla verdosa posible presencia de 5-hidroxi flavona
7	Testigo (tubo que no se le agrega ningún reactivo revelador de flavonoides y antocianinas con el fin de comparar una coloración inicial y final en los tubos anteriores)	Conserva la coloración original

Cromatografía en capa fina: Extraer de 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño de María a 60°C durante 5 minutos, filtrar y concentrar. Aplicar 20µL en una cromatoplaqueta de sílica gel 60 F₂₅₄. Como estándares emplear 10µL de una disolución de flavonoides al 0.05 % en metanol. (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hipersódio, ácido cafeico, kamferol, hidrato de quercetina).

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

Detección sin tratamiento químico, utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm como resultado positivo se tiene fluorescencia, zonas azules o amarillas. Utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 365 nm como resultado positivo se tiene dependiendo de la estructura; fluorescencia azul o amarilla. Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas.

iii) **Investigación de antraquinonas:** Prueba de Bornträger: Extraer de 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80%, filtrar y concentrar en baño de María a 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 disolución de "prueba de amonio" y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo a 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 disolución de "prueba de amonio" y agitar. Observar cambios de color en fase alcalina (color rojo a rosado: positivo).

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

Estándar: 10 µL de disolución al 0.1 % en metanol de antraquinonas (extracto de sen).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (76:14:10)

Detección sin tratamiento químico, utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm como resultado positivo se tiene fluorescencia. Utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 365 nm como resultado positivo se tiene fluorescencia amarilla o rojo-café. Aplicar a la placa vapores de amoniaco para intensificar el color de las manchas.

Detección con tratamiento químico, agregar una disolución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 %. Antraquinonas: utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm y 365nm como resultado positivo se tiene fluorescencia roja. Antronas y antranolas: utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm y 365nm como resultado positivo se tiene fluorescencia amarilla.

iv) Investigación de Cumarinas: Ensayos macro y semimicro: Medir 5 mL de extracto vegetal metanólico. Agregar 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 gotas en papel filtro. A una de las gotas aplicada en el papel agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5 N, observar bajo radiación ultravioleta de 365 nm. Como resultado positivo se tiene fluorescencia azul o verde.

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 sílica gel F₂₅₄. Utilizar como estándares; canela en metanol al 1%, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina.

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

Detección; sin tratamiento químico utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm como resultado positivo se tiene fluorescencia. Utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 365 nm

Detección; con tratamiento, agregar una disolución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%. Utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 365 nm se tiene como resultado positivo fluorescencia azul o verde.

v) **Investigación de cardenólicos y bufadienólicos:** Presencia de lactonas insaturadas: extraer de 5 g de material vegetal con 30 mL de etanol o metanol al 80% y filtrar. Colocar tres gotas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 mL) sobre un papel filtro. Secar y agregar 3 gotas de reactivo Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digoxina* 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 Kéller –Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar sobre las paredes del tubo de 1 a 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Observar la formación de un anillo en la interfase; la presencia de un anillo púrpura indica una prueba positiva.

Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal agregar 20 mL de etanol al 50% 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 de 30 a 50 μ L en la cromatoplaqueta de sílica gel 60 F₂₅₄. Usar como estándar 20 μ L digoxina 5 mg/ 2 mL de metanol.

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (78:10:12).

Detección sin tratamiento químico, utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm como resultado positivo se tiene fluorescencia por cardenólicos la mayor fluorescencia es debida a los bufadienolidos; los glicósidos cardíacos no fluorescen utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda 365 nm.

Detección con tratamiento químico; con reactivo de Kedde, evidencia la presencia de anillo lactónico de los cardenólicos; utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda 254 nm presencia de zonas rosa o azul violeta, los bufadienolidos no reaccionan.

vi) **Investigación de esteroides o triterpenoides:** Reacción de color : Lieberman Burchard: aplicar unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en la que las saponinas triterpenoides dan color rosado o púrpura. *Resultados:* (verde, azul verdoso) posibles esteroides conteniendo 2 dobles enlaces carbono – carbono 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.

vii) **Investigación de saponinas:** Prueba de espuma;

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

Tubo 2: 2 mL de control de saponinas al 0.5%.

Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo se le adiciona 10 mL de agua destilada. Calentar en baño de María a 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 de Capa Fina: De 1 g de material 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 cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄. Usar como Estándar, 10 µL de estándar de saponinas al 0.1 % en metanol (Digoxina).

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

Detección sin tratamiento químico; reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

Detección con tratamiento químico; agregar el reactivo de Liebermann-Burchard: utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm o 265 nm como resultado positivo se tienen zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides.

Utilizando reactivo de Komarowsky y radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm o 365 nm como resultado positivo se tiene zonas azules, amarillas y rojas.

Utilizando reactivo de vainillina—ácido sulfúrico y anisaldehído—ácido sulfúrico: utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm o 365 nm como resultado positivo se tiene zonas azules, violetas, amarillentas.

viii) **Investigación de taninos:** Ensayos macro y semimicro: Extraer de 10 g de material 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 disolución de cloruro de sodio al 10 % y filtrar. Adicionar 3 mL de filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo tubo que no se le agrega ningún reactivo revelador de taninos, con el fin de comparar una coloración inicial y final en los tubos siguientes.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de disolución de gelatina al 1 % p /v

Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina sal (1 % de gelatina y 10% de cloruro de sodio)

Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de disolución de cloruro férrico al 10 % p /v, la presencia de color grisáceo-negro evidencia la presencia de catecol; y una coloración negro-azulado evidencia la presencia de pirogalol.

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

ix) **Investigación de glicósidos cianógenicos:** 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 a café).

x) **Investigación de Aceites Volátiles:** Realizar una maceración en frío de 10 a 50 g de material vegetal en 50 a 100 mL de hexano, dejar reposar durante 8 días, agitar constantemente. Secar con sulfato de calcio y determinar compuestos volátiles utilizando cromatografía de gases con detector de masas.

Condiciones Cromatográficas:

Equipo: Cromatógrafo de gases HP 5890 serie II con detector de masas 5971, software Chemstation

Columna: Columna capilar de sílice fundida HP- 5 de 30 m x 0.2 mm ID (Crosslinked 5% fenil- metil siloxano)

Fase Móvil: Helio

Flujo: 1 ml /min

Temperatura:

- Del horno: 50 °C
- Del Inyector 250 °C
- Temperatura del Detector: 280 °C
- Rampa de temperatura: inicia de 50°C a 250 °C, con un gradiente de 20 °C por cada 5 minutos.

Técnica de Inyección: Tomar, con la jeringa del cromatógrafo, 0.2 µL de muestra del aceite extraído, e inyectarlo en el diafragma de la cámara de vaporización del equipo.

Tiempo de corrida: 30 minutos

Características del detector de masas: (estas son las mismas condiciones de la biblioteca de comparación software Chemstation)

Modo de impacto: 70 eV con multiplicador de voltaje de 1700 V

Temperatura de la línea de transferencia: 280 °C

Rango de las masas para las experiencias: full scan 50 –500 *m/z*

Metodología de Análisis: Calibrar el equipo y optimizar las condiciones cromatográficas antes descritas. Inyectar las dos muestras de los aceites obtenidos por hidrodestilación. Al momento de obtener los cromatogramas comparar con la biblioteca disponible y determinar presencia y tipo de aceites volátiles; reportar resultados.

xi) **Investigación de Esteroles insaturados:** Ensayo macro y semimicro: Extraer de 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol al 80%. Filtrar y concentrar a sequedad. Remover pigmentos vegetales utilizando porciones de 10 mL de éter de petróleo hasta que el éter no tenga color. 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 (Prueba de Liebermann-Buchard).

Tubo 2: Ensayo de anillo; agregar ácido sulfúrico concentrado (Prueba de Salkowski)

Tubo 3: Testigo; tubo que no se le agrega ningún reactivo revelador de esteroides insaturados, con el fin de comparar una coloración inicial y final en los tubos anteriores. Usar como estándar una disolución de colesterol en cloroformo 0.1%. Observar cambios de colores inmediatos y /o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un periodo de una hora.

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

xii) **Investigación de Lactonas Sesquitérpenicas:** Prueba de Legal: A 1 ó 2 mg de muestra en agua o etanol se le agrega 1 mL de disolución fresca de Nitroprusiato de sodio 0.5% en agua y 1-4 gotas de KOH 2 N. Se presenta colores característicos rojo oscuro, para lactonas α y β insaturadas.

Cromatografía en capa fina:

Fase móvil: Cloroformo: éter etílico (9:1)

Detección: se emplearan dos reveladores: Vapores de yodo colocar la placa en una cámara con yodo aparecerán manchas amarillas; y vainillina al 1% en etanol; luego del calentamiento de la placa por 5 minutos de 100 a 105 °C, aparecerán manchas rojas o azules.

xiii) **Investigación de valepotriatos:** Proceso de extracción: pesar 0.2 g de material vegetal seco y molido, agregar 5 mL de diclorometano y calentar la muestra a 60 °C en baño de María por 5 minutos. Agitar y filtrar, lavar el residuo con diclorometano, mezclar y evaporar a sequedad. Al residuo agregar 2 mL de acetato de etilo.

Cromatografía de capa fina:

De la disolución anterior agregar 10 µL a la cromatoplaca

Fase móvil; tolueno: acetato de etilo (75:25).

Detección: agregar a la cromatoplaca unas 5 gotas por aspersion de ácido clorhídrico y ácido acético y calentar a 100 °C. Utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm ó 365 nm, como resultado positivo se tienen zonas azules que indican la presencia de valtratos y acevaltratos y zonas cafés indican dihidrovaltratos.

Agregar a la cromatoplaca unas 5 gotas por aspersion de Dinitrofenilhidrazina. Utilizando radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm ó 365 nm como resultado positivo se tiene zonas verdes gris o azules, sí hay calor excesivo, entonces zonas (cafés-amarillas).

3. Análisis de Resultados

Las reacciones utilizadas en estas pruebas son pruebas cualitativas en todos los casos; por lo que la interpretación de los resultados indica presencia o ausencia de los metabolitos secundarios. Las pruebas que se le realizan a cada una de las familias de metabolitos son las descritas en la tabla VII. No.1

Tabla VII. No. 1. Pruebas a realizar a las diferentes familias de Metabolitos Secundarios.

METABOLITO A ENSAYAR	ENSAYO APLICADO		
	ENSAYO MICRO	ENSAYO MACRO	CCF
Alcaloides	+	+	+
Flavonoides y Antocianinas	+	+	+
Antraquinonas	+	+	+
Cumarinas	+	+	+
Cardenólicos y bufadienólicos	+	+	+
Esteroles y Triterpenoides	+	+	-
Saponinas	+	+	+
Taninos	+	+	
Aceites volátiles	-	-	+
Esteroles insaturados	+	+	-
Lactonas Sesquiterpénicas	+	+	+
Valepotriatos	-	-	+

VIII. RESULTADOS

Tabla VIII. No.1 Resultados del Tamizaje Fitoquímico de Hojas y Tallos de la especie *Garrya corvorum*.

Metabolito	Prueba	Cambios Observados	Aplicación y Comentario	Resultados
Alcaloides	Mayer`s	Precipitación crema en el fondo del tubo	El precipitado son los alcaloides que precipitan en medio neutro o ligeramente ácido	+
	Dragendorf	Coloración naranja	Cambio de color al agregar a una disolución ácida de alcaloides	+
	Wagner	Coloración marrón	Determina la presencia de alcaloides generales	+
	CCF	UV 254: manchas con fluorescencia amarilla UV 365: fluorescencia azul (ver anexo 7)	Algunas de las manchas coinciden con las del estándar de papaverina y atropina	+
Flavonoides y Antocianinas	Adición de H ₂ SO ₄ concentrado	Coloración amarilla	Coloración amarilla indica presencia de flavonas y flavonoles	+
	Adición de FeCl ₃ al 10% p/v	Color verde negro	Azul, verde negro, presencia de compuestos fenólicos, taninos	+
	Prueba para Leucoantocianinas	Amarillo	Coloración roja indica la presencia de leucoantocianinas; y coloración marrón indican la presencia de catequinas	—
	Método de Shinoda	Amarillo	Tonos rojos indican la presencia de posibles taninos	—
	Bornträger	ninguno	Coloración roja en fase acuosa es posible presencia de antraquinonas y naftoquinonas	—
	Método Dimroth	Color amarillo	Coloración amarilla verdosa posible presencia de 5-hidroxi flavona	+
	CCF	UV 254: manchas con fluorescencia UV 365: fluorescencia amarilla (ver anexo 7)	Algunas manchas encontradas coinciden con la de los estándares utilizados	+
Antraquinonas	Bornträger	Ninguno	No se observo cambios de color en la fase alcalina	—
	Bornträger modificado	Ninguno	no existe la presencia de antraquinonas y naftoquinonas	—
	CCF	Ninguno	La mancha no corresponde en color ni posición a ninguno de los estándares empleados. Ausencia de antranolas y antranas.	—

Metabolito	Prueba	Cambios Observados	Aplicación y Comentario	Resultados
Cumarinas	Fluorescencia	Anillo fluorescente poco intenso poco definido	Fluorescencia evidencia la presencia de hidroxycumarinas sencillas	+
	CCF	Fluorescencia(ver anexo 7)	Con y sin tratamiento químico se observa fluorescencia	+
Cardenólicos y Bufadienólicos	Kedde	Mancha color violeta -morada poco intensa	Posibles glicósidos cardiacos, para anillos γ -lactona- α,β -insaturado	+
	Keller -Killiani	Anillo púrpura poco intenso	Presencia de azúcares 2 - desoxigenados	+
	CCF	Coloración rojiza a 365 nm	Evidencia la presencia del anillo lactónico de los cardenólicos	+
Saponinas	Prueba de espuma	Ninguno	No produjo espuma	-
	CCF	Ninguno	No hay cambios de coloración	-
Taninos	Gelatina	Café amarillento	Igual al tubo testigo	-
	Gelatina-Sal	Café amarillento	Igual al tubo testigo	-
	Cloruro Férrico	grisáceo-negro	presencia de color grisáceo-negro evidencia la presencia de catecol	+
Glicósidos Cianogenicos	Prueba de Guignard	No hay cambio de papel	Ausencia del ion cianuro para realizar una autohidrólisis con el picrato de sodio; la cual produce el cambio de color en las tiras de papel.	-
Esteroles Insaturados	Libermann - Burchard	Coloración verde-transparente y coloración roja en el fondo	Posibles esteroides conteniendo 2 C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico	+
	Salkowski	Anillo rojizo intenso en la interface	Posibles esteroides conteniendo 2 C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico	++
Lactonas Sesquiterpénicas	Legal	Ninguno	No hay colores característicos	-
	CCF	Ninguno	No hay evidencia de manchas	-
Valepotriatos	CCF	Ninguno	No hay cambios de coloración ni evidencia de manchas características	-
Aceites Esenciales	Cromatografía de Gases	Ninguno	No hay aceites esenciales	-

Tabla VIII. No.2 Resultados del Tamizaje Fitoquímico de Flores y Fruto de la especie *Garrya corvorum*.

Metabolito	Prueba	Cambios Observados	Aplicación y Comentario	Resultados
Alcaloides	Mayer's	Precipitación crema en el fondo del tubo	El precipitado son los alcaloides que precipitan en medio neutro o ligeramente ácido	+
	Dragendorf	Coloración naranja	Cambio de color al agregar a una disolución ácida de alcaloides	+
	Wagner	Coloración marrón	Determina la presencia de alcaloides generales	+
	CCF	UV 254: manchas con fluorescencia amarilla UV 365: fluorescencia azul (ver anexo 7)	Las manchas encontradas coinciden con las del estándar de papaverina y atropina	+
Flavonoides y Antocianinas	Adición de H ₂ SO ₄ Concentrado	Color amarillenta en el fondo y encima un color anaranjado	Coloración amarilla indica presencia de flavonas y flavonoles	+
	Adición de FeCl ₃ al 10% p/v	Color verde negro	Azul, verde negro, presencia de compuestos fenólicos, taninos	+
	Prueba para Leucoantocianinas	Color rojo-rosado	Coloración roja indica la presencia de leucoantocianinas; y coloración marrón indican la presencia de catequinas	+
	Método de Shinoda	Color rojo	Tonos rojos indican la presencia de posibles taninos y posible núcleo de benzopirona	+
	Bornträger	No hay cambio de color	Coloración roja en fase acuosa es posible la presencia de antraquinonas y naftoquinonas	—
	Método Dimroth	Coloración amarillenta	Coloración amarilla verdosa es posible la presencia de 5-hidroxi flavona	+
	CCF	UV 254: manchas con fluorescencia. UV 365: fluorescencia amarilla.	Algunas manchas encontradas coinciden con la de los estándares.	+
Antraquinonas	Bornträger	Ninguno	No se observo cambios de color en la fase alcalina	—
	Bornträger modificado	Ninguno	No existe la presencia de antraquinonas y naftoquinonas	—
	CCF	Ninguno	La mancha no corresponde en color ni posición a ninguno de los estándares empleados. Ausencia de antranolas y antronas).	—

Metabolito	Prueba	Cambios Observados	Aplicación y Comentario	Resultados
Cumarinas	Fluorescencia	Anillo fluorescente definido e intenso	Fluorescencia evidencia la presencia de hidroxycumarinas sencillas	+
	CCF	Fluorescencia (ver anexo 7)	Con y sin tratamiento químico se observa fluorescencia. Ninguna mancha corresponde a las del estándar.	+++
Cardenólicos y Bufadienólicos	Kedde	Mancha color violeta –morada intensa	Posibles glicósidos cardenólicos, para anillos γ -lactona- α,β -insaturado	+++
	Keller –Killiani	Anillo de coloración definida	Presencia de azúcares 2 – desoxigenadas	+++
	CCF	Coloración rojiza a 365 nm	Evidencia la presencia del anillo lactónico de los cardenólicos	+
Saponinas	Prueba de espuma	Ninguno	No produjo espuma	—
	CCF	Ninguno	No hay cambios de coloración	—
Taninos	Gelatina	Café amarillento	Igual al tubo testigo	—
	Gelatina-Sal	Café amarillento	Igual al tubo testigo	—
	Cloruro Férrico	Grisáceo-negro	presencia de color grisáceo-negro evidencia la presencia de catecol	+
Glicósidos Cianogenicos	Prueba de Guignard	No hay cambio de papel	Ausencia del ion cianuro para realizar una autohidrólisis con el picrato de sodio; la cual produce el cambio de color en las tiras de papel.	—
Esteroles Insaturados	Libermann – Burchard	Coloración verde-transparente y coloración roja en el fondo poco intensa	Posibles esteroides conteniendo 2 C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico	+
	Salkowski	Anillo rojizo intenso en la interfase poco intensa	Posibles esteroides conteniendo 2 C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico	+
Lactonas Sesquitérpenicas	Legal	Ninguno	No hay colores característicos	—
	CCF	Ninguno	No hay evidencia de manchas	—
Valepotriatos	CCF	Ninguno	No hay cambios de coloración ni evidencia de manchas características	—
Aceites Esenciales	Cromatografía de Gases	<ul style="list-style-type: none"> - Limoneno - Cinamaldehido - Eicosano - Acido 1,2-bencendicarboxilico - Tricosano - Pentadecano 	Si hay presencia de aceites esenciales	+

Tabla VIII. No. 3 Comparación de las pruebas entre el tamizaje de Hojas y Tallo y Flores y Fruto de la especie *Garrya corvorum*.

METABOLITO	PRUEBAS DE COLORACIÓN Y/ O PRECIPITACIÓN	RESULTADO TAMIZAJE HOJAS Y TALLOS	RESULTADO TAMIZAJE FLORES Y FRUTO
I. Alcaloides	1. Mayer's 2. Dragendorf 3. Wagner	+ + +	+ + +
II. Flavonoides y Antocianinas	1. Ácido Sulfúrico 2. Cloruro Ferrico 3. Rosenheim 4. Shinoda 5. Bornträger 6. Dimroth	+ + + + - +	+ + - - - +
III. Antraquinonas	1. Bornträger 2. Bornträger modificada	- -	- -
IV. Cumarinas	1. Fluorescencia	+	+++
V. Cardenólicos y Bufadienólicos	1. Kedde 2. Keller -Killiani	+ +	+++ +++
VI. Esteroides y Triterpenoides	1. Libermann Burchard 2. Ácido Tricloro acético 3. Carr- Price	- - -	- - -
VII. Saponinas	1. Prueba de Espuma	-	-
VIII. Taninos	1. Gelatina 2. Gelatina-Sal 3. Cloruro Férrico	- - +	- - +
IX. Aceites Volátiles	Cromatografía de Gases	-	+
X. Esteroles Insaturados	1. Libermann Burchard 2. Salkowski	+ ++	- +
XI. Lactonas Sesquitrpenicas	1. Legal 2. Baljet	- -	- -
XII. Valepotriatos	1. Cromatografía en capa fina	-	-

- = ausencia del metabolito
 + = disposición del metabolito
 ++ = disposición media del metabolito
 +++ = disposición mayor del metabolito

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la tabla VIII. No.3 se muestra una comparación de los resultados del tamizaje fitoquímico aplicado a las hojas y tallos y flores y fruto de la especie *Garrya corvorum*, en donde se aprecia una desproporción en la distribución de las familias de metabolitos en las diferentes partes de la planta; pero a pesar de la desproporción si existe uniformidad en las familias de metabolitos secundarios presentes; se destacan entre estas los alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides insaturados, cumarinas y cardenólicos y bufadienólicos. Según las familias encontradas se puede generalizar que la planta podría poseer aplicaciones características atribuidas a cada una de las familias presentes; estas familias de metabolitos varían entre las muestras de las hojas y tallos y flores y fruto por lo que es importante cuantificar los metabolitos en cada una de las muestras. Estas familias de metabolitos se pueden aislar en un estudio posterior y hacer una determinación de los metabolitos, con el fin de encontrarle aplicación específica a la especie

En la tabla VIII. No. 1 y tabla VIII. No. 2 se encuentran los resultados de las pruebas realizadas en los dos tamizajes fitoquímicos; se observa que en cada uno de los ensayos macro y semi-micro de coloración y precipitación existe variabilidad en la intensidad y tonalidad del color de la misma prueba aplicada a las dos muestras (hojas y tallos y flores y fruto); esto se debe a la preferencia de acumulación de los metabolitos en las diferentes partes de la planta; se debe tomar en cuenta también la diferencia en la estructura y peso molecular de los componentes de cada familia.

Algunas pruebas del tamizaje fitoquímico permiten determinar algunos metabolitos específicos dentro de las familias. En el caso de la identificación de alcaloides en la cromatografía en capa fin; se hace la comparación para los alcaloides papaverina y atropina y el resultado de las muestras evidencia algunas manchas iguales a la de los estándares, por lo que existe alta probabilidad que estos alcaloides estén presentes en la planta. En las pruebas de flavonoides se afirma la presencia de flavonas y flavonoles y compuestos fenólicos en la planta, y en hojas y tallos existe la presencia de 5- hidroxiflavona y en flores y fruto leucoantocianinas y núcleos de benzopironas. En la familia de cumarinas se ha identificado la presencia de hidroxicumarinas en la planta. La familia de cardenólicos y bufadienólicos están presentes en la planta, a este tipo de familia se les atribuye toxicidad cardíaca (compuestos que producen toxinas y producen un daño miocárdico) y esto hace que la planta sea una planta posiblemente toxica; por lo que debe realizarse una prueba cuantitativa de estos compuestos para determinar si cumple con los límites permitidos para considerar a la especie como libre de toxicidad; principalmente en las flores y fruto ya que evidencian mayor proporción. La familia de esteroides insaturados está presente en hojas y tallo con esteroides que contienen enlaces carbono carbono conjugado. Los aceites esenciales

únicamente están presentes en las flores y frutos y los de mas alta proporción son: Limoneno cinamaldehído, acido 1,2- bencendicarboxilico, eicosano y tricosano.

Las familias de metabolitos que no están presentes en la especie *Garrya corvorum* son: Esteroides y triterpenoides, saponinas, antraquinonas, lactonas sesquiterpenicas y valepotriatos.

X. CONCLUSIONES

1. Las familias de metabolitos presentes cualitativamente en las partes aéreas de la especie *Garrya corvorum*; son: Alcaloides, Flavonoides, Taninos, Esteroles insaturados, Cumarinas, Cardenólicos y Bufadienólicos.
2. Las familias de metabolitos mas importantes presentes cualitativamente en flores y fruto son: Alcaloides, Flavonoides y Antocianinas, Cumarinas, Cardenólicos y Bufadienólicos, Taninos, Esteroles insaturados y Aceites Esenciales.
3. Las familias de metabolitos mas importantes presentes cualitativamente en hojas y tallos son: Alcaloides, Flavonoides y Antocianinas, Cumarinas, Cardenólicos y Bufadienólicos, Taninos y Esteroles insaturados.
4. Los componentes principales del aceite esencial del extracto de flores y fruto son: Limoneno, cinamaldehído, acido 1,2- bencendicarboxilico, eicosano y tricosano .
5. Por ser un estudio exploratorio las pruebas preliminares realizadas generan información química y farmacológica de la planta *Garrya corvorum*; como instrumento de referencia para futuros estudios.

XI. RECOMENDACIONES

1. Las partes de las plantas medicinales utilizadas, al igual que los medicamentos comunes, son capaces de producir efectos adversos que en algunos casos, por su magnitud y/o características, pueden llegar a ser tóxicos. Las plantas que contienen glucósidos cardioactivos como en el caso de la especie *Garrya corvorum* producen toxicidad cardiaca, por lo que es recomendable cuantificar la cantidad de cardenólicos y bufadienólicos para poder determinar si se encuentra dentro de los límites permitidos para que pueda ser segura para uso medicinal.
2. Según las familias encontradas se puede generalizar que la planta podría poseer aplicaciones características atribuidas a cada una de las familias presentes; estas familias de metabolitos varían entre las muestras de las hojas y tallos y flores y fruto por lo que se recomienda cuantificar los metabolitos en cada una de las muestras.
3. Aislar las familias de metabolitos secundarios en un estudio posterior y hacer una determinación específica y cuantitativa de las familias más importantes, con el fin de encontrarle aplicación específica a la especie.
4. Encontrar los alcaloides presentes en la planta que posean propiedades básicas como acción fisiológica enérgica, acción narcótica o acción de inconsciencia entre otros.
5. Publicar el presente estudio en documentación relacionada a estudios fitoquímicos de plantas endémicas de Guatemala.

XII. REFERENCIAS

1. Albornoz A. Productos Naturales de estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas. Segunda edición. Editorial Limusa, Venezuela, 1980. 976 p. (pp.616)
2. Alcaloides Apocynáceas, Genero Rauolfia. Departamento de Análisis Aplicado. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1991. 69 p. (pp. 2-4). Tesis de grado.
3. Benigni, R; Capra, C; Cattorini, P. Piante Medicinal. Chemical, Farmacología e Terapia. Milano: Inverni & Della Beffa, Italia, 1962, pp. 218-221.
4. Bernadini, E. tecnología de aceites y grasas, Barcelona, Editorial Alhambra, España, 1981, pp. 120-125
5. Booth S, Bressani R, Jhons T. Nutrient content of selected indigenous leafy vegetables consumed by the kekchi people of Guatemala, articulo científico, Universidad de San Carlos, 1992. 76 p. (pp. 25-34)
6. Calderón PJ. *Et al.* "Factors influencing the formation of precipitates a hazes by gelatin and condensed and hidrolizable tannins". Volumen 16 No 3 J. Agr. Food chem., 1968. (pp.479-482).
7. Claus MP. "Chemistry and Biological Activities of Plants of the Genus *Neurolaena*". Segunda Edición. Editorial Limusa, Costa Rica, 1996 2 p.
8. D'Arcy, PF. Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part II. Drug interactions. Adverse Drug React Toxicology Rev, 1993; 12 (3): 147-162.
9. Diario de Centroamérica. Fecha de publicación 23 de mayo de 1996. Pág. 8
10. Diccionario Enciclopédico Océano. Océano S.A., Uno. 23 edición. Colombia: 1991. 4987 p.
11. Documento Importancia de Constituyentes de plantas Secundarias como Drogas. Departamento de Fitoquímica. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala 3: (1) 20-25. 1985. Palma Patricia y V. Valverde.

12. Enciclopedia de la Ciencia y de la Técnica. Danae. Vol. 1, Vol. 6. . España 1981. XVI+3038 p. (pp .124, 125,150-154, 258, 470-475, 2023,2074-2089).
13. Standley P. y Steyermark J. 1947-1977. Flora de Guatemala. Parte II; Guatemala. 1989. Volumen 24 (8)1: (70-73).
14. Gennaro AR. Farmacia Práctica de Remington. 17 ed. Argentina: Médica Panamericana, S.A. Vol. 1, Vol. 2, 1987. 2723 p. (pp. 1369-1380, 1406-1409, 1735).
15. Glick Z. *et al.* "Food intake depression and metabolic effects of tannic, acid in the rat". J. Nutr., Vol. 100 No. 5. Mayo 1970 (pp. 509-511).
16. Lock O. Investigación Fitoquímica. Universidad Pontificia Católica, Perú, 1988. XII+1347. (pp. 213).
17. López G. "Tamizaje Fitoquímico de cuatro especies del subgénero *Trichosalpinx* y cuatro del subgénero *Tubella* del Genero *Trichosalpinx* existente en Guatemala. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Farmacia) 2001 (pp. 45)
18. Manfred L. Recetas Botánica de 1,3000 plantas medicinales americanas, 12. ed. Kier S.A. Argentina, 1979. 668 p. (pp. 97, 145, 234, 271, 316, 347, 547, 568).
19. MANUAL DE OPERACIONES. Procedimientos Estándar de Operación. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales. 2005. febrero 2005. pp. 1-9.
20. Medinilla A. BE. Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Departamento de Fitoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 1988. 58 p. (pp. 3-58).
21. Porras, C. Codina, L. Paiz, E. Pöll. 1996. Alcaloides de *Hippeastrum solandriiflorum*. Plantas medicinales de Guatemala. Memorias del Segundo Congreso de Química Aplicada, Universidad de San Carlos de Guatemala, 15-19 de abril de 1996. (p. 2). Tesis de grado.
22. Salazar de A. Velásquez M. Variación en el Contenido de Provitamina A en Acelga, Departamento Alimentos Escuela de Nutrición. Guatemala: Universidad de San Carlos,

- (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Farmacia)
1996. Tesis de grado.
23. Scmidt-Hebbel. Química y Tecnología de los Alimentos, Salesiana, Santiago Chile, Chile.
1996. 117p. (pp.40)
24. Trease, GE; Evans, WCh. Farmacognosia. Editorial Interamericana--MacGraw-Hill. México
DF. 1991, p. 488.
25. Van Hellemont, J. Compendium de Phytotherapie. Bruxelles. Asociación farmacéutica
Bélgica, 1986, pp. 223-4.
26. Vauer, K. ; Gros, L. y sauer, W. Cromatografía en capa fina ; Una introducción. Nonell, S.
trad. Verlag-Heidelberg Berlin, Alemania. 1992. 70 p. (pp.9-15).
27. Velásquez Q. Tamizaje Fitoquímico de las partes aéreas de la planta *Galinsoga
urticaefolia*. Universidad San Carlos: Guatemala (tesis de grado, Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacia. Escuela de Farmacia) agosto 1998. 53 p. (pp. 4-17).
28. McMurry. J. "Química Orgánica". Quinta edición internacional. Editorial Thompson.
Impresa en México. 2001.
29. Plummer. D. "Bioquímica Práctica". Editorial McGraw Hill Latinoamericana S.A.
Colombia. 1981.
30. Skoog. West. Holler. Crouch. "Química Analítica". Editorial Mc-Graw Hill. Séptima Edición.
México 2001.
31. Ronquillo, F. "Colecta y descripción de sp vegetales de uso actual y potencial en
alimentación y medicinas en las zonas semiáridas del nororiente de Guatemala".
Universidad San Carlos. Guatemala (Tesis de grado, Facultad de Agronomía) 1992. 249 p.
(pp. 7-88).

XIII. ANEXOS

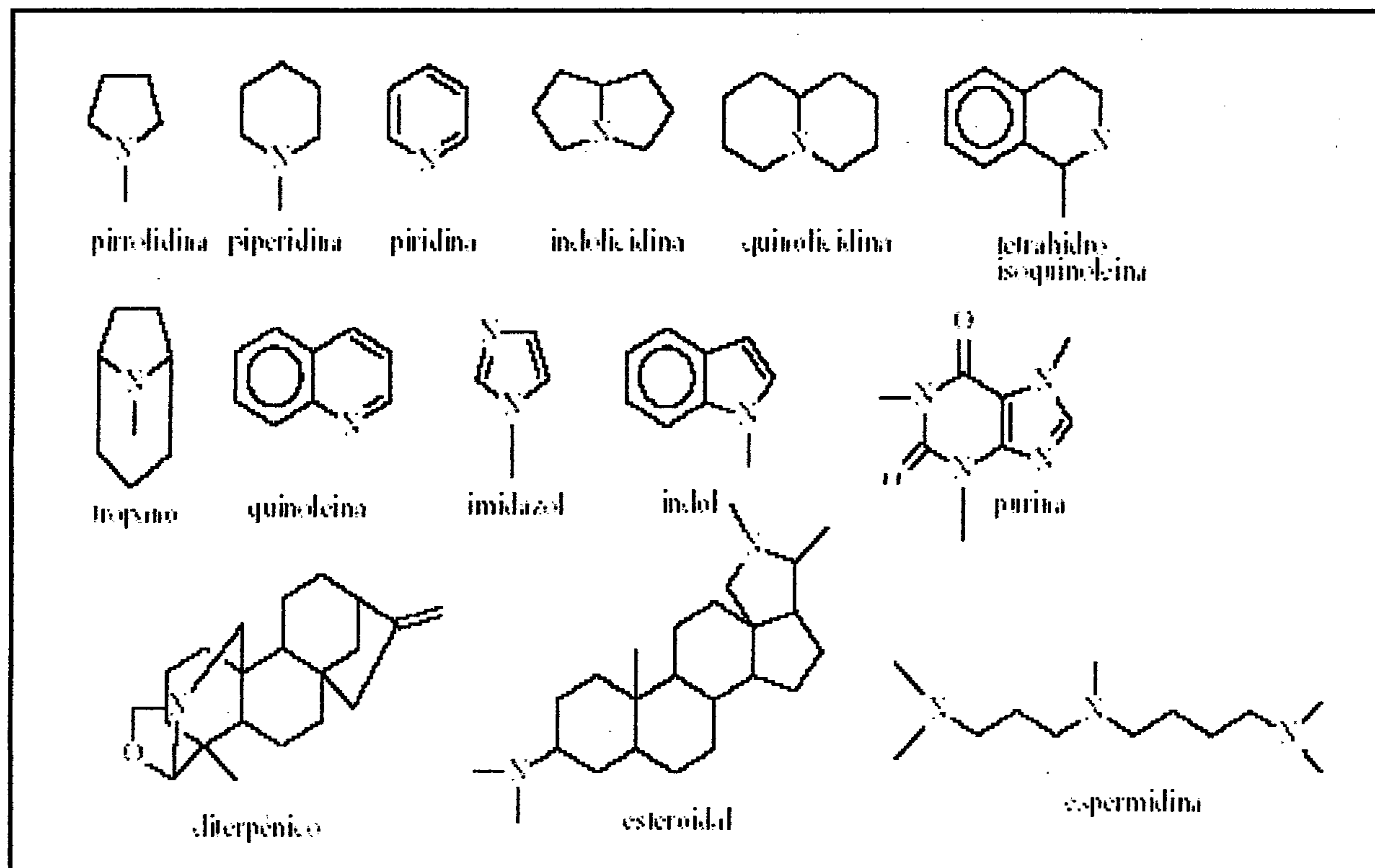
1. Estructuras Básicas de las familias de metabolitos secundarios en estudio

Figura XIII. No.1 Estructuras Químicas de algunos miembros de la familia de los Alcaloides.

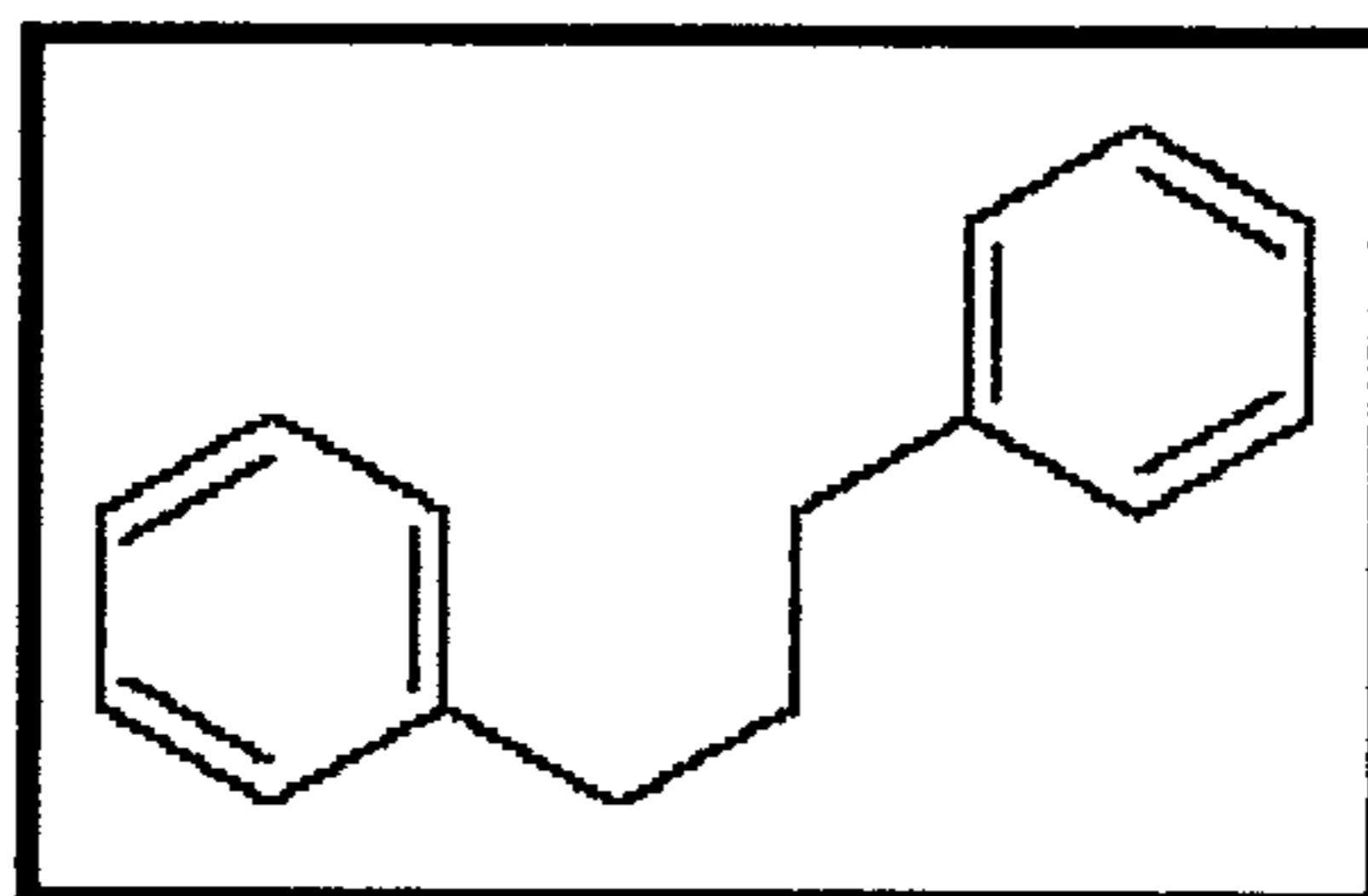


Figura XIII. No. 2 Estructura básica de los flavonoides

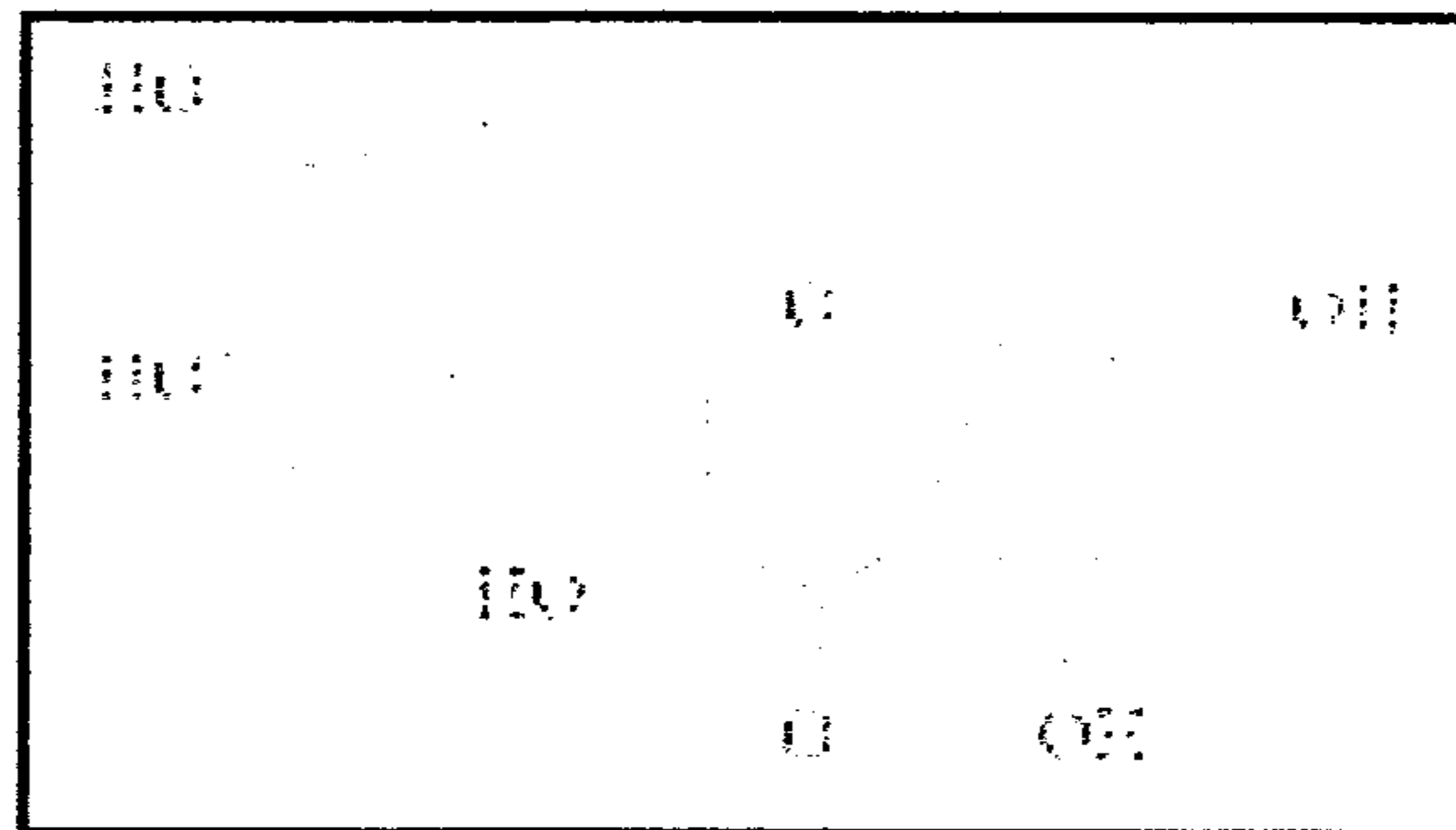


Figura XIII. No. 3 Estructura química de uno de los flavonoides más comúnmente hallados en la naturaleza, la quercetina.

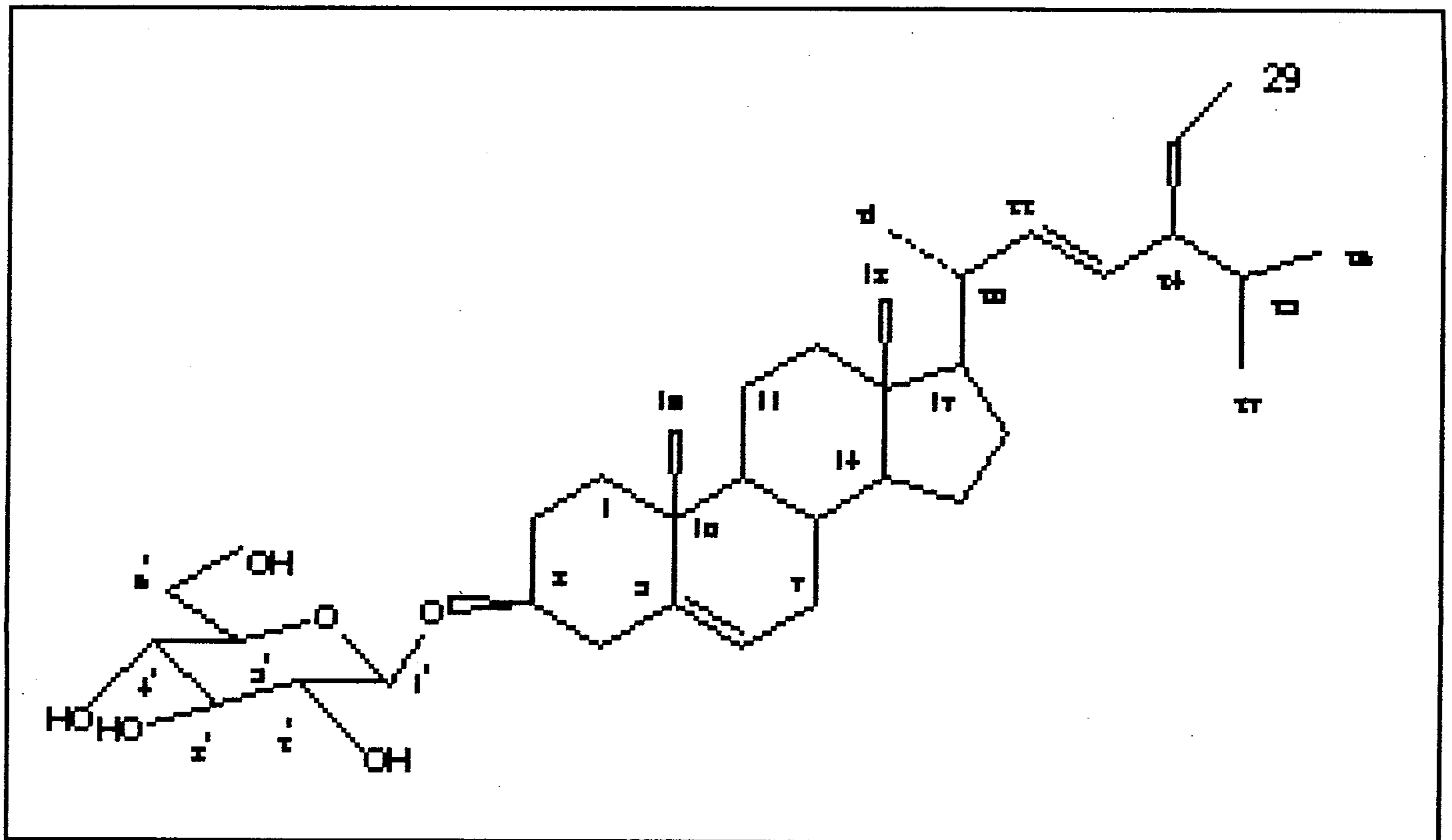


Figura XIII. No. 4. Estructura química general de la familia de lactonas sesquiterpénicas.

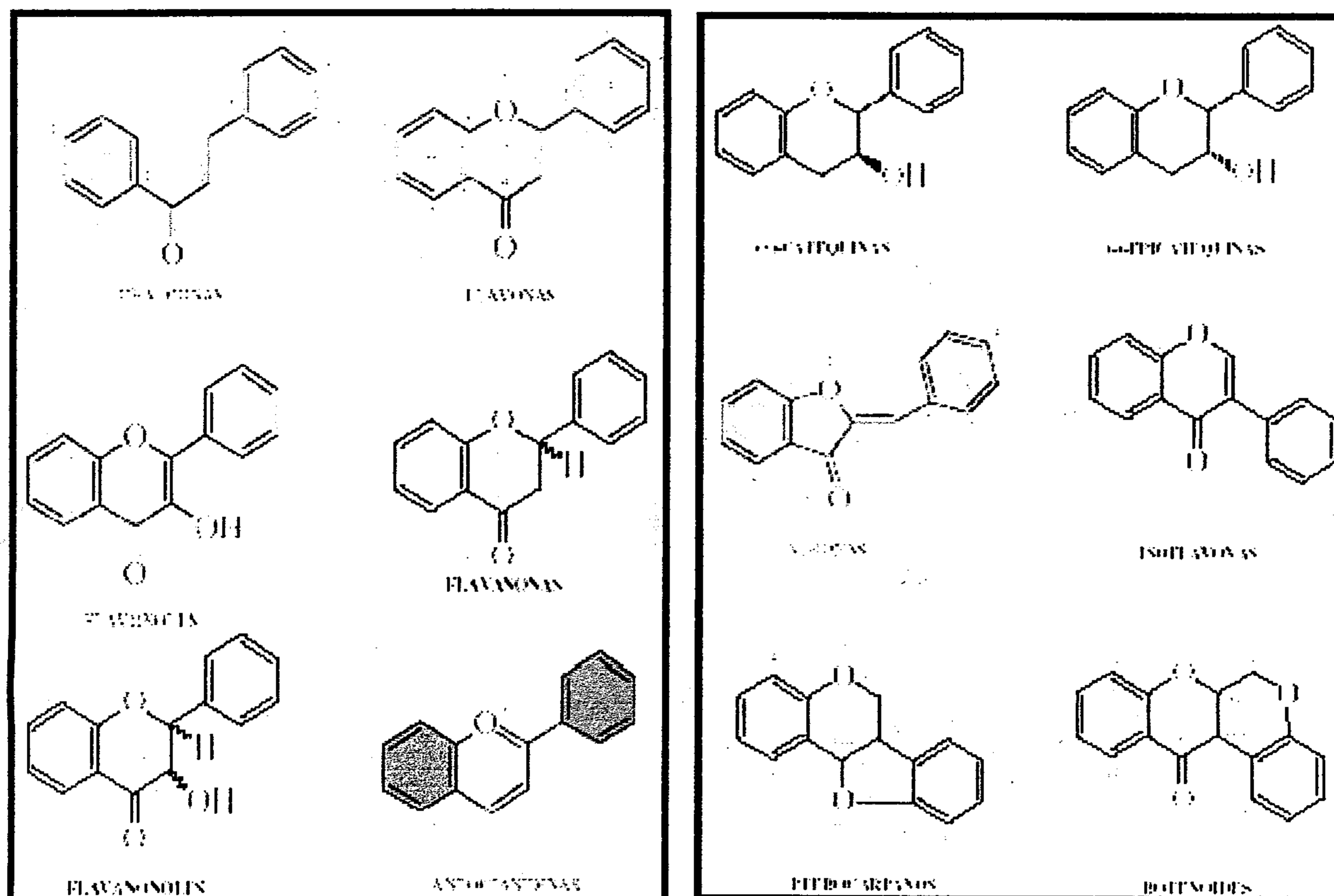


Figura XIII. No. 4 Estructuras básicas de varias clases de flavonoides

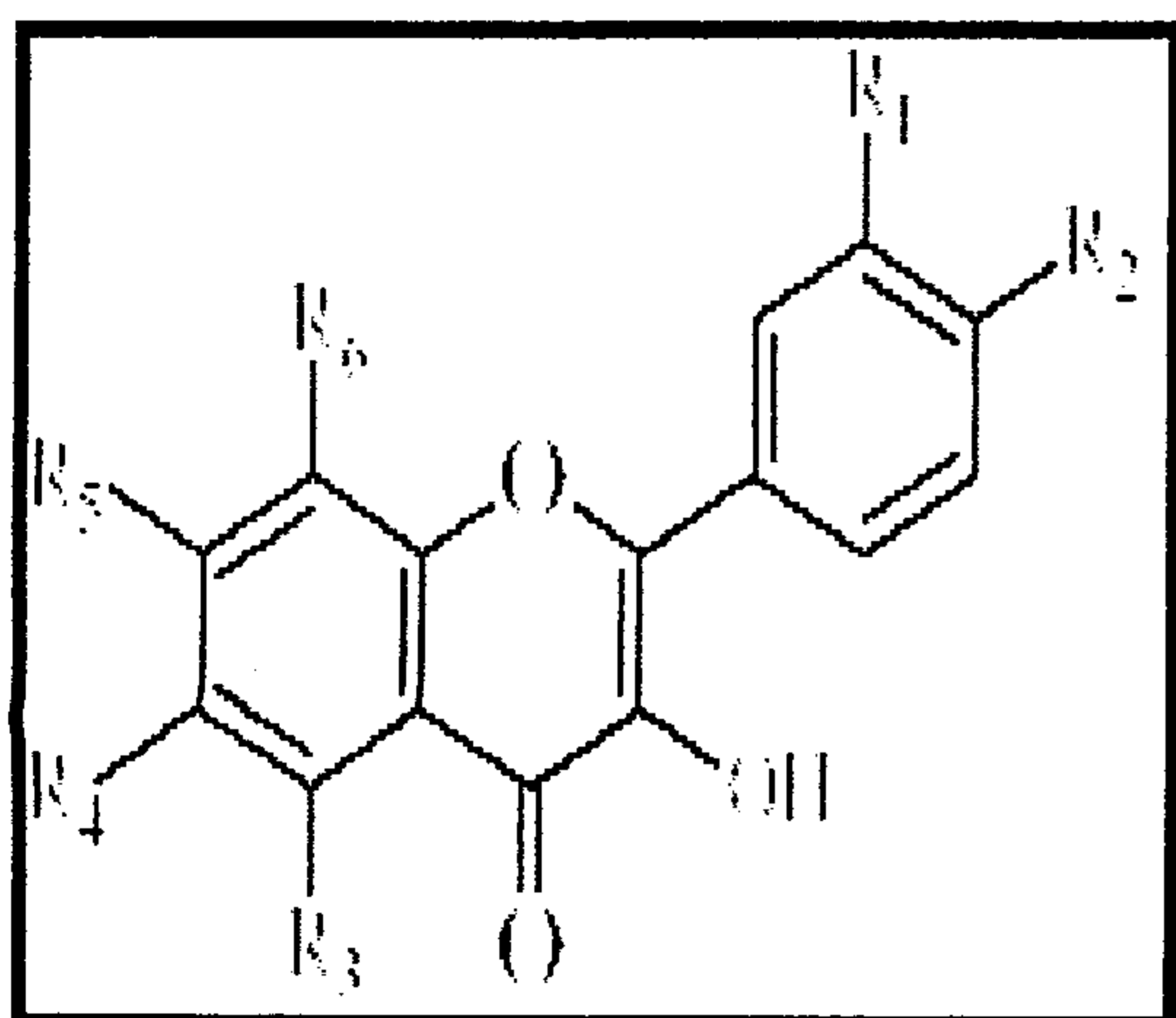


Figura XIII. No. 5. Varios ejemplos de diferentes clases de flavonoides.

Nombre Trivial	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Fuente
Galanagina	-	-	OH	-	OH	-	Alpina
Fisetina	OH	OH	-	-	OH	-	Rhus
Kaemferol	-	OH	OH	-	OH	-	Delphinium
Herbacetina	-	OH	OH	-	OH	OH	Gossypium
Ramnetina	OH	OH	OH	-	OMe	-	Quercus
Quercetagetina	OH	OH	OH	OH	OH	-	Rhamnus
Gossipetina	OMe	OH	OH	-	OH	OH	Tagetes
Isorramnetina	OH	OMe	OH	-	OH	-	Gossypium

Tabla XIII. No. 1. Ejemplos de diferentes clases de flavonoides Naturales y algunas de las fuentes vegetales

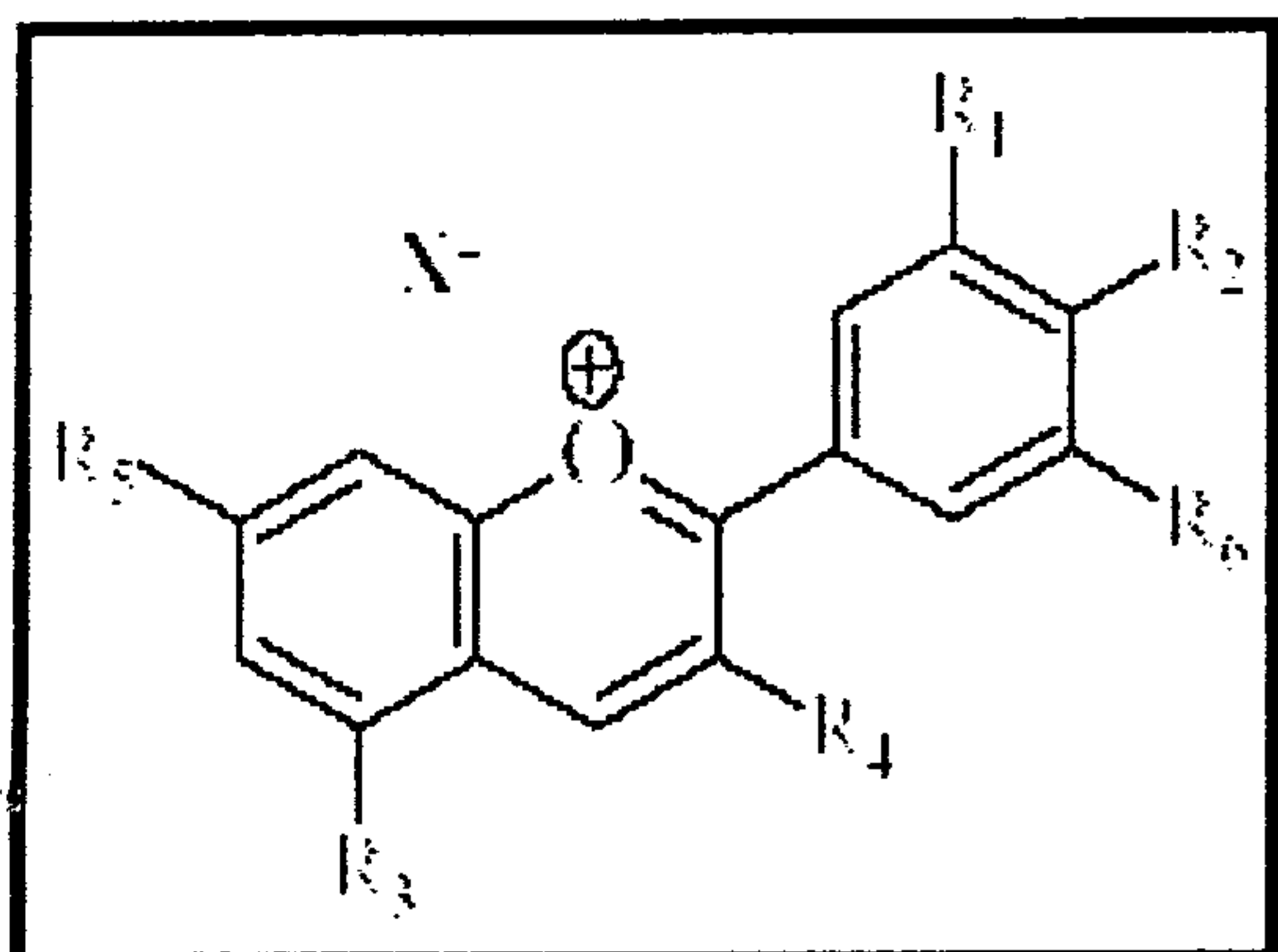


Figura XIII. No. 6. Varios ejemplos de diferentes clases de antocianinas naturales

NOMBRE TRIVIAL	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	FUENTE
Apigendina	-	OH	OH	-	OH	-	Rechsteineria
Luteolinidina	OH	OH	OH	-	OH	-	Rechsteineria
Pelargonidina	-	OH	OH	OH	OH	-	Pelargonium
Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	-	Centurea
Peonidina	OMe	OH	OH	OH	OH	-	Paeonia
Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Delphinium
Petunidina	OMe	OH	OH	OH	OH	OH	Petunia
Malvidina	OMe	OH	OMe	OH	OH	OMe	Malva

Tabla XIII. No. 2. Ejemplos de diferentes clases de antocianinas naturales y algunas de las fuentes vegetales más conocidas.

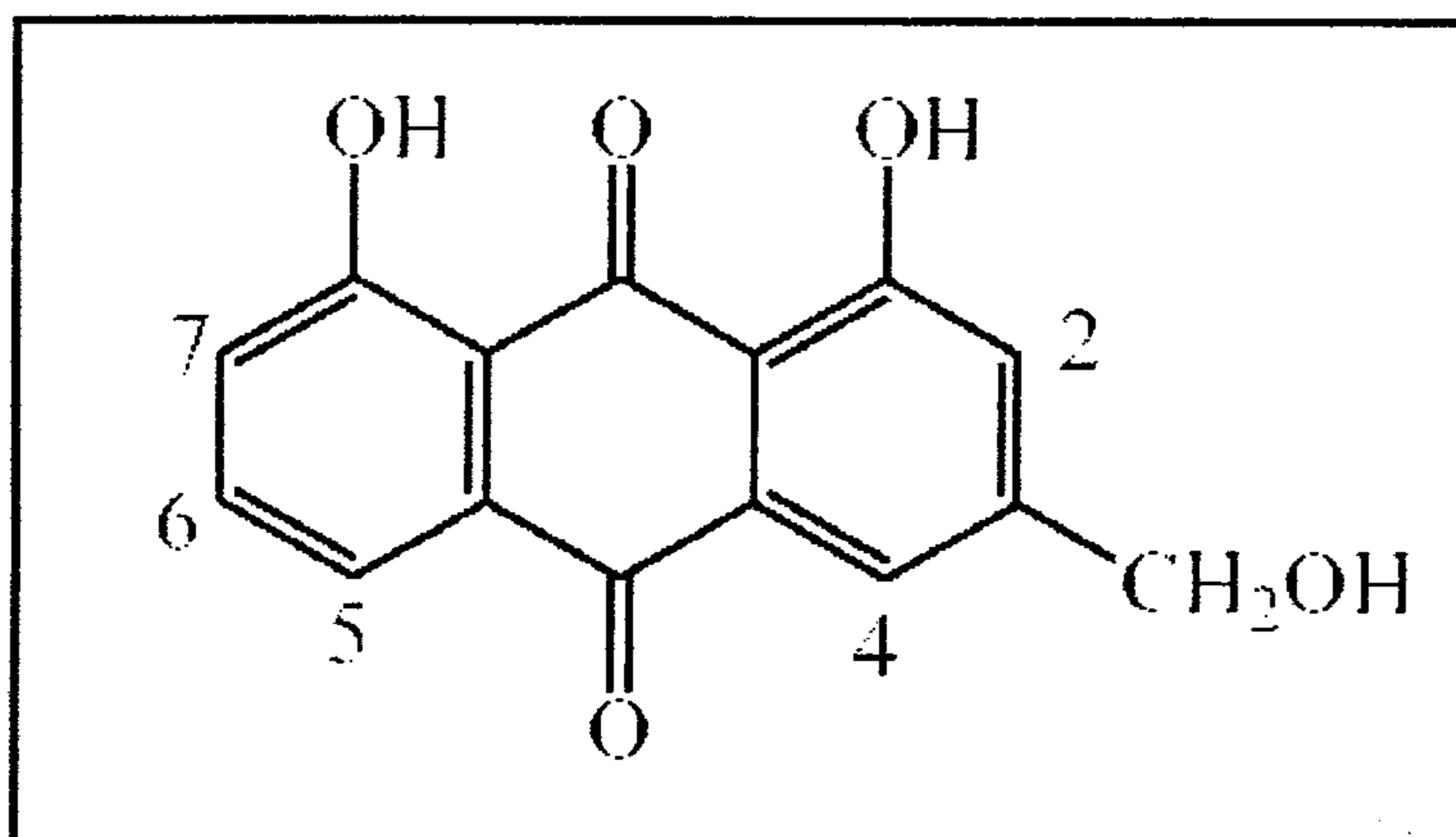


Figura XIII. No 7. Estructura básica de la familia de las Antraquinonas

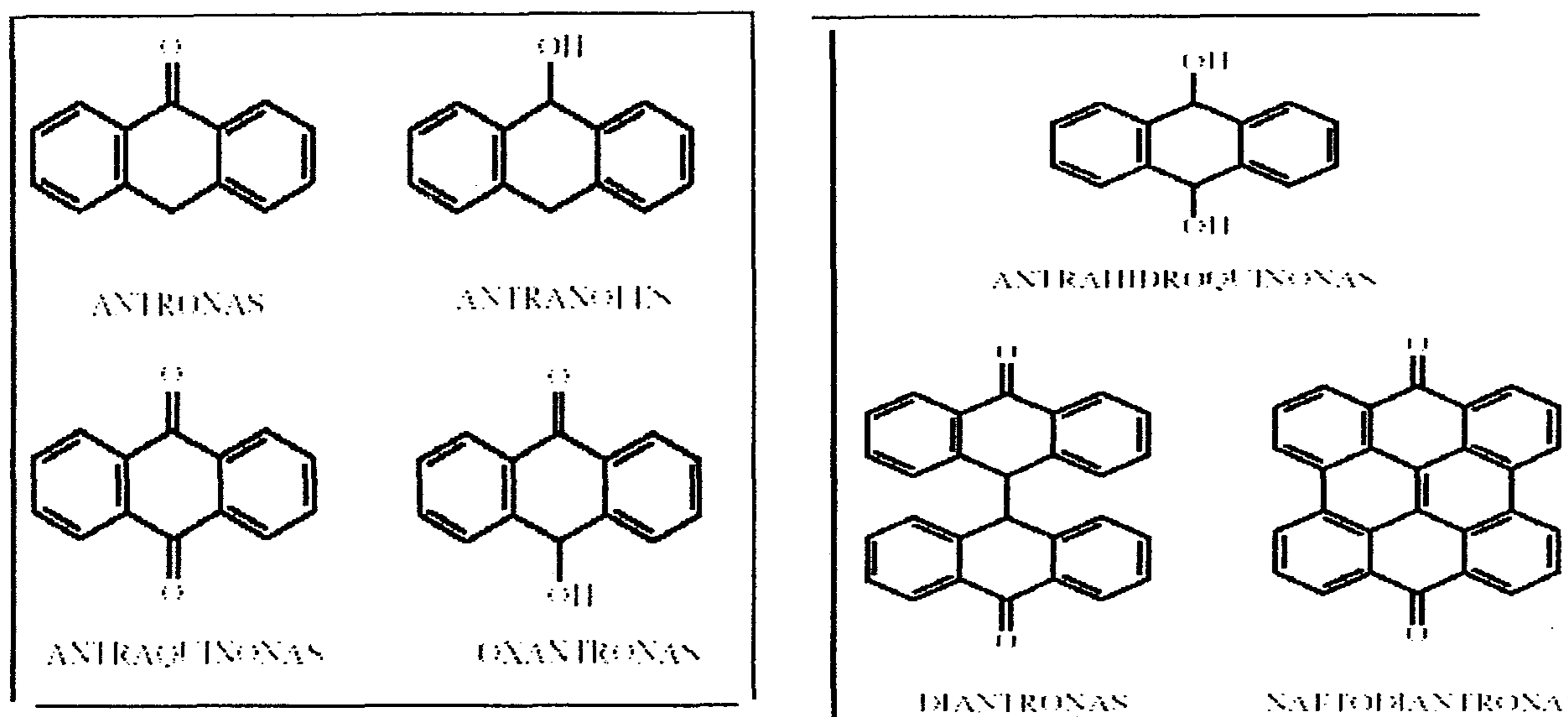


Figura XIII. No 8. Núcleos básicos de compuestos antracénicos

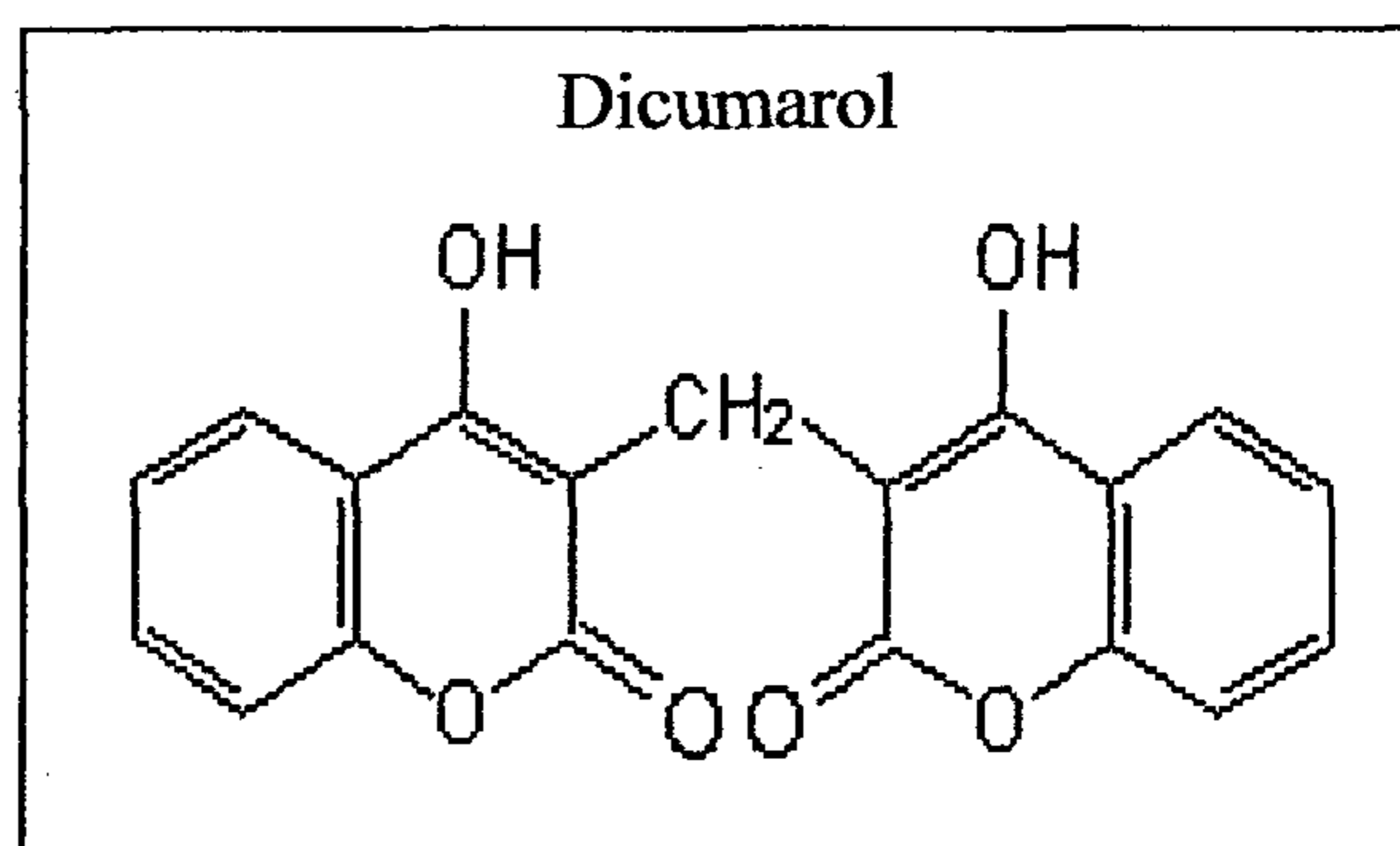
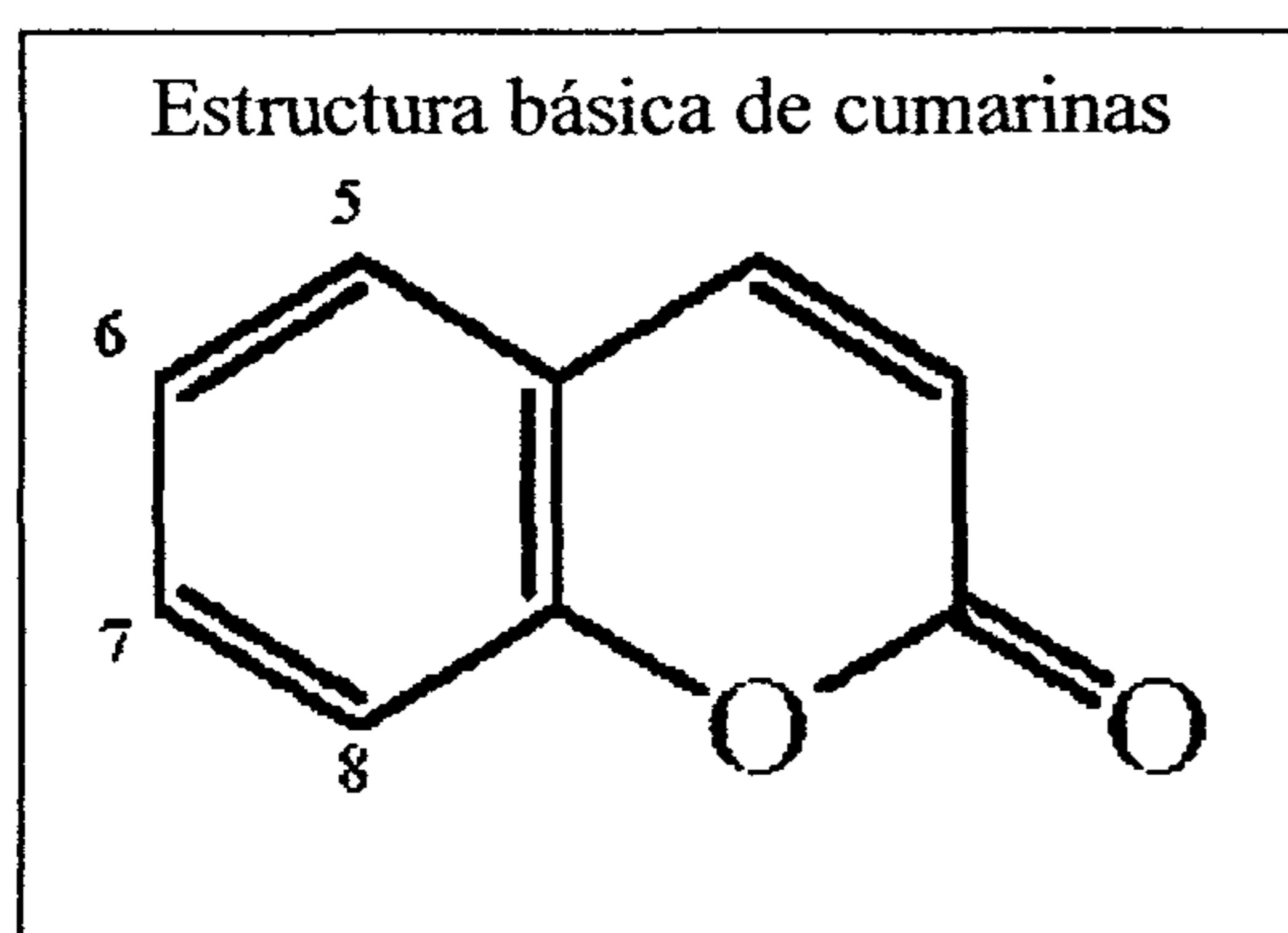


Figura XIII. No 9. Estructuras Químicas de algunos miembros de la familia de las Cumarinas.

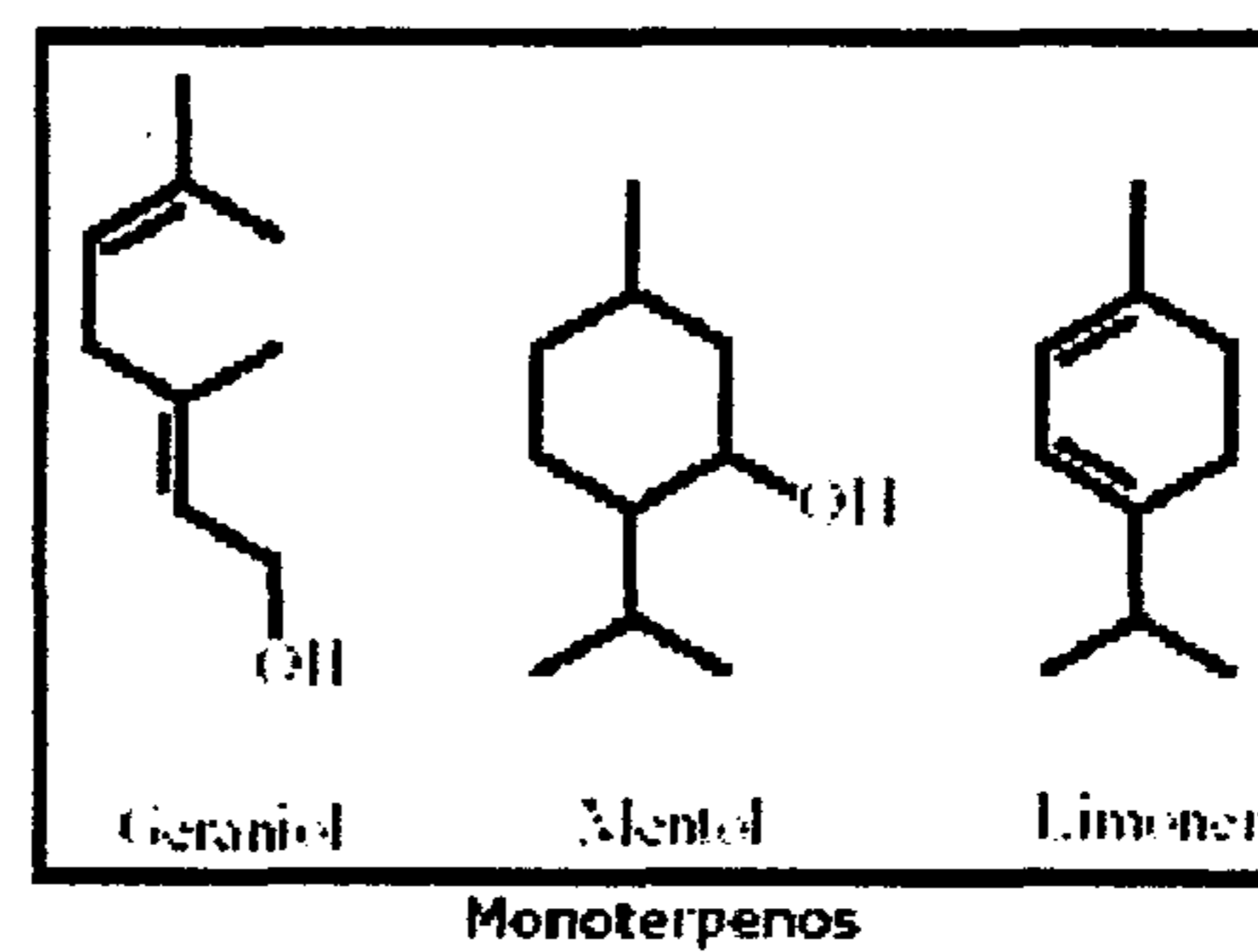
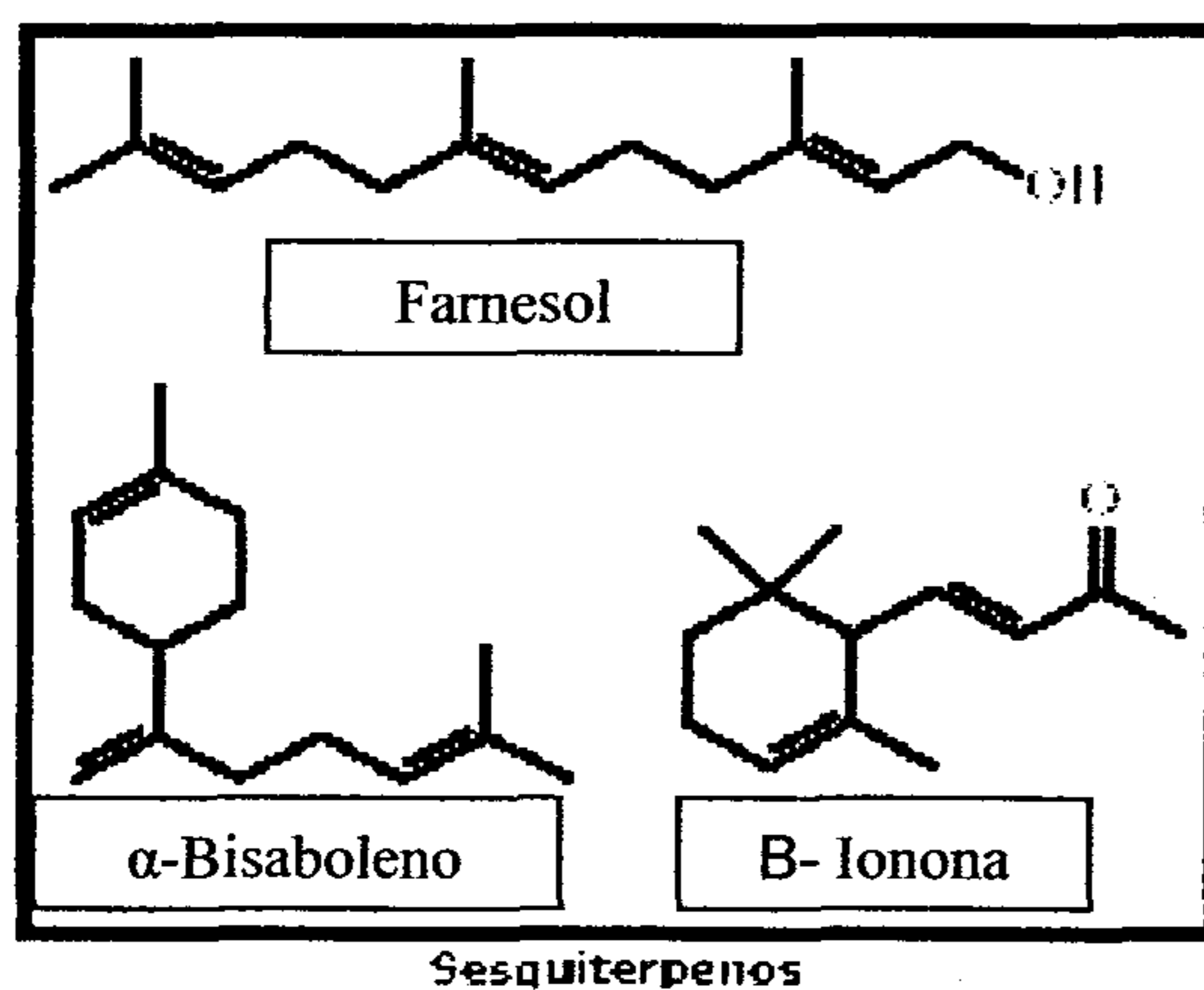


Figura XIII. No. 10 Estructuras Químicas de algunos miembros de la familia de monoterpenos y sesquiterpenos contenidos en los Aceites esenciales.

2. Componentes identificados en los aceites esenciales de Flores y fruto por Cromatografía de gases.

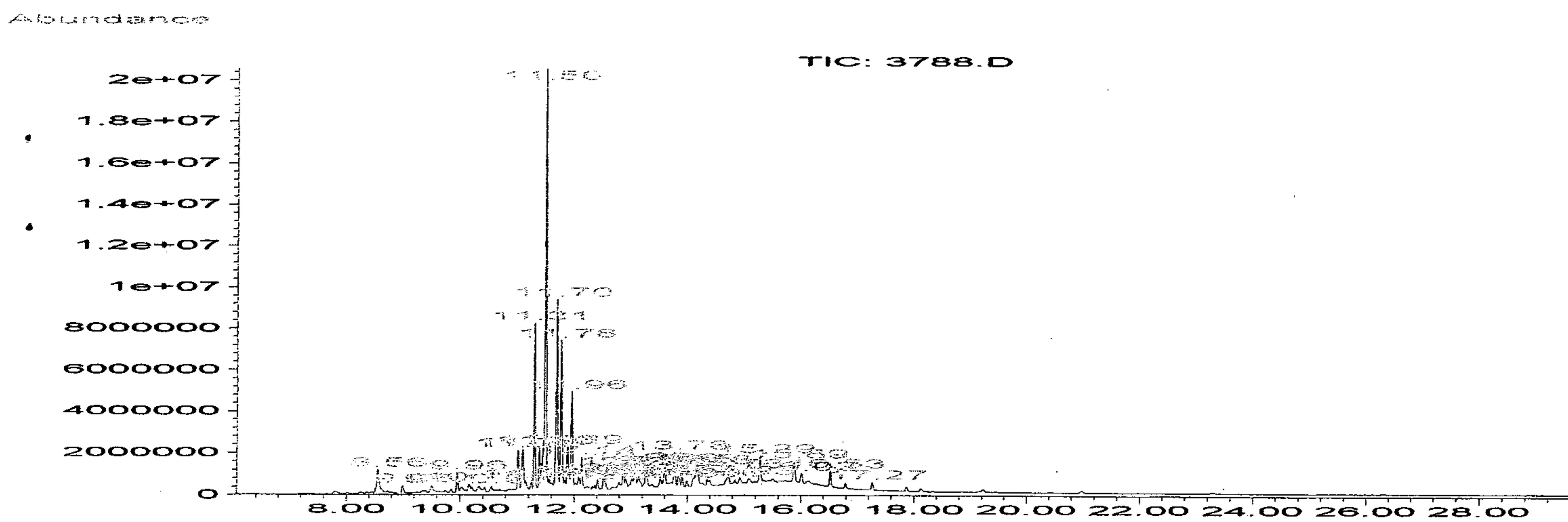
38	14.67	3.85	Ácido 1,2-bencendicarboxílico	160078	000084-74-2	96
39	14.73	2.80	Eicosano	163904	000000-00-0	95
45	15.28	5.78	n-Heneicosano	175419	000629-94-7	95
			Pentadecano	98339	000629-62-9	95
			Heptadecano	126473	000629-78-7	95
50	15.88	7.43	pentadecano	98339	000629-62-9	95
			Eicosano	163883	00001125-95-8	92
53	16.52	3.92	Tricosano	195915	000638-67-5	98
			Eicosano	163883	000112-95-8	97
			Nonadecano	151979	000629-92-5	95
54	17.26	1.52	Eicosano	163878	000112-95-8	92
			Tricosano	204913	001928-30-9	90
			Tetracosano	204919	000646-31-1	90
38	14.67	3.85	Ácido 1,2-bencendicarboxílico	160078	000084-74-2	96
39	14.73	2.80	Eicosano	163904	000000-00-0	95
45	15.28	5.78	n-Heneicosano	175419	000629-94-7	95
			Pentadecano	98339	000629-62-9	95
			Heptadecano	126473	000629-78-7	95
50	15.88	7.43	pentadecano	98339	000629-62-9	95
			Eicosano	163883	00001125-95-8	92
53	16.52	3.92	Tricosano	195915	000638-67-5	98
			Eicosano	163883	000112-95-8	97
			Nonadecano	151979	000629-92-5	95
54	17.26	1.52	Eicosano	163878	000112-95-8	92
			Tricosano	204913	001928-30-9	90
			Tetracosano	204919	000646-31-1	90

3. Componentes identificados en los aceites esenciales de Hojas y tallo por Cromatografía de gases.

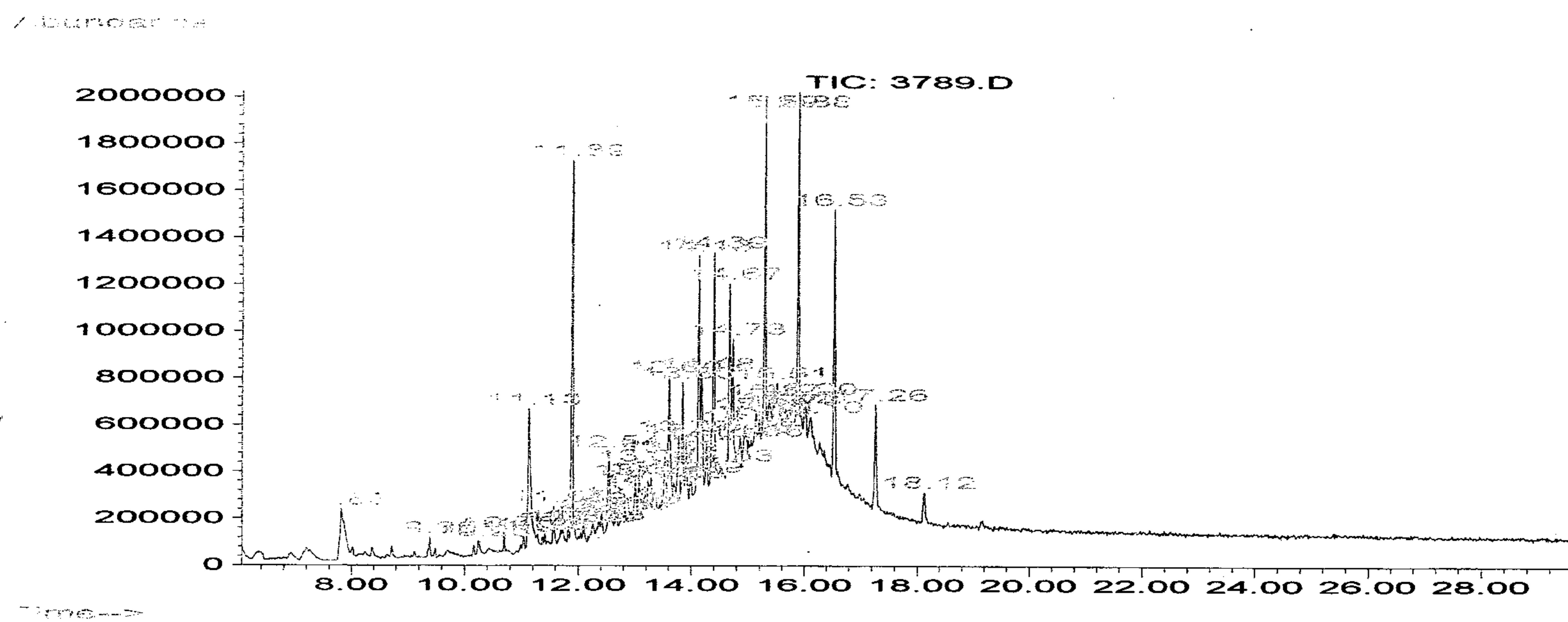
No de Pico	RT (Tiempo de Retención)	Área %	Compuesto identificado	# Ref.	Cas #	Certeza
39	14.18	3.18	Hexadecano	2353	000544-76-3	91
			Nonadecano	2363	000629-92-5	90
			Ciclohexanol	3797	000630-02-4	58

4. Cromatogramas del ensayo por cromatografía de gases

Hojas y tallo:



Flores y Fruto:



5. Preparación de los reactivos citados en el procedimiento

a) Reactivo de Wagner: (disolución de yodo en yoduro de potasio)

Disolver 1,27 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 5 ml de agua. Llevar la disolución a 100 ml con agua.

b) Reactivo de Mayer: (disolución de yoduro de mercurio y potasio)

a. Disolver 1.36 g cloruro de plata en 60 ml de agua destilada

b. Disolver 5 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua destilada

Mezclar y diluir a 100 ml.

c) Reactivo de Dragendorff.

Disolución a: Disolver 1.7 g de nitrato de bismuto(III) y 20 g de ácido tartárico en 80 ml de agua.

Disolución b: Disolver 16 g de yoduro de potasio en 40 ml de agua.

Disolución stock: Mezclar partes iguales de a y b. Si se refrigera la disolución stock es estable por varios meses.

Disolución spray: disolver 10 g de ácido tartárico en 50 ml de agua, agregar 10 ml de disolución stock.

d) Reactivo de Baljet.

a. Disolver 1 g de ácido picrico en etanol al 95% v/v

b. Disolver 10 g de Hidróxido de Sodio /100 ml H₂O.

Reactivo: Mezclar partes iguales de a y b

e) Reactivo de Kedde.

a. Disolver ácido 3,5-dinitrobenzoico al 3% en metanol

b.- Disolver Hidróxido de potasio 5.7% en agua.

Reactivo: mezclar volúmenes iguales de a y b.

f) Reactivo de Raymond-Marthoud.

Disolver 1 g de m-dinitrobenceno en etanol y aforar 100 ml.

g) Reactivo de Liebermann-Burchard.

Medir 5 ml de anhídrido acético y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Agregar cuidadosamente a 50 ml de etanol absoluto, mientras se enfría en baño de hielo. El reactivo debe estar recién preparado.

Para reacción en tubo: 10 ml de anhídrido acético mas 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

h) Reactivo de Salkowski.

a. Medir 20 ml de Cloruro Férrico (FeCl₃ * 6 H₂O al 5% p/v H₂O)

b. Medir 57.45 ml de agua destilada

c. Medir 22.55 ml de Ácido Sulfúrico concentrado (36 N)

Mezclar a b y c en un baño con hielo para evitar el aumento de la temperatura.

i) Reactivo citrobórico.

5 g de ácido bórico, 5 g de ácido cítrico y aforar a 100 ml con etanol.

j) Reactivo tricloruro de antimonio.(SbCl₃).

Disolución al 20% p/v de tricloruro de antimonio en cloroformo

k) Solución de cloruro férrico.

Disolución al 10% p/v de cloruro férrico en agua destilada.

l) Reactivo de gelatina:

Disolución al 1% p/v de gelatina en agua destilada.

m) Reactivo gelatina-sal.

1 g de gelatina, 10 g de cloruro de sodio y agua destilada aforar a 100 ml.

n) Disolución salina.

Al 10% de cloruro de sodio en agua destilada.

o) Reactivo Vainillina-ácido sulfúrico.

Disolución I. ácido sulfúrico al 5% en etanol

Disolución II. Vainillina al 1 % p/v en etanol.

Se asperjan los cromatofolios con la disolución I luego con la disolución II, se calienta a 110°C por 5-10 min.

p) Reactivo de Bornträger.

Disolución de Hidróxido de sodio al 5% en agua destilada.

q) Disolución de Prueba de amonio:

Disolución de amoniaco al 10% v /v en agua destilada.

r) Reactivo de Keller- Killiani:

A 10 mL de ácido acético glacial agregar 1 gota de cloruro férrico al 5% p /v en metanol y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado

s) Reactivo de Komarowsky

Disolución a: Ácido sulfúrico al 50% p /v

Disolución b: Disolución de 4-hidroxibenzaldehído 2% p /v en metanol

Poco antes de su uso se mezclan 5 mL de a con 50 mL de b.

6. Fotografías de la especie en estudio *Garrya corvorum*



Imagen XIII. No 1. Rama con brotes florales Femeninas.

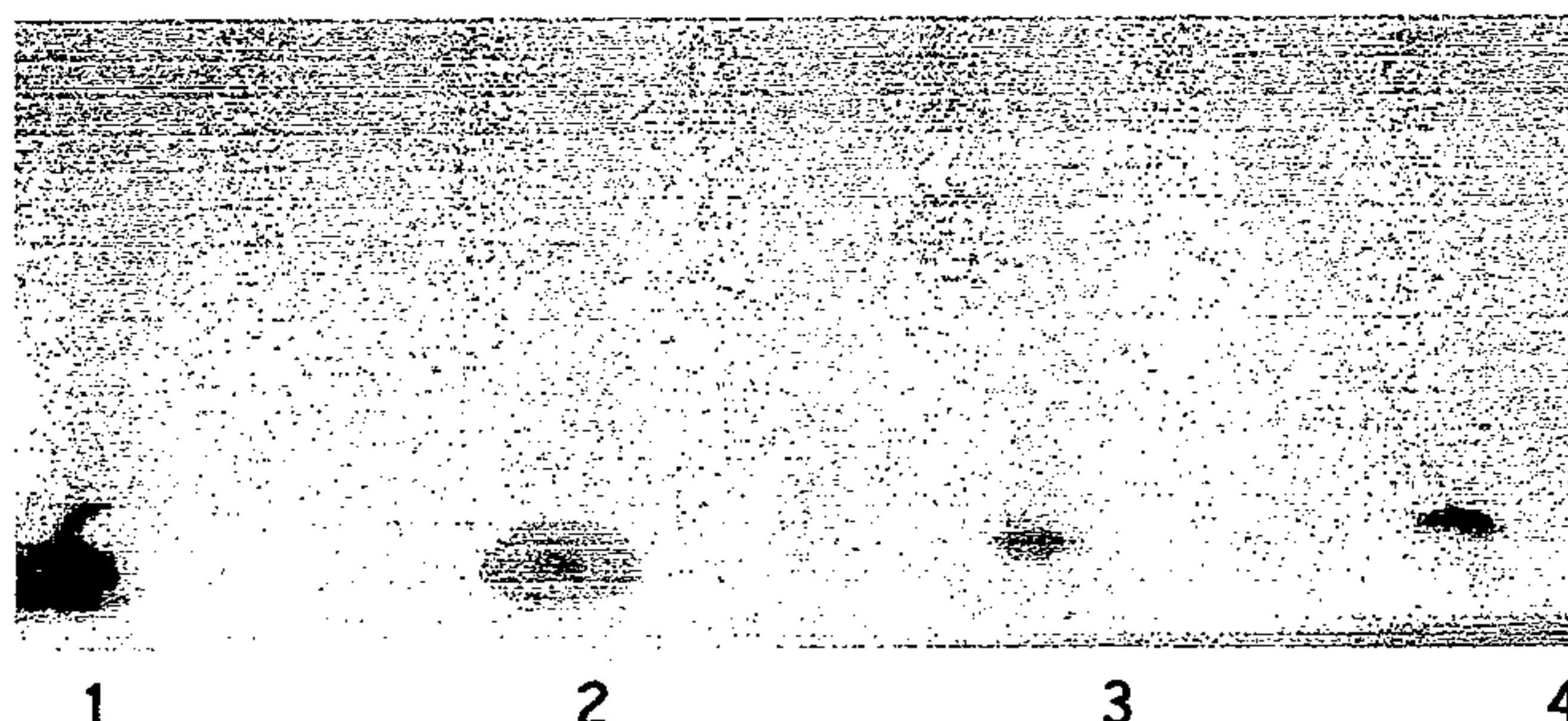


Imagen XIII No 2. Imagen tomada del espécimen de M. Véliz.6143 (Herbario BIGU).

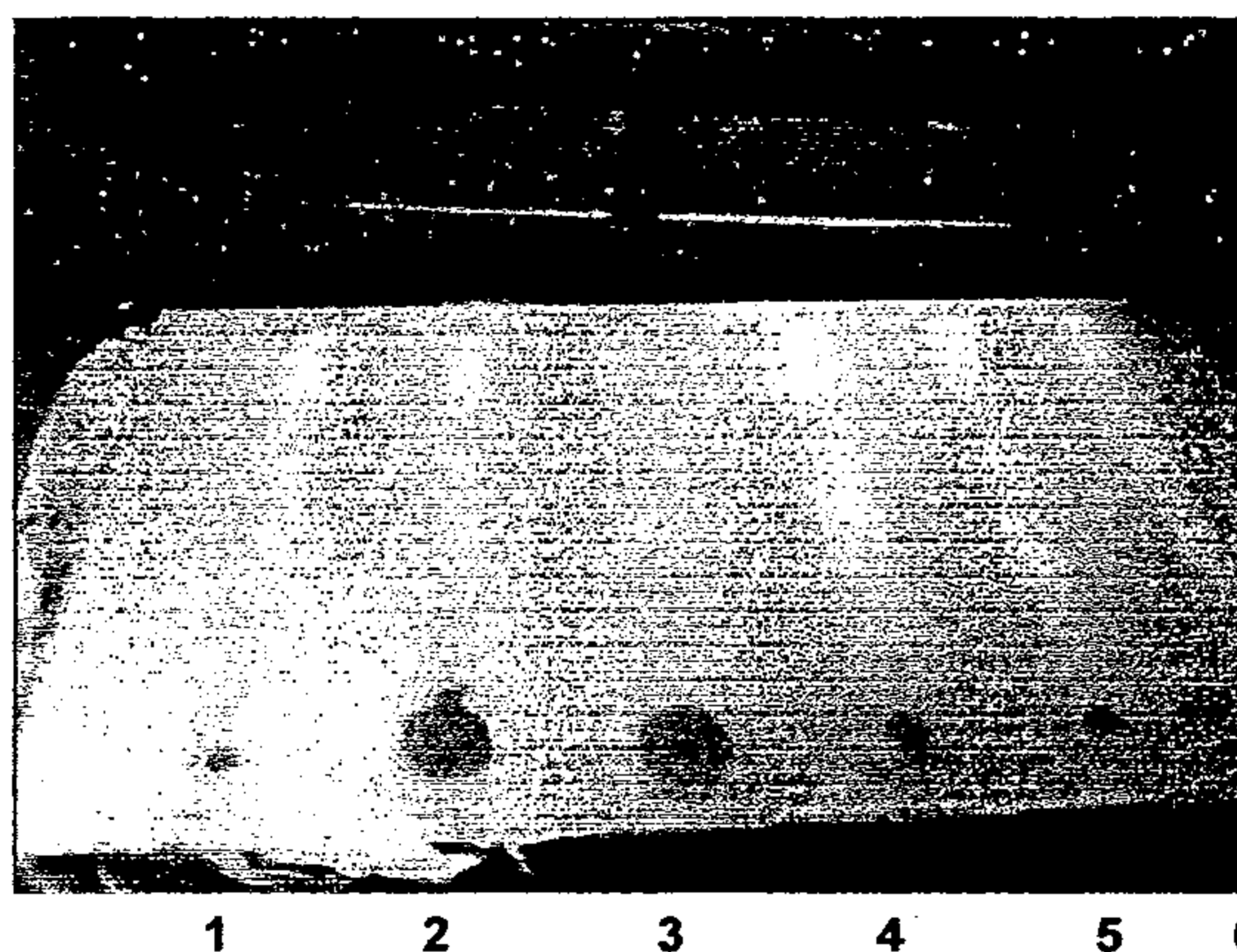


Imagen XIII No 3. Rama Estéril de *Garrya corvorum*

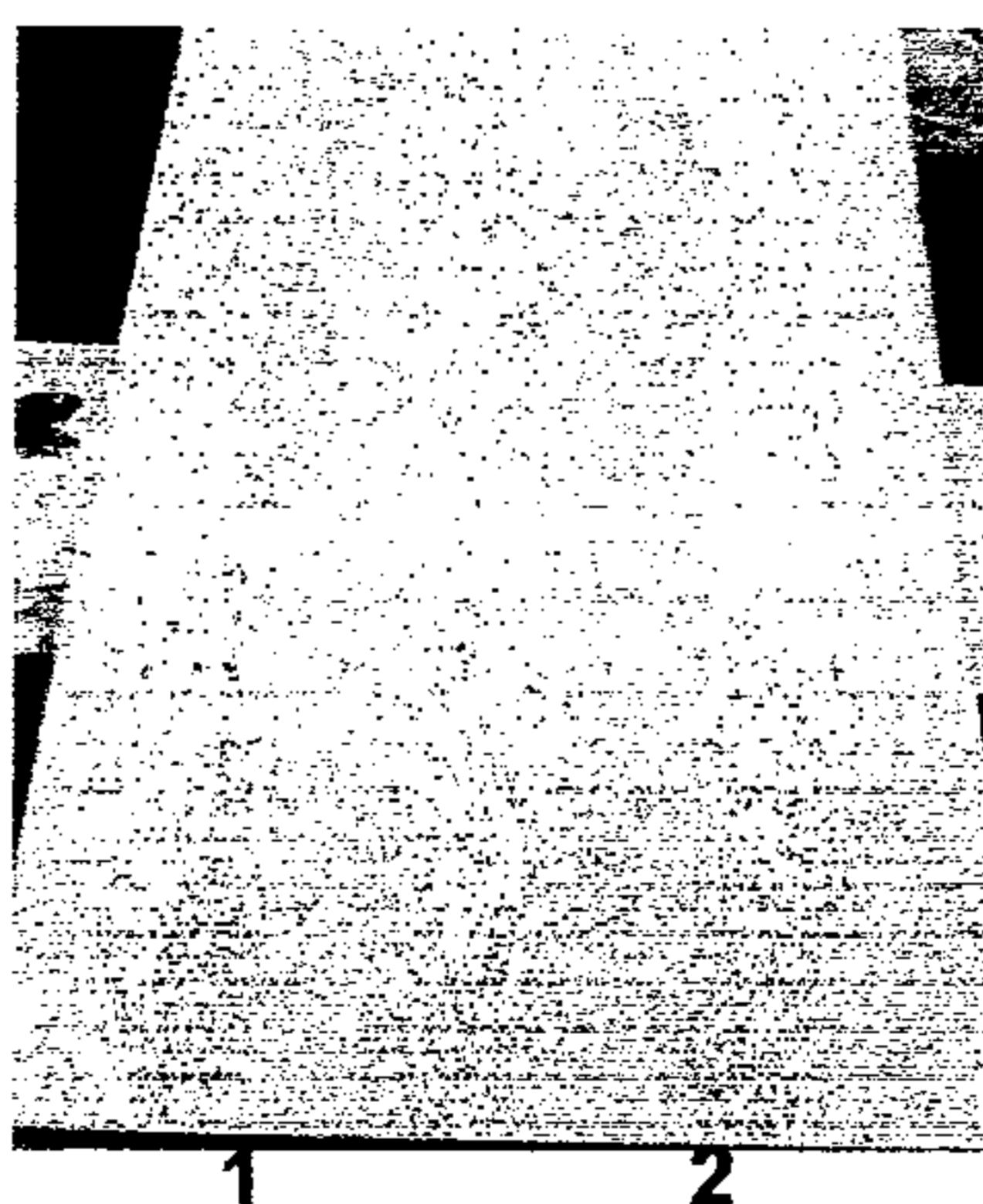
6. Fotografías de Cromatografía en capa fina de algunas familias de metabolitos Secundarios.



Cromatoplaça de alcaloides: El numero 1 corresponde al estándar de atropina y el numero 2 corresponde al estándar de papaverina; el numero 3 es la muestra de flores y fruto y el numero 4 corresponde a la muestra de hojas y tallos. La cromatoplaça fue colocada verticalmente con las muestras y estándares en la cámara previamente saturada con la fase móvil (cloroformo: dietilamina (90:10)), el tiempo de elución es de aproximadamente 45 minutos, se evaporo el eluente y se detecto con luz UV y luz Visible.



Cromatoplaça del ensayo de flavonoides y antocianinas: El numero 1, 2, 3, y cuatro corresponden a los estándares de quercetina, rutina, ácido clongénico y ácido cafeico respectivamente; el numero 5 es la muestra de flores y fruto y el numero 6 corresponde a la muestra de hojas y tallos. La cromatoplaça fue colocada verticalmente con las muestras y estándares en la cámara previamente saturada con la fase móvil (n-butanol: ácido acético: agua (40:10:50)), el tiempo de elución es de aproximadamente 120 minutos, se evaporo el eluente y se detecto con luz UV y luz Visible.



Cromatoplaça del ensayo de cumarinas: El numero 1 corresponde a el estándar de canela; el numero 2 es la muestra de flores y fruto. La cromatoplaça fue colocada verticalmente con la muestra y estándar en la cámara previamente saturada con la fase móvil (tolueno: acetato de etilo (93:7)), el tiempo de elución es de aproximadamente 25 minutos, se evaporo el eluente y se detecto con luz UV y luz Visible.

8. Glosario

Ácidos biliares: son ácidos derivados estructurales del ácido colánico, de 24 átomos de C, que se caracteriza por tener en el C17 una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono.(28)

Alergizante: son sustancias que provocan alergias. (29)

Anillo aromático: son estructuras cíclicas conjugadas que cumplen la Regla de Hückel, es decir, que tienen un total de $4n+2$ electrones π en el anillo. Para que se dé la aromaticidad, deben cumplirse ciertas premisas, por ejemplo que los dobles enlaces resonantes de la molécula estén conjugados y que se den al menos dos formas resonantes equivalentes. La estabilidad excepcional de estos compuestos y la explicación de la regla de Hückel han sido explicadas cuánticamente, mediante el modelo de "partícula en un anillo". (28)

Antibióticos: es un medicamento que se utiliza para tratar una infección bacteriana, y que por su efecto, mata o impide el crecimiento de ciertas clases de bacterias, pero que normalmente es inofensivo para el huésped (aunque ocasionalmente puede producirse una reacción adversa a medicamento o puede afectar a la biota bacteriana normal del organismo).(29)

Antioxidante: son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales y enzimas, que bloquean el efecto dañino de los radicales libres. (28)

Carácter lacónico: son sustancias como protoanemonina que poseen la característica de irritar el aparato digestivo. (29)

Cromatografía en capa fina: es una técnica cromatográfica utilizada, entre otros posibles usos, para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla. Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser gel de sílice).(30)

Enfleurage: método para extraer aceites esenciales de compuestos vegetales. (1)

Emenagogas: son hierbas que cumplen la función de estimular o favorecer, la aparición de la menstruación. (13)

Especie endémica: es aquella que sólo existe en una zona geográfica determinada, de extensión variable, pero generalmente restringida en relación con el patrón geográfico de taxones con los que se compare.(13)

Estructura polifenólica: Sustancia que se encuentra en muchas plantas y le da su color a algunas flores, frutas y vegetales. Los polifenoles son antioxidantes. (28)

Extracto: Sustancia que, en forma concentrada, se extrae de otra, de la cual conserva sus propiedades. (12)

Fitoquímica metabolito secundario: método con el cual es posible aislar e identificar metabolitos secundarios en numerosas plantas. (1)

Fitoterapia: nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas (1)

Flora: Conjunto de plantas de una región geográfica y, por extensión, de una porción de tierra, mar, lago, de los depósitos de agua de las rosetas foliares de las bromeliáceas. De los intestinos del hombre o de los animales etc. (1)

Heterósidos: Son sustancias no reductoras que por hidrólisis ácida o enzimática dan uno o más azúcares y un componente no azucarado llamado aglicón o genina. (28)

Hidrólisis enzimática: descomposición (ruptura de enlaces) de enzimas a través de agua. (28)

Inhibición: paralizar el curso o función de algo. (10)

Polinización: es el proceso de transferencia del polen desde los estambres hasta el estigma o parte receptiva de las flores en las angiospermas, donde germina y fecunda los óvulos de la flor, haciendo posible la producción de semillas y frutos. (30)

Principios activos: la denominación común usual o científica del medicamento. (1)

Propiedades antitrombóticas: propiedades que poseen los flavonoides para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos. (29)

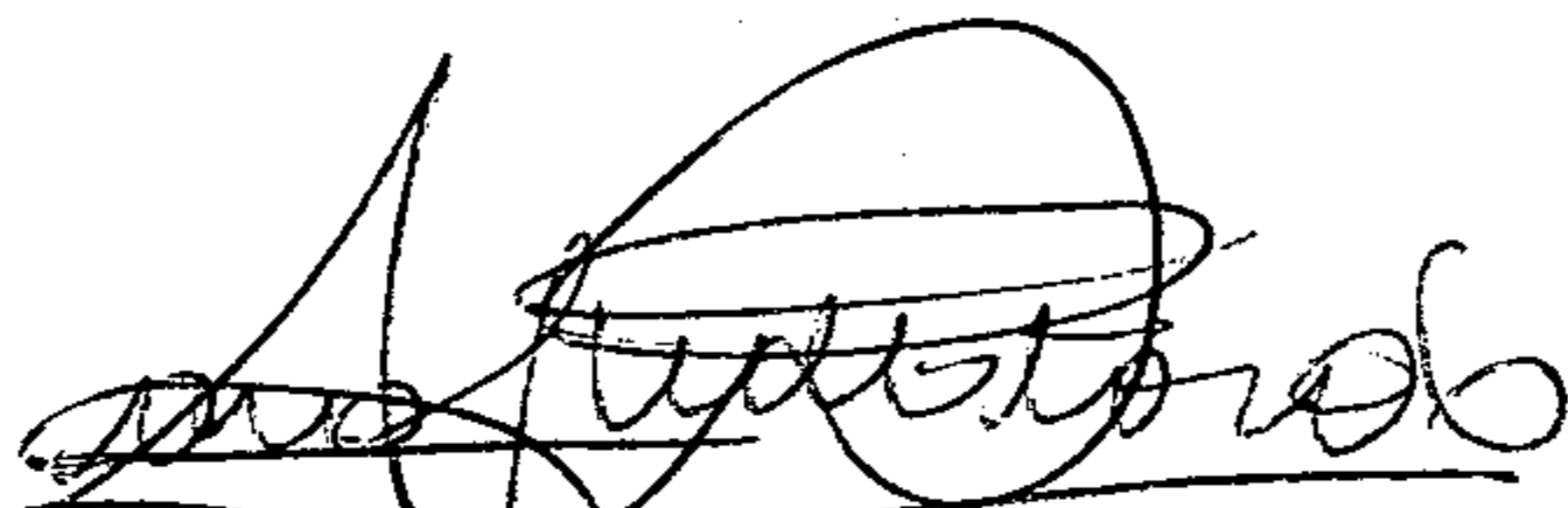
Quinonas: pigmentos orgánicos caracterizados por ciertas semejanzas estructurales que les proporcionan sus colores brillantes. (28)

Riscos: peña alta, abrupta y escarpada. (10)

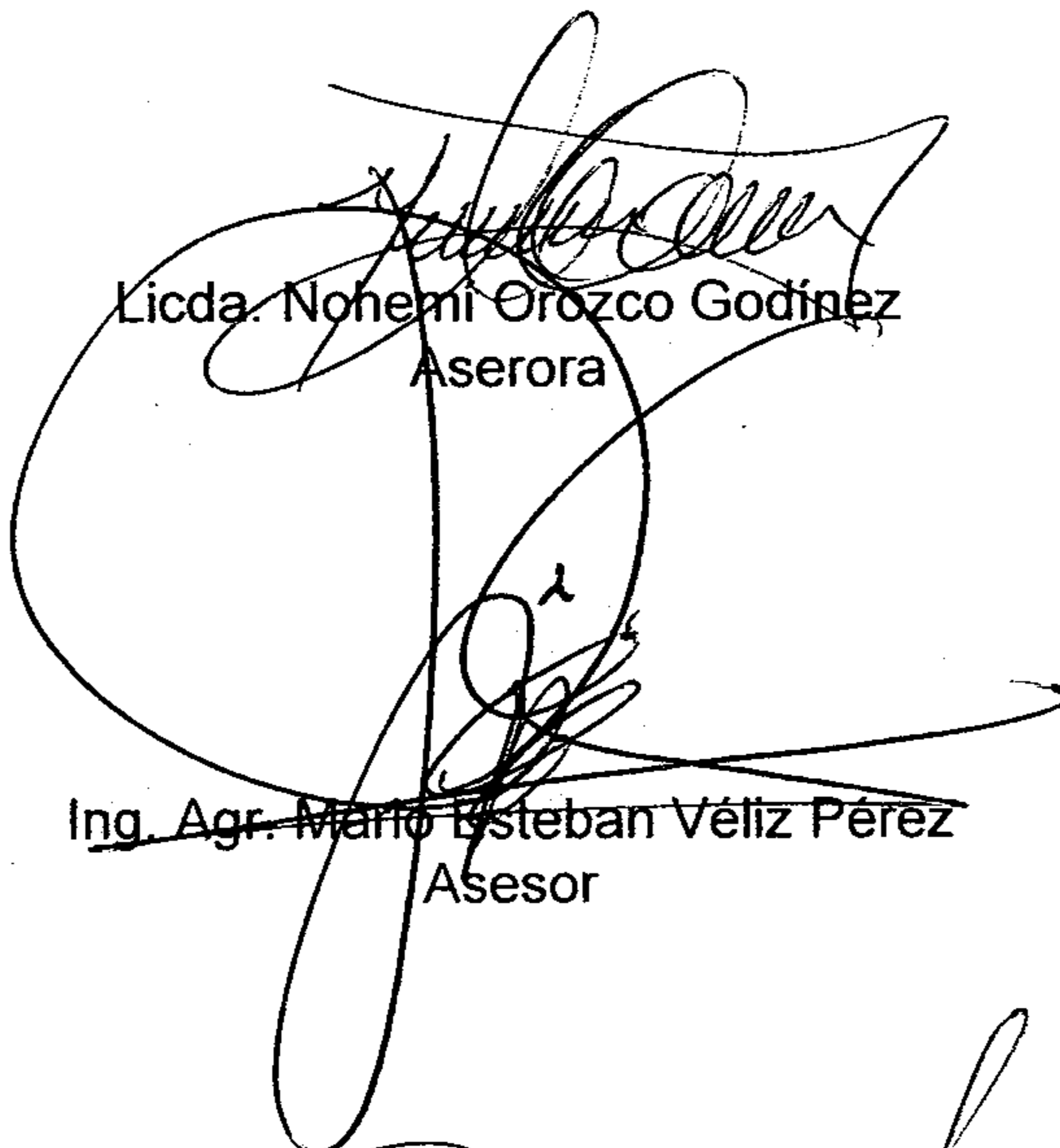
Sistema enzimático: esta constituida por una cadena o secuencia de enzimas destinadas a activar o a inhibir (cuando los productos de la reacción multienzimática son muchos) las 2 etapas del metabolismo celular (anabolismo + catabolismo). (29)

Sistema heterocíclico: son compuestos que presentan una gran diversidad de Actividades biológicas, pueden representar materia prima para el diseño y síntesis de nuevos materiales y dentro de sus estrategias sintéticas y propiedades químicas se resume el comportamiento general de la química orgánica, involucrando los mecanismos de reacción generales con particularidades especiales que llevan a la formación de heterociclos. (28)

Tamizaje fitoquímico: es un método utilizado para identificar los metabolitos secundarios presentes en extractos de una planta. (1)



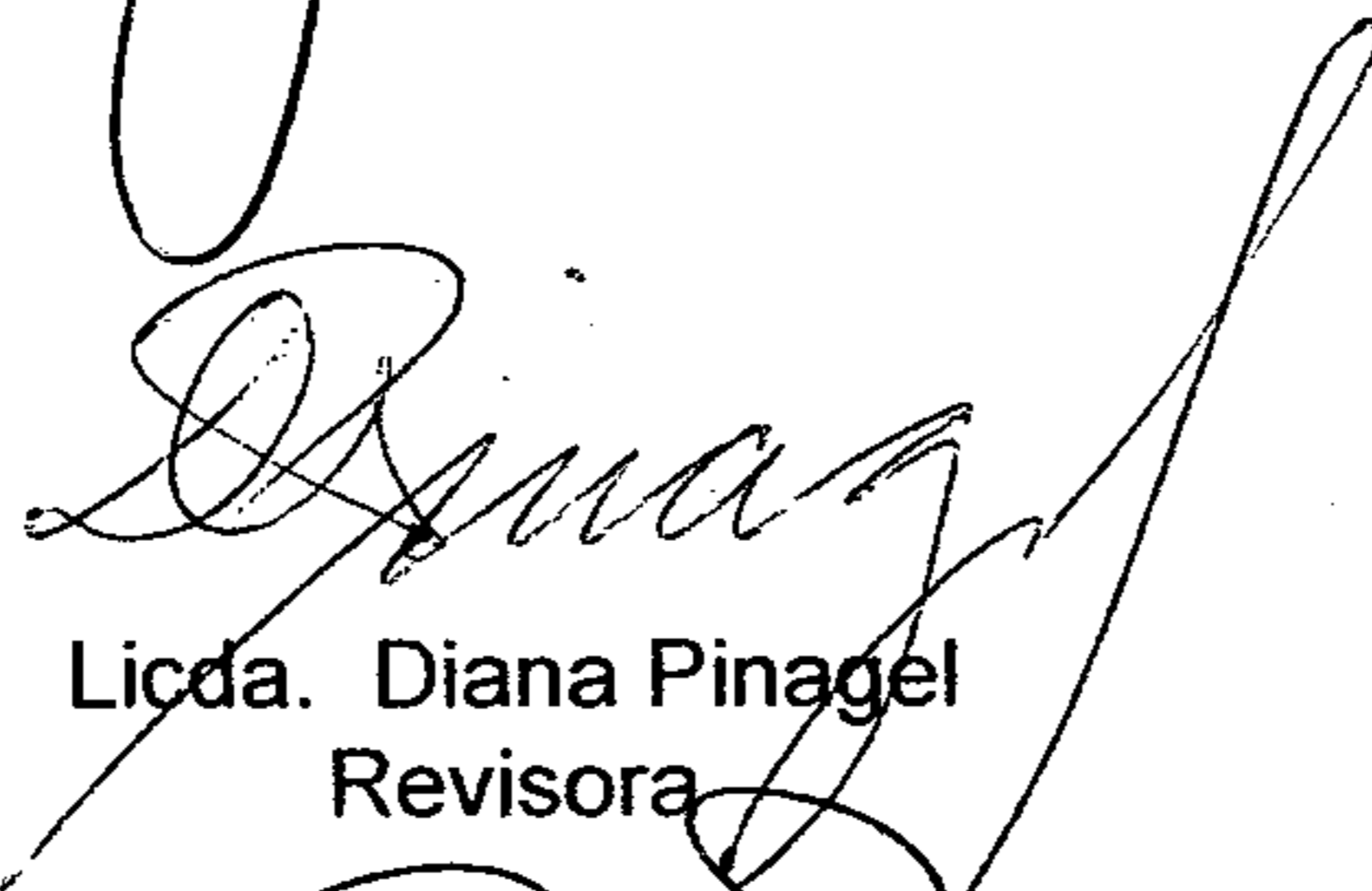
Carol Ivón Villatoro Castillo
Autora



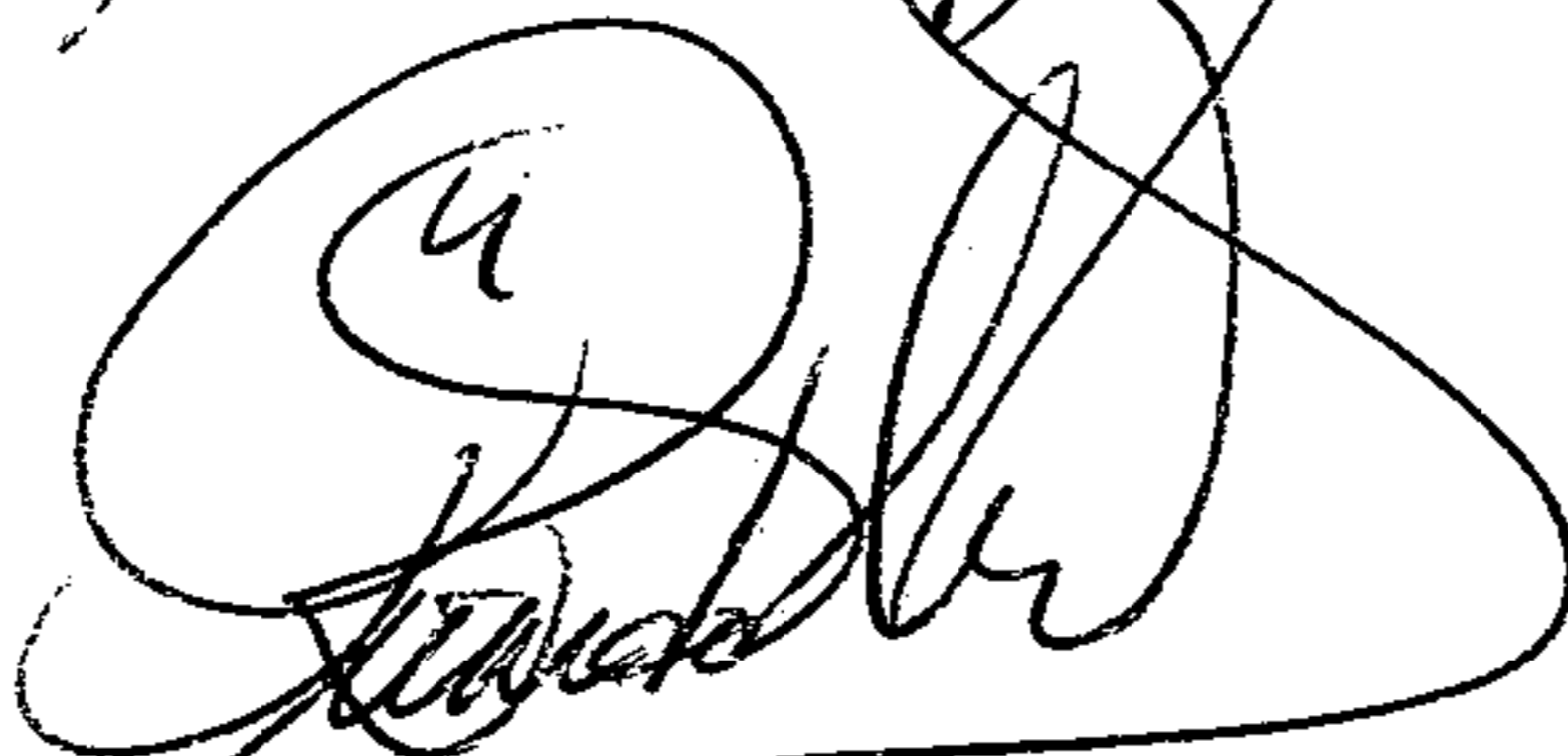
Licda. Nohemi Orozco Godínez
Aserora



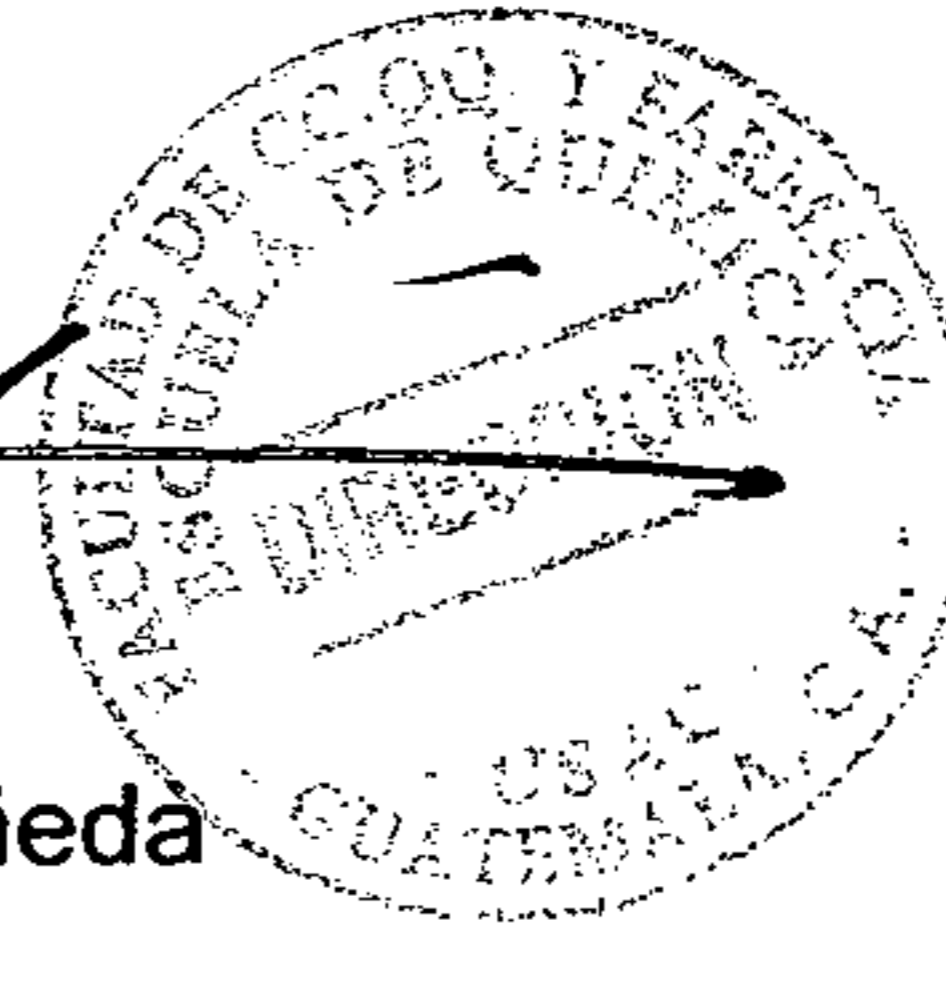
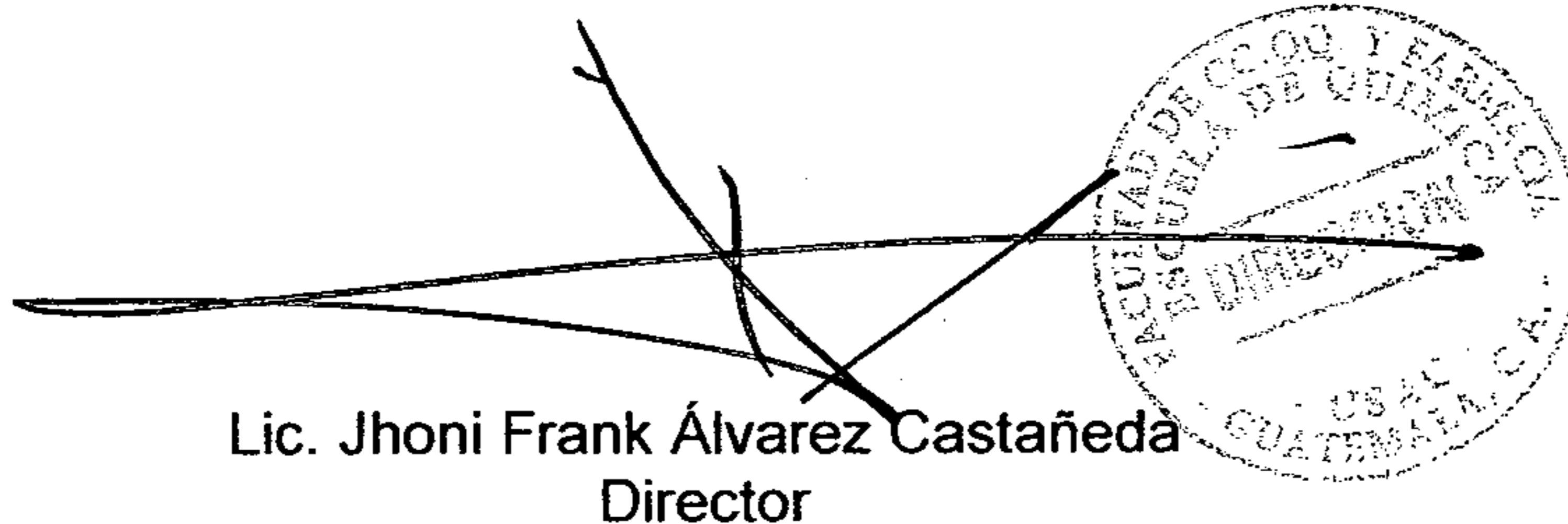
Ing. Agr. Mario Esteban Véliz Pérez
Asesor



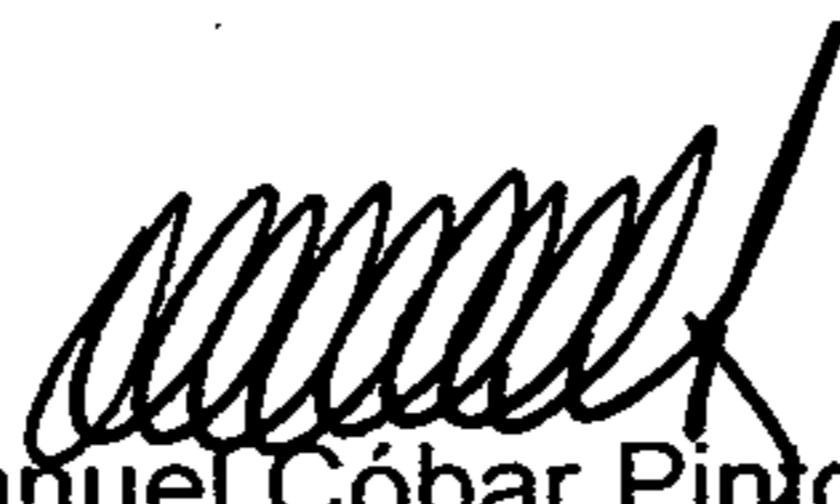
Licda. Diana Pinagel
Revisora



MSc. Felix Ricardo Véliz Fuentes
Revisor



Lic. Jhoni Frank Álvarez Castañeda
Director



Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph D
Decano