


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




**Aislamiento y elucidación estructural de
metabolitos secundarios mayoritarios del
extracto etanólico de las hojas de la especie
Perrottetia longistylis (Manteco, Capulaltapa) y
el tamizaje fitoquímico y evaluación de la
actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica
del extracto etanólico de las hojas de la especie
Euonymus enantiophylla (Alís, Rou'j Xiwáan)
Familia Celastraceae**

Carmen Teresa Garnica Marroquín

Química

Guatemala, junio del 2008

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



**Aislamiento y elucidación estructural de
metabolitos secundarios mayoritarios del
extracto etanólico de las hojas de la especie
Perrottetia longistylis (Manteco, Capulaltapa) y
el tamizaje fitoquímico y evaluación de la
actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica
del extracto etanólico de las hojas de la especie
Euonymus enantiophylla (Alís, Rou'j Xiwáan)
Familia Celastraceae**

Informe de tesis

Presentado por

Carmen Teresa Garnica Marroquín

Para optar al título de

Química

Guatemala, junio del 2008



Junta Directiva
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Licenciado Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Lillian Raquel Irving Antillón, M.A	Vocal I
Licenciada Liliana Vides	Vocal II
Licenciada Beatriz Eugenia Batres	Vocal III
Bachiller Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Bachiller José Juan Vega Pérez	Vocal V



Dedicatoria y Agradecimientos

Yo soy una parte de todo aquello que he encontrado en mi camino.

Alfred Tennyson

Dedicatoria

- ✿ A mis ángeles por ser mi razón de existir, por ser lo que me impulsa a ser mejor cada día y lo que me permite mantener la fe.*
- ✿ A Carmen Pineda Pinto por su ejemplo de fortaleza, humildad y ternura.*
- ✿ A Roberto Marroquín Monroy, mi querido abuelito, por su ejemplo de lucha, honradez y cariño.*
- ✿ A Lucía Miranda Flores, mi querida abuelita, por su ejemplo de lucha, fortaleza y perseverancia.*
- ✿ A José Domingo Garnica Nufío, mi querido abuelito, por su ejemplo, su cariño y sus enseñanzas; por ser el primero en enseñarme lo sabia que es la Madre Naturaleza.*
- ✿ A Rosaura Vanegas Marticorena, mi querida abuelita, por su ejemplo y porque aunque estemos lejos cada día me hace sentir desde la distancia todo su cariño y el orgullo que siente por mí.*
- ✿ Y muy especialmente a Julieta Roca de Pezzarossi, nuestra querida maestra y compañera, por enseñarnos no solamente química sino también que la vida es para disfrutarla. Por cuidarnos como solo una madre puede hacerlo, por sus regaños, su cariño, su dedicación, su entusiasmo, por su alegría y su sonrisa. Si existe vida después de ésta, se que la estará disfrutando, estará organizando grupos de “angelitas guías”, estará jalándole la oreja a mas de algún ángel que se esté portando mal. Sé que deben estar muy alegres donde está, porque seguro estará organizando fiestas en donde comen*



pastel de helado y les enseña a los demás ángeles a bailar reguetón.

Sé que desde donde está sigue cuidando con mucho amor a su familia y a las personas que tanto la queremos, Lic donde quiera que esté, no se olvide de nosotras que nosotras no nos olvidamos de usted, usted vive en nuestras mentes y en nuestros corazones. Gracias por Ser.



Agradecimientos del Trabajo de Tesis

- Se agradece la valiosa ayuda prestada por los Centros de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala: Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Cito-histología y Herbario BIGU, así como a todos sus investigadores e investigadoras.*
- Se agradece al Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” (IUBO) de la Universidad de La Laguna en Tenerife, España por todo el apoyo que me brindaron, por abrirme las puertas y por hacerme sentir como una más del Laboratorio.*
- A la Licenciada Ana Lucrecia Gómez y Licenciada Andrea Molina por su cariño, por su amistad y por toda la ayuda que me brindaron cuando más lo necesitaba.*
- Al Licenciado Pedro Pardo, al Guardarecursos Marcos Porón, y al Ingeniero Agrónomo Mario Véliz por compartirme sus conocimientos de Botánica y por su invaluable colaboración para la colecta de las plantas de estudio.*
- A mis asesores y consultores Doctor Óscar Manuel Cobar Pinto, Doctora Doña Isabel López Bazzocchi, Doctor Don Ignacio Antonio Jiménez, Doctor Marvin Núñez, Licenciada Isabel Gaitán, Ingeniero Agrónomo Mario Véliz, Licenciada Patricia Navas y Doctor Luis Hugo Santa Cruz por permitirme aprender de ellos, por llevarme de la mano y guiarme y por dejarme cometer mis propios errores.*



Agradecimientos Especiales

- ✿ *A Brenda Asunción y Juan Francisco (mi madre y mi padre) por su cariño, por su apoyo durante todos estos años de formación, por todos los esfuerzos que han hecho para que yo pueda salir adelante y por su paciencia a pesar de haberme tardado más de lo planeado.*
- ✿ *A Roberto José, Francis Lucía; María Fernanda y María Luísa por su cariño, su apoyo, su paciencia y comprensión, por soportar en las buenas y en las malas.*
- ✿ *A toda mi gran familia por su apoyo, su cariño, comprensión y paciencia.*
- ✿ *A mis amigas desde la infancia, en especial a Betsabé Santos, Claudia López, Denisse Farrington, Glenda Pérez, Magnolia Chang, Margoth Ibarra, Marilyn Machuca, Sonia Calderón y Sonia Saenz por todo su cariño y su amistad, por todos estos años que hemos compartido, por las risas, los llantos, las picardías y porque cada vez que nos vemos es como si no hubiera pasado un solo día.*
- ✿ *A mi maestra de Química Rebeca Arriola por sus enseñanzas, por ser la persona que me introdujo en los maravillosos misterios que encierra la Madre Naturaleza. Gracias por ayudarme a alimentar mi pasión.*
- ✿ *Al Instituto Experimental de la Asunción por ayudar a hacer de mí una mujer de temple transformadora de la sociedad. A las religiosas de la Congregación de la Asunción, a mis maestras y maestros por contribuir en mi formación y por todo su cariño en especial a esas maestras que nunca se olvidan: Magaly, Pamela, Julia, Estephany, Paty, Cinthya, Marco Tulio, Carlos, Alicia, Norma, Joaquí, Becky, Odessa, Rosa Ana y Flor. Vaya a donde vaya siempre me acompaña una parte de*



ustedes: todos los conocimientos que me ayudaron a descubrir. Muchas gracias. Asunción Siempre.

- ✿ A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, a mis maestras y maestros por ayudarme en mi camino hacia el conocimiento de los misterios de la Madre Naturaleza.*
- ✿ Al Departamento de Química General de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por permitirme formar parte de su gran familia, por su amistad y cariño, por todos los hermosos momentos que pase junto a ustedes; los atesoro y los llevo en el corazón.*
- ✿ A mis alumnos y alumnas por permitirme realizar una versión “avanzada” de mi sueño de ser maestra de párvulos, gracias por su cariño y por dejarme transmitirles mis conocimientos y en especial por permitirme aprender de ustedes.*
- ✿ Al mi tutor y mentor Doctor Óscar Manuel Cobar Pinto por todo su cariño, por sus enseñanzas y su paciencia, y por ese momento mágico en el que en un segundo pude por fin comprender los misterios de la Química Orgánica.*
- ✿ A María Susana Hermes, Ana Lidia Cabrera e Isabel Gaitán por su amistad, por su cariño y sus cuidados, por estar siempre pendientes de mí, por quererme como soy y a pesar de como soy.*
- ✿ A Catalina, Esmeralda y Arturo por todos los momentos que hemos compartido, por sus consejos, su apoyo, su amistad y cariño.*
- ✿ A mis “pollitos” Andrea, Jacobo, María Alejandra, Mariele, Evelyn, Claudia, Patricia, Jorge, Liselli, Paola, Elena, Manuel y Rosa Alicia por permitirme que los cuide y por cuidarme, por quererme como soy, por su cariño, por todos los momentos que hemos compartido, por las risas, los llantos, las estudiadas, las*



salidas, los consejos, las tertulias, los brindis y sobre todo por su amistad.

- ✿ A toda mi gente de Tenerife por abrirme sus puertas y su corazón, por todo su cariño, por los regaños para que no trabajara tanto, por hacerme sentir una más del Laboratorio y por hacerme sentir mejor que en mi propia tierra.*
- ✿ A todas aquellas personas que me han sabido retar y me han puesto al borde del abismo, porque gracias a ellas he debido sacar lo mejor de mí.*
- ✿ A todas las científicas y los científicos que han dedicado su esfuerzo y su vida para enriquecer los conocimientos sobre la Madre Naturaleza. Gracias por Ser.*
- ✿ A todas aquellas personas que han pasado por mi vida y me han dejado pasar por la de ellas, a todas las personas que están y que estarán. Gracias por Ser.*



In memoriam

Roberto Marroquín Monroy

José Domingo Garnica Nufío

Profesora Julieta Roca de Pezzarossi

*Hay almas que uno tiene ganas de asomarse a ellas,
como a una ventana llena de sol*

Federico García Lorca



Índice General

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
A.	La Familia Celastraceae	5
1.	Consideraciones Taxonómicas	5
2.	Usos Etnobotánicos de las Celastráceas	6
3.	Metabolitos Secundarios Aislados	11
4.	Géneros más representativos	16
5.	Especies de Estudio	19
5.1	<i>Perrottetia longistylis</i> (Manteco, Capulaltapa)	19
5.2	<i>Euonymus enantiophylla</i> (Alís, Rou'j Xiwáan)	21
IV.	Justificaciones	23
V.	Objetivos	25
VI.	Hipótesis	27
VII.	Materiales y Métodos	29
A.	Universo	29
B.	Muestra	29
C.	Medios	30
1.	Recursos Humanos	30
2.	Recursos Materiales	30
D.	Métodos	35
E.	Diseño Estadístico	58
VIII.	Resultados	61
IX.	Discusión de Resultados	75
X.	Conclusiones	105
XI.	Recomendaciones	107
XII.	Referencias	109
XIII.	Anexos	113



I. Resumen

La familia Celastraceae cuenta con numerosas investigaciones previas que respaldan el uso de estas plantas como potenciales agentes terapéuticos, ya que un gran número de especies de esta familia son mundialmente conocidas por su uso en la medicina tradicional o en la agricultura, especialmente en Asia y Europa. Según dichos estudios las especies de esta familia producen una gran variedad de metabolitos secundarios interesantes, tanto desde el punto de vista químico, por su novedad estructural, como desde el punto de vista farmacológico, dada la amplia gama de actividades biológicas que presentan. Entre los metabolitos aislados destacan los triterpenoides, fenilalquilaminas, maytenosinoides, terpenoides y glicósidos cardiotónicos, metabolitos que presentan una amplia gama de actividades biológicas. Fue por ello que en esta investigación se estudiaron las especies de *Celastraceas* de la flora guatemalteca *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) y *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan).

El presente trabajo de investigación consta de dos partes, en la primera el objetivo primordial fue el aislamiento y la elucidación estructural de metabolitos secundarios biológicamente activos de las hojas de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) y en la segunda se realizó un estudio exploratorio para conocer el tipo de familias de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) y la actividad biológica de dicho extracto. La investigación incluyó el uso de técnicas de recolección y de extracción, pruebas para determinación de actividad biológica, tamizaje fitoquímico, cromatografías en columna, cromatografías de alta resolución, cromatografías preparativas, cromatografías en capa fina y el uso de Resonancia Magnética Nuclear.

Ambos extractos se obtuvieron a partir de las hojas secas y molidas de las especies de estudio empleando etanol al 95% en equipo Soxhlet y concentrando a presión reducida con rotavapor. Se estudiaron los extractos etanólicos crudos por separado para poder cubrir los distintos objetivos propuestos. Al extracto de



Perrottetia longistylis (Manteco, Capulaltapa) se le realizó partición líquido-líquido resuspendiéndolo en agua y extrayendo con mezclas de diclorometano, acetato de etilo y agua. Las fracciones solubles en diclorometano y en acetato de etilo fueron sometidas a una serie de cromatografías en columna, cromatografías preparativas, cromatografías de alta resolución y en capa fina para aislar los metabolitos secundarios mayoritarios. Los metabolitos se identificaron mediante el uso de Resonancia Magnética Nuclear 300 MHz para ^1H . Entre los compuestos aislados se encontraron apocarotenoides, carotenoides, triterpenos de la serie del Ursano, triterpenos de la serie del Oleano, esteroides, un diterpeno y un flavonoide. Los compuestos aislados ya han sido descritos con anterioridad en la bibliografía científica y se han reportado para los mismos una gran variedad de actividades biológicas que se reportan en la presente investigación.

Al extracto de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) se le realizó Tamizaje Fitoquímico mediante distintas marchas de reacciones y cromatografías en capa fina (CCF) que permitieron identificar las familias de metabolitos secundarios del mismo mediante el cambio de coloración y comparación con testigos para las reacciones; y fluorescencia y comparación de coloración con estándares específicos para las cromatografías de capa fina. Se identificaron así a las siguientes familias de metabolitos secundarios: Alcaloides, Antraquinonas, Cumarinas, Flavonoides y Antocianinas, así como Esteroides y Triterpenoides. Se le realizó también un Tamizaje de Actividades Biológicas pero a pesar de la amplia variedad de familias de metabolitos secundarios encontradas en el extracto, no se observaron actividades positivas significativas ($p > 0.10$) para ninguna de las actividades biológicas estudiadas.



II. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas para el tratamiento de distintas enfermedades desde la presencia de los primeros seres humanos hasta nuestros días, basándose en observaciones y en experiencias. Las plantas usadas en la actualidad eran ya conocidas 5000 años antes de Cristo en la farmacopea egipcia y mesopotámica.¹ Esta capacidad que poseen las plantas de poder ser utilizadas como tratamiento para enfermedades se debe a que sintetizan una gran diversidad de metabolitos secundarios como parte normal de su programa de crecimiento y desarrollo o como parte de su mecanismo de respuesta. Los metabolitos secundarios representan un grupo de compuestos con una gran diversidad estructural que son valorados y explotados por el ser humano debido a sus numerosas aplicaciones².

Ejemplo de estas plantas son las pertenecientes a la Familia Celastraceae, las cuales, gracias a estudios previos, se conoce que poseen metabolitos secundarios que han demostrado actividad biocida. De esta Familia se han estudiado varios de sus géneros, donde se ha encontrado que algunos poseen propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antimaláricas, antitumorales³, insecticidas⁴ y anticancerígenas⁵, asimismo, otras especies representantes de esta familia han sido utilizadas también para el tratamiento del reumatismo y como antitumorales para cáncer de piel. Estos estudios se han realizado en España, Japón y África, sin embargo no se tienen datos de las plantas guatemaltecas pertenecientes a esta familia.⁶

El presente trabajo de investigación consta de dos partes, en la primera se aislaron y elucidaron los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto

¹ Zaragoza, F. G. Plantas Medicinales (Fitoterapia Practica); Infusiones La Leonesa/ 2ª edición. Manasul Internacional. León. 2001.

² Vlietinck, A.J.; Aspers, S. Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, Characterisation and biological properties, Ed, Corrado Tringali, Taylor & Francis Inc, London, 2001.

³ Chou, T. Q.; Mei, P. F. *J. Physiol.*, 1936, 10, 529.

⁴ Beroza, M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2136.

⁵ Kupchan, S. M.; Court, W. A.; Dailey, J. R.; Gilmore, C. J.; Bryan, R. F. *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 7194.

⁶ Wang, X. W.; Xie, H. *Drugs of the Future*, 1999, 24, 991.



Introducción

etanólico de las hojas de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) y en la segunda se realizó un estudio exploratorio para conocer el tipo de familias de metabolitos secundarios y la actividad biológica del extracto etanólico de las hojas de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan). La investigación incluye el uso de técnicas de recolección, extracción, así como pruebas de actividad biológica, tamizaje fitoquímico, cromatografías en columna, cromatografías preparativas, cromatografías en capa fina y el uso de Resonancia Magnética Nuclear.



III. ANTECEDENTES

A. La Familia Celastraceae

1. Consideraciones Taxonómicas

La familia Celastraceae se conoce como “familia agridulce” (bittersweet family). Las especies de esta familia son árboles y arbustos, a veces trepadores, con hojas opuestas o alternas, simples, coriáceas con frecuencia, con o sin estípulas. En general, poseen flores pequeñas poco llamativas, por lo común verdosas o blancas, regulares, bisexuales o unisexuales, normalmente dispuestas en inflorescencias cimosas. Los sépalos y pétalos se encuentran insertos en un disco carnosos. Las flores poseen de 3 a 5 sépalos, libres o unidos en la base y de 3 a 5 pétalos. Los estambres se encuentran en igual número que los pétalos, rara vez alternando con éstos. El fruto es una cápsula dehiscente o indehiscente, sámara, baya o drupa. Las semillas suelen estar cubiertas, total o parcialmente en la base, de un arilo vivamente coloreado.

Esta familia está constituida por 106 géneros y 1300 especies¹ con distribución pantrópica, aunque existe un gran número de especies distribuidas en climas cálidos y cálido-templados (Anexo No. 1, Distribución geográfica de las Celastráceas). Los géneros más interesantes y representativos^{2,3} son, *Maytenus* con 388 especies, *Celastrus* con 330 especies, *Cassine* con 121 especies y *Euonymus* con 414 especies.

La clasificación botánica de esta familia ha experimentado cambios debido a las hibridaciones.⁴ Así, el género *Maytenus* incluye, actualmente, las especies antiguamente incluidas en *Gymnosporia* y algunas especies de *Rhacoma* hoy día están incluidas en el género *Crossopetalum*, lo que ha dado lugar a que muchas especies tengan varios sinónimos.⁵ En el Cuadro No.1 puede observarse la clasificación taxonómica de la familia Celastraceae de Guatemala.

¹ Royal Botanic Garden, Kew.: *Vascular Plant Families and Genera* <http://www.rbkew.org.uk/cgi-bin/web.dbs/genlist.pl?Celastraceae>. (consulta 21.07.2005).

² Heywood, V. H.: *Flowering Plants of the World*, Oxford University Press, New York, 1993.

³ Woodland, D. W.: *Contemporary Plant Systematics*; Prentice-Hall, New Jersey, 1991.

⁴ Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. 1978, 17, 1821.

⁵ Chou, T. Q.; Mei, P. F. *J. Physiol.*, 1936, 10, 529.



Cuadro No. 1. División taxonómica de las Celastráceas pertenecientes a la Flora de Guatemala

Familia	Género	Especie
Celastraceae	<i>Celastrus</i>	<i>chiapensis</i>
		<i>vulcanicolus</i>
	<i>Elaeodendron</i>	<i>trichotomum</i>
	<i>Euonymus</i>	<i>acuminata</i>
		<i>enantiophylla</i>
	<i>Maytenus</i>	<i>belizensis</i>
		<i>guatemalensis</i>
		<i>matudai</i>
		<i>schippii</i>
	<i>Microtropis</i>	<i>guatemalensis</i>
		<i>ilicina</i>
		<i>occidentalis</i>
	<i>Perrottetia HBK</i>	<i>longistylis</i>
	<i>Rhacoma</i>	<i>eucymosa</i>
		<i>gaumeri</i>
		<i>gentlei</i>
		<i>lanceifolia</i>
		<i>puberula</i>
		<i>riparia</i>
		<i>standleyi</i>
		<i>tonduzii</i>
<i>Wimmeria</i>		<i>bartlettii</i>
		<i>cyclocarpa</i>
	<i>pubescens</i>	
<i>Zinowiewia</i>	<i>pallida</i>	
	<i>rubra</i>	
	<i>tacanesis</i>	

En color se muestran los géneros y las especies más abundantes en Guatemala. Elaborado por Carmen Garnica con datos obtenidos de Standley, P.; Séller, J.; *Flora de Guatemala*, Vol.24, Parte VI. Chicago Natural History Museum. E.U.A. Págs. 201-218. 1949.

2. Usos Etnobotánicos de las Celastráceas

Numerosas especies de la Familia Celastraceae son mundialmente conocidas por su uso en la medicina tradicional o en la agricultura, especialmente en Asia y América Latina.

Se puede citar el uso en Asia de *Tripterygium wilfordii* (Foto No. 1), conocida comúnmente en China como “lei gong teng”, ésta es la especie más estudiada y de la que se han aislado mayor número de principios activos. Las raíces molidas de esta especie se han usado en China durante siglos por sus



propiedades insecticidas, estudios llevados a cabo para identificar los principios activos de ésta y otras especies con propiedades insecticidas⁶ condujeron al aislamiento del alcaloide wilfordina y el triterpeno celastrol⁷. En 1972, Kupchan y *col.* aislaron de las raíces de esta especie los nuevos diterpenos triepoxídicos, triptolida, triptiolida y triptonida con una potente actividad antileucémica.⁸



Foto No. 1 Flores y Hojas de *Tripterygium wilfordii*.
Extraída de Beroza, M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2136.

Recientemente, extractos crudos y extractos refinados de *T. wilfordii* se están utilizando en clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedades autoinmunes y diversas afecciones dérmicas. Existen diversas patentes sobre el uso de la raíz seca de esta especie como antitumoral y de la actividad del extracto clorofórmico como inmunosupresor y antiinflamatorio.⁹

Celastrus paniculatus (Foto No.2) es una especie ampliamente distribuida en la India, China, Malasia e incluso Australia. Esta planta ha sido usada en la medicina Ayurvédica durante siglos para mejorar la habilidad mental.¹⁰ Además, se ha descrito la aplicación de extractos de *C. paniculatus* para combatir espasmos intestinales,¹¹ aislándose de esta especie los únicos ejemplos de sesquiterpenos con actividad relajante intestinal.¹²

⁶ Chou, T. Q.; Mei, P. F. *J. Physiol.*, 1936, 10, 529.

⁷ Beroza, M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2136.

⁸ Kupchan, S. M.; Court, W. A.; Dailey, J. R.; Gilmore, C. J.; Bryan, R. F. *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 7194.

⁹ Zheng, J. R.; Gu, K.; Xu, L.; Gau, J.; Yu, Y.; Tang, M. *Acta Acad. Med. Sin.*, 1991, 13, 391.

¹⁰ Gattu, M.; Boss, K. L.; Terry, A. V. Jr.; Buccafusco, J. *J. Pharmacology*, 1997, 57, 793.

¹¹ Kapoor, L. D.: *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*. CRC Press, Boca Raton, pg. 111, 2000.

¹² Borrelli, F.; Borbone, N.; Capasso, R.; Montesano, D.; Izzo, A. A.; De Marino, S.; Capasso, F.; Ferrara, L.; Longo, R.; Zollo, F. *Planta Med.*, 2004, 70, 652.



Foto No. 2. Fruto y Hojas de *Celastrus paniculatus*. Extraída de Gattu, M.; Boss, K. L.; Terry, A. V. Jr.; Buccafusco, J. J. *Pharmacology*, 1997, 57, 793.

En África, como ejemplos más significativos podemos citar las especies *Catha edulis* (Foto No.3) y *Maytenus senegalensis*. Así, *Catha edulis*, “khat”, es un arbusto de hoja perenne que crece a lo largo de la Costa de África y de la península Arábiga. Las hojas y brotes del “khat” son masticadas por sus efectos estimulantes; sin embargo, su consumo produce una sensación de bienestar y excitación, presentando numerosos efectos secundarios, como insomnio y falta de concentración, por lo que su uso abusivo crea grandes problemas de naturaleza social, sanitarios y económicos.¹³



Foto No. 3. Flores y Hojas de *Catha edulis*. Extraída de Der Krikorian, A. *J. Ethnopharmacol.*, 1984, 12, 115.

Por otra parte, *Maytenus senegalensis* (Foto No.4), conocida comúnmente como “bademi”, posee numerosos usos en la medicina tradicional. Así, las hojas pulverizadas y bebidas en jugo de leche son usadas como vermífugo; la corteza

¹³ Der Krikorian, A. *J. Ethnopharmacol.*, 1984, 12, 115.

machada y mezclada con agua posee propiedades anticancerígenas, antimaláricas y antisépticas.¹⁴



Foto No. 4. Árbol de *Maytenus senegalensis*. Extraída de González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L.; Jiménez, I. A. *Studies in Natural Products Chemistry*, Bioactive Natural Products; Vol. 23. Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, pg. 649, 2000.

En diversas áreas de la Amazonía (Perú, Ecuador y Colombia) el polvo rojo de la corteza de una planta conocida como “chuchuhuasca” es utilizada por los indígenas para el tratamiento del reumatismo y como afrodisíaco (Foto No.5). De forma tópica, es empleado como antitumoral en el cáncer de piel y para combatir la soriasis.¹⁵ En los últimos años se ha ampliado de forma apreciable la bibliografía sobre la “chuchuhuasca” y diversas especies del género *Maytenus* han recibido este nombre (*M. chuchuhuasca*, *M. krukovii*, *M. colassi* y *M. laevis*).¹⁶

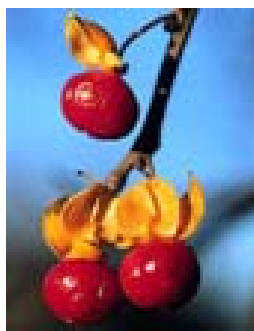


Foto No. 5. Fruto de *Maytenus chuchuhuasca*. Extraída de González, J. G.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G. B. *J. Ethnopharmacol.*, 1982, 5, 73.

¹⁴ González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L.; Jiménez, I. A. *Studies in Natural Products Chemistry*, Bioactive Natural Products; Vol. 23. Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, pg. 649, 2000.

¹⁵ González, J. G.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G. B. *J. Ethnopharmacol.*, 1982, 5, 73.

¹⁶ Colas, R.: *Les plantes amazoniennes désignées sous le nom de “Chuchuhuasha”*. These Imprimerie André Lesot, Paris, 1937.

El representante europeo mejor conocido de la familia Celastrácea es *Euonymus europaeus* (Foto No.6) el cual es de las pocas especies tóxicas de esta familia. Se cultiva como planta ornamental y para obtener carboncillo de su madera. Antiguamente, los tegumentos se usaban por su color para teñir cuero y sus frutos como purgantes y eméticos, aunque son venenosos.¹⁷ Estudios fitoquímicos realizados en esta especie condujeron al aislamiento de poliésteres de tipo β -agarofuránico, algunos de ellos alcaloídicos, con propiedades antialimentaria e insecticida.¹⁸

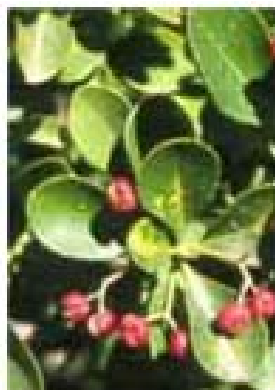


Foto No. 6. Fruto y hojas de *Euonymus europaeus*. Extraída de Perrot, E: *Les Plantes Medicinales, Part 1*, Paris, R. R., Press Universitaires de France, Paris, 1971.

Como representante de la familia en las Islas Canarias se encuentra *Maytenus canariensis* (Foto No.7), arbusto de ambiente termófilo, que recibe el nombre local de “peralillo”. Los agricultores y pastores lo usan como estimulante suave, mascando sus hojas para aliviar la fatiga, lo que recuerda al uso del “khat” en África. Sus frutos machacados se utilizan externamente para rebajar tumoraciones en la piel y abscesos cutáneos y la infusión de sus hojas contra el reuma.¹⁹ Estudios fitoquímicos de *Maytenus canariensis* han dado lugar al aislamiento e identificación de numerosos metabolitos secundarios, destacando los sesquiterpenos²⁰ con actividad antialimentaria e insecticida y los nor-triterpenosfenoles con actividad antibiótica y citotóxica.²¹

¹⁷ Perrot, E. : *Les Plantes Medicinales, Part 1*, Paris, R. R., Press Universitaires de France, Paris, 1971.

¹⁸ Descoins, C. *Tesis Doctoral*, Universidad de La Laguna, 1999.

¹⁹ Otero, J.: *Nuestras hierbas medicinales*. Caja Insular de Ahorros. Santa Cruz de Tenerife, 1984.

²⁰ González, A. G.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *Tetrahedron*. 1993, 49, 6637.

²¹ González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Canela, N. J.; Moujir, L. M. *Phytochemistry*, 1996, 43, 129.



Foto No. 7. Flores de *Maytenus canariensis*. Extraída de Otero, J.: *Nuestras hierbas medicinales*. Caja Insular de Ahorros. Santa Cruz de Tenerife, 1984.

3. Metabolitos Secundarios Aislados de la Familia Celastraceae

De celastráceas se han aislado un gran número de metabolitos secundarios, destacando las fenilalquilaminas, maytensinoides, terpenoides y glicósidos cardiotónicos, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas, que se describen a continuación.²²

a) α -aminopropiofenona [(-)-catinona]

Una fenilalquilamina aislada del “khat” (*Catha edulis* Forsk), es la principal responsable de los efectos estimulantes que posee dicha planta. La estructura y configuración absoluta de la (-)-catinona es parecida a la (+)-anfetamina y (-)-norseudoefedrina (Figura No. 1), siendo todos ellos estimulantes del sistema nervioso central y de las cuales la (-)-catinona es la más potente.²³

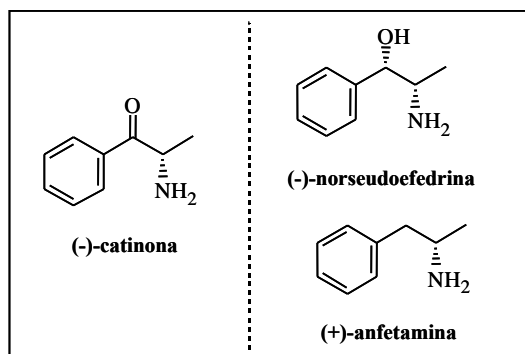


Figura No.1. Estructuras de la (-)-catinona, la (+)-anfetamina y (-)-norseudoefedrina. Extraída de Pullen, C.; Schmitz, P.; Hoffmann, D.; Meurer, K.; Boettcher, T.; Bamberg, D.; Pereira, A.; Castro, F.; Hauser, M.; Geertsema, H.; Van Wyk, A.; Mahmud, T.; Floss, H.; Leistner, E. *Phytochemistry*, 2003, 62, 377.

²² González, A.G.; Bazzochi, I. L.; Jiménez, I. A. *Studies in Natural Products Chemistry*, Bioactive Natural Products; Vol. 23. Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, pág. 649.2000.

²³ Ahmed, M. B.; El Qirbi, A. B. *J. Ethnopharmacol.*, 1993, 39, 213.

b) Maytensinoides

Son compuestos que presentan marcadas similitudes en cuanto a su estructura con los antibióticos del tipo de la rifampicina, por ser ambos ansamacrólidos con diversos enlaces peptídicos (Figura No.2), pero no tienen la misma biogénesis ni la misma actividad biológica. Este tipo de metabolitos estimuló el estudio de la Familia Celastraceae como posible fuente de sustancias bioactivas, pero recientemente se ha sugerido que las maytensinas no son metabolitos secundarios de la Familia Celastraceae sino de un hongo/bacteria asociado a ella.²⁴ Maytensina es un agente antitumoral excepcionalmente interesante, que presenta actividad a dosis de microgramos por kilogramo de individuo. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios (hepatotóxicos) se abandonó su aplicación clínica. Recientes investigaciones han dado una nueva posibilidad para su uso terapéutico, al combinarla con anticuerpos específicos.²⁵

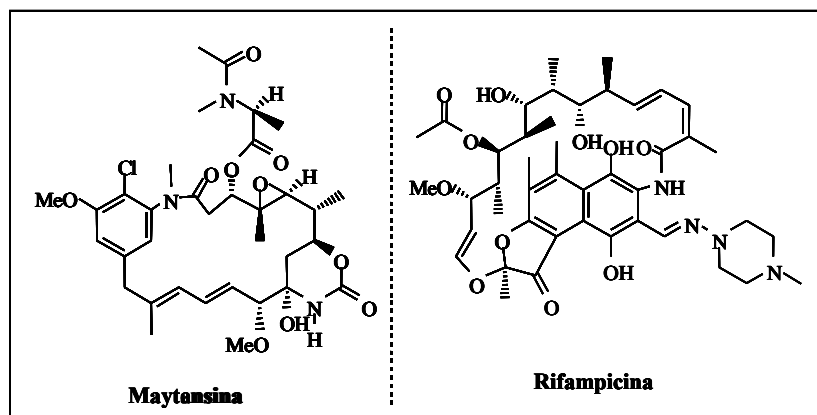


Figura No.2. Estructura de Maytensina en comparación con la Rifampicina.
Extraído de Liu, C.; Chari, V. J. *Expert. Opin. Invest. Drugs*, 1997, 6, 169.

c) Terpenoides

Es sin duda el grupo más numeroso de compuestos bioactivos de la familia Celastraceae. Los terpenoides son un grupo de metabolitos secundarios con gran diversidad estructural, que están formados por la repetición de una unidad de isopreno, que se unen entre sí, mediante una reacción “cabeza-cola”. Entre los terpenoides se puede mencionar a los monoterpenos constituidos por dos unidades de isopreno (C_{10}), los sesquiterpenos constituidos por tres unidades

²⁴ Pullen, C.; Schmitz, P.; Hoffmann, D.; Meurer, K.; Boettcher, T.; Bamberg, D.; Pereira, A.; Castro, F.; Hauser, M.; Geertsema, H.; Van Wyk, A.; Mahmud, T.; Floss, H.; Leistner, E. *Phytochemistry*, 2003, 62, 377.

²⁵ Liu, C.; Chari, V. J. *Expert. Opin. Invest. Drugs*, 1997, 6, 169.

(C₁₅), los diterpenos por cuatro unidades (C₂₀) y los triterpenos por seis unidades de isopreno (C₃₀).

i. Monoterpenos

Son compuestos volátiles que forman parte de los aceites esenciales. La β -thujona, es el monoterpene responsable del olor característico de las hojas frescas del “khat” (Figura No.3).²⁶

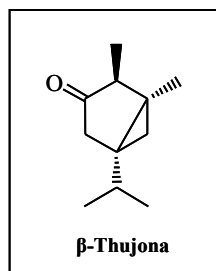


Figura No.3. Estructura del Monoterpeno β -thujona. Extraído de Yang, D.; Ye, M. X.; Pang, K. W.; Zou, N.; Letcher, R. M. *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 6446.

ii. Sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos

Con esqueleto básico de dihidro- β -agarofurano (Figura No. 4), se consideran indicadores quimiotaxonómicos de la Familia Celastraceae. Se han descrito una amplia gama de propiedades biológicas para estos metabolitos, como antialimentaria e insecticida y recientemente, inmunosupresora, antitumoral, inhibidora de la multirresistencia a fármacos y de la activación del virus Epstein-Barr, así como actividad anti-VIH.²⁷

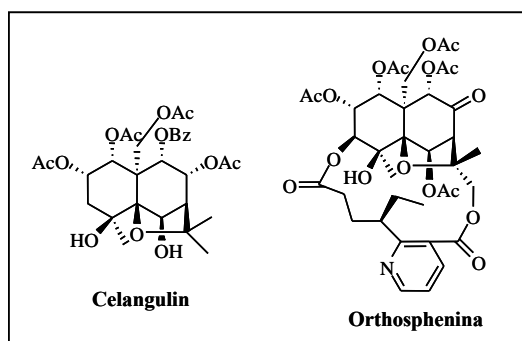


Figura No. 4. Ejemplos de sesquiterpenos con esqueleto básico de dihidro- β -agarofurano. Extraído de Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Hopper, A.; Moriarty, D.; Lehrman, G. K.; Niekman, A.; Morcomb, S.; Bates, R. B.; Mc. Clure, K.; Stessman, C.; Haber, W. *Planta Med.*, 1998, 64, 583.

²⁶ Saleh, Q. *Planta Med.*, 1972, 21, 410.

²⁷ Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.*, 2002, 31, 43.

iii. Diterpenos

Son poco frecuentes en esta familia. Se han aislado algunos metabolitos con esqueletos de isopimarano, abietano y abietatrieno. Estos últimos, poseen estructuras muy oxidadas como la triptolida (Figura No. 5), un triepóxido aislado de las raíces de *T. wilfordii* y uno de los responsables de la actividad antileucémica e inmunosupresora de esta planta,²⁸ que se comercializa en China, además para el control de la fertilidad.²⁹

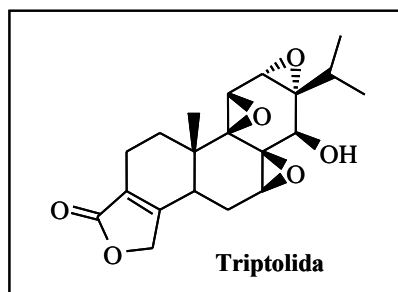


Figura No. 5. Estructura de triptolida. Extraído de Zhang, Z.; Ding, L.; Qian, S.; An, D. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 1993, 2, 144.

iv. Triterpenos

Se presentan con diferentes esqueletos, tanto tetracíclicos como pentacíclicos, con la singularidad de que algunos de ellos presentan sistemas metilenquinónicos sobre un esqueleto de friedelano, denominándose a estos compuestos *nor*triterpenometilenquinonas. Este tipo de compuestos sólo se han aislado de la familia Celastraceae, considerándose un indicador quimiotaxonómico. Sobre estos metabolitos se han descrito una gran diversidad de actividades biológicas. Así, por ejemplo la tingenona (Figura No.5) presenta actividad citotóxica frente a las líneas celulares Hep-G2, H-4-II y SK-Mel-28 con Cl_{50} de 1.9, 2.7 y 1.7 μ M, respectivamente³⁰ y actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias.³¹ Otro triterpeno interesante es el ácido salaspérmico (la estructura de este triterpeno puede observarse en la Figura No.6), que muestra actividad anti-VIH, al ser un inhibidor de la transcriptasa inversa del virus.³²

²⁸ Yang, D.; Ye, M. X.; Pang, K. W.; Zou, N.; Letcher, R. M. *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 6446.

²⁹ Zhang, Z.; Ding, L.; Qian, S.; An, D. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 1993, 2, 144.

³⁰ Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Hopper, A.; Moriaty, D.; Lehrman, G. K.; Niekman, A.; Morcomb, S.; Bates, R. B.; Mc. Clure, K.; Stessman, C.; Haber, W. *Planta Med.*, 1998, 64, 583.

³¹ Sotanaphun, U.; Lipipum, V.; Suttisri, R.; Bavovada, R. *Planta Med.*, 1999, 65, 450.

³² Chen, K.; Shi, Q.; Kashiwada, Y.; Zhang, D.; Hu, C.; Jin, J.; Nozaki, H.; Kilkuskie, R.; Tramontano, E. *J. Nat. Prod.*, 1992, 55, 340.

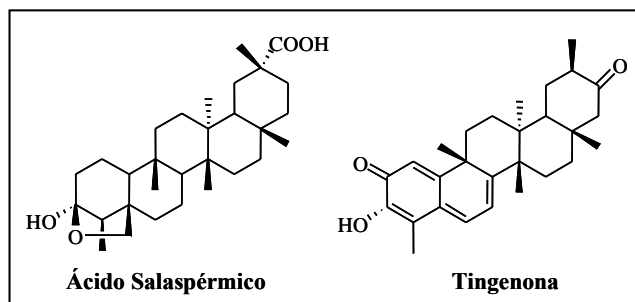


Figura No.6. Estructura del ácido salaspérmico y de la tingenona. Extraído de Chen, K.; Shi, Q.; Kashiwada, Y.; Zhang, D.; Hu, C.; Jin, J.; Nozaki, H.; Kilkuskie, R.; Tramontano, E. *J. Nat. Prod.*, 1992, 55, 340.

d) Glicósidos cardiotónicos

Son muy abundantes en las semillas y raíces del género *Elaeodendrom*. Los metabolitos más interesantes de este grupo son los elaeodendrósidos (Figura No.7), esteroides aislados de *Elaeodendrom glaucum* Pers con una marcada actividad cardiotónica.³³

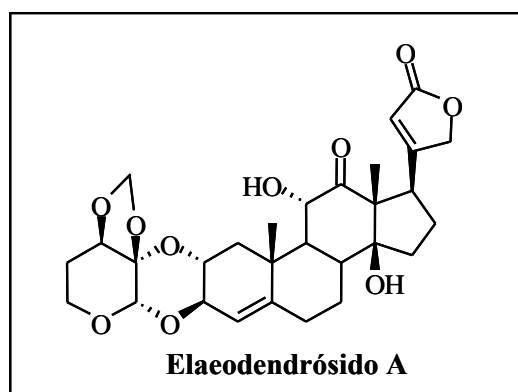


Figura No. 7. Estructura del Elaodendrósido. Extraído de Shimada, K.; Kyuno, T.; Nambara, T.; Uchida, I. *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 30, 4075.

e) Ciclopéptidos Macrocíclicos

En la familia Celastraceae sólo dos especies han presentado ciclopéptidos macrocíclicos; una serie de estos fueron aislados de *Euonymus europeus*³⁴ y recientemente, se aisló de la corteza de raíz de *Tripterygium wilfordii*, el ciclopéptido denominado triptotin L (Figura No.8).³⁵

³³ Shimada, K.; Kyuno, T.; Nambara, T.; Uchida, I. *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 30, 4075.

³⁴ Bishay, D. W.; Kowalewski, Z. *Phytochemistry*, 1973, 12, 693.

³⁵ Yang, G.-Z.; Li, Y.-C. *Helv. Chim. Acta*, 2002, 85, 168

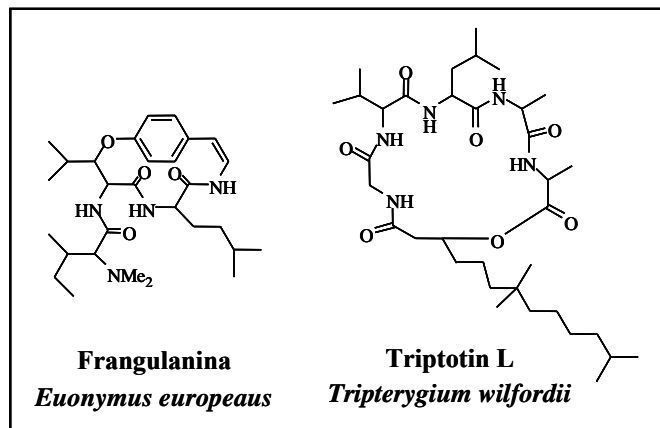


Figura No.8. Estructura de los ciclopeptidos frangulina y triptotin.
 Extraído de Yang, G.-Z.; Li, Y.- C. *Helv. Chim. Acta*, 2002, 85, 168.

4. Géneros más representativos de las celastráceas

4.1. Género *Maytenus*

Se caracterizan por ser arbustos o arbolillos a veces espinosos, con hojas fasciculadas o alternas, a menudo dísticas, enteras o dentadas. Flores en cimas, tirso, racimos o fascículos. Son bisexuales y en ocasiones unisexuales, monoicas o dioicas. Cáliz con 4-5 dientes. Corola con 4-5 pétalos extendidos. Androceo con 4-5 estambres libres o unidos, reducidos a estaminodios en las flores unisexuales femeninas. Fruto en cápsula dehiscente de 2-5 valvas con semillas de arilo carnoso coloreado. Comprende unas 255 especies nativas de los trópicos y subtrópicos. Algunos ejemplos representativos de este género son la *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell, la *Maytenus boaria* Mol, y la *Maytenus canariensis* (Loes.) G.Kunkel & Sund (Foto No.8).³⁶



Foto No. 8. Frutos de *Maytenus canariensis*.
 Extraído de Familia Celastraceae: www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm.

³⁶ Familia Celastraceae: www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm. Fecha de Consulta: (20/ 10/2005).

4.2. Género *Celastrus*

Son arbustos o arbolillos erectos o la mayoría de veces escandentes, con hojas alternadas, membranosas, pecioladas. Flores algunas veces unisexuales, en racimos o fascículos terminales o axilares. Cáliz con 5 dientes. Corola con 5 pétalos insertados alrededor del anillo. Androceo con 5 estambres insertados en el disco. Fruto en cápsula dehiscente de 2-4 valvas con semillas de arilo carnoso coloreado. Algunos ejemplos representativos de este género son *Celastrus scandens*, llamada a veces “dulcamara americana”. (Foto No.9), ³⁷*Celastrus paniculatum*, y *Celastrus orbiculatus* (Foto No.10)³⁸



Foto No. 9. Frutos de *Celastrus scandens*.
Extraído de *Familia Celastraceae*: [http:// www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm](http://www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm).



Foto No. 10. Frutos y hojas de *Celastrus orbiculatus*.
Extraído de *Familia Celastraceae*: [http:// www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm](http://www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm).

³⁷ *Celastrus scandens*. Extraído de *Familia Celastraceae*: [http:// www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm](http://www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm). Fecha de Consulta: (20/ 10/2005).

³⁸ *Celastrus orbiculatus*. Extraído de *Familia Celastraceae*: [http:// www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm](http://www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm). Fecha de Consulta: (20/ 10/2005).

4.3. Género *Cassine*

Son arbustos o árboles siempreverdes con ramillas tetrágonas y hojas alternas u opuestas, enteras o aserradas, coriáceas. Flores pequeñas dispuestas en cimas axilares. Perianto con 3-5 segmentos, con los sépalos a veces carnosos y los pétalos mayores que los sépalos. Androceo con 3-5 estambres más cortos que los pétalos. Fruto indehiscente, drupáceo, oblongo-globoso, ligeramente carnoso. Comprende unas 80 especies nativas de los trópicos y subtrópicos. Algunos ejemplos representativos de este género son *Cassine australis* (Vent.) Kuntze, *Cassine papillosa* (Hochst.) Kuntze, y *Cassine orientalis* (Jacq.) Kuntze (Foto No.11).³⁹



Foto No. 11. Frutos de *Cassine orientalis*. Extraído de *Familia Celastraceae*: <http://www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm>.

4.4. Género *Euonymus*

Las plantas pertenecientes a este género se caracterizan por ser árboles y arbustos, erectos (especies guatemaltecas) o raramente escandentes, usualmente glabros, las ramas tetrágonas, hojas opuestas, pecioladas, coriáceas a membranosas, enteras o acerradas, estípula caduca; flores pequeñas, verdes o purpurinas, cimosas, las cimas pedunculadas, axilares, generalmente con pocas flores; cáliz tetra o pentámera, los segmentos extendido o recurvados; pétalos 4 o 5, insertos en la parte baja del disco, extendidos, enteros, dentados o fimbriados, estambres 4 o 5, insertos sobre o en el margen del disco, filamentos tubulados, usualmente son muy cortos, las anteras anchas, dídimos; disco carnoso, grande,

³⁹ *Familia Celastraceae*: <http://www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm>. Fecha de Consulta: (20/ 10/2005).

explanado, de 4 a 5 lóbulos; ovarios inmersos en un disco y confluyente con él; estilo corto, el estigma con 4 o 5 lóbulos; óvulos comúnmente 2 en cada carpelo, ascendentes o resupinados en el ángulo interior, cápsula con 4 o 5 carpelos en ocasiones angulados, coriáceos, frecuentemente tuberculados o equinados, carpelos con 1 o 2 semillas, loculicidalmente con 3 a 5 valvas; semillas encenagas en un arilo, las testa cactácea; endospermo carnosos; embrión ortótropo, los cotiledones anchos, foliáceos, la radícula inferior.⁴⁰

Existen reportadas en la actualidad 414 especies, comúnmente en regiones templadas, y en los trópicos encontrados en regiones montañosas, la mayoría de las especies son asiáticas, también existen reportadas Europa y América. Algunos ejemplos representativos de este género son *Euonymus europaeus* L (Foto No.12), *Euonymus hamiltonianus* Wall, *Euonymus japonicus* Thunb (Foto No.13), y *Euonymus oxyphyllus* Miq.⁴¹



Foto No. 12. Frutos de *Euonymus europaeus*. Extraído de Familia Celastraceae: disponible en www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm.



Foto No. 13. Flores de *Euonymus japonicus*. Extraído de Familia Celastraceae: disponible en www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm.

⁴⁰ Standley, P.; Sélmer, J.; *Flora de Guatemala*, Vol.24, Parte VI. Chicago Natural History Museum. Págs. 201-218. E.U.A. 1949.

⁴¹ Familia Celastraceae: disponible en www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm. Fecha de Consulta: (20/ 10/2005).

5. Especies de Estudio

5.1. *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Esta especie es común en bosques húmedos o inundables o en arbustales húmedos y lluviosos, a menudo en bancos a lo largo de cuerpos de agua, a una altura de 350 a 2,900 metros, mayormente a 1,200 metros o más alto; en la República de Guatemala se encuentra en Alta Verapaz; Baja Verapaz; El Progreso; Escuintla; Quiché; Huehuetenango; Quetzaltenango; San Marcos y en México en el sur de México.

Las plantas pertenecientes a esta especie se caracterizan por ser un árbol o arbusto, comúnmente posee de 6 a 12 metros de altura y un tronco de 15 centímetros. Sus ramas son delgadas, glabras o casi glabras; sus hojas cortamente pecioladas ovado oblongo o elípticas-oblongas, de 7 a 20 centímetros de largo, de 3 a 8 centímetros de ancho, acuminada, a menudo abruptamente acuminadas, a veces, redondeada a anchamente cuneadas en la base, finamente aserradas con dientes agudos, glabras en el as, ligeramente pálidas en el envés finamente puberulentas o con la edad usualmente glabras o esencialmente glabras, laxamente venosas reticuladas inflorescencias en panículas con flores numerosas, diminutamente puberulentas, usualmente mucho más cortas que las hojas, las flores en pedicelos muy cortos, las flores pequeñas verduscas, escasamente más de 1.5 mm de ancho, los pétalos diminutos raramente sobrepasan el corto cáliz, el fruto es rojo jugoso globoso y comprimido de 3.5 mm o menos de diámetro.



Foto No. 14. Flores de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa). Extraído de WEBTREE © 2001-2002 Kevin C. Nixon disponible http://132.236.163.181/cgi-bin/dol/dol_owner.pl?owner=Michelangeli&startat=119&endat=198



Foto No. 15. Árbol de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa). Extraído de WEBTREE © 2001-2002 Kevin C. Nixon disponible bin/dol/dol_terminal.pl?taxon_name=Perrottetia&rank=genus

5.2. *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan)

Esta especie es común en bosques mixtos de 1,899 a 3,000 metros; endémico; en la República de Guatemala se encuentra en Baja Verapaz; El Progreso; Chimaltenango; Sololá; Sacatepéquez; Suchitepéquez; Quiché (donde fue por primera vez recolectado, tipo como el “Chiúl”).

Las plantas pertenecientes a esta especie se caracterizan por ser un árbol o arbusto glabro, en ocasiones posee 7 m de altura. Sus ramas cuando jóvenes son delgadas, verdes y anguladas. Posee hojas delgadas y membranosas, en petioles de 3 a 7 mm de largo, ovado-lanceolado u oblongo-elíptico de 8 a 11 cm de diámetro y de 2.5 a 3.5 cm de ancho, acuminada o largamente-acuminada, redondeada u obtusa en la base, crenado-serrulado, con puntos debajo de la hoja (Foto No. 16). Tiene cimas largamente pedunculadas, simples o doblemente tricotómicas, ramas muy delgadas, pedúnculos de 2 a 3.5 cm de largo. Sus sépalos son semiorbiculares, de 1 mm de largo, pétalos redondeado-obovado de 4 mm de largo, estilos muy cortos cápsulas subglobosas, verdosas de 1 cm de diámetro, suave de 2 a 3 carpelos y arilo rojo (Foto No.17). La madera de este género posee un color blanco-amarillento, es de textura fina y fácil para trabajar. Las especies Europeas son usadas para torneear, limas para manicure, y otros artículos pequeños. ⁴²

⁴² Standley, P.; Sëller, J.; *Flora de Guatemala*, Vol.24, Parte VI. Chicago Natural History Museum. Págs. 201-218. E.U.A. 1949.



Fotos No. 16 y 17. Parte Aérea de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan), a la izquierda hojas, rama y fruto y a la derecha hojas y fruto. Tomada por Carmen Garnica de las muestras de referencia del Herbario BIGU, Facultad de Ciencias Química y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Enero 2007.



IV. JUSTIFICACIONES

Hoy en día existen varias medidas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades, éstas pueden dividirse, de acuerdo al origen del medicamento, en sintéticas, semisintéticas y naturales, estas últimas constan de productos obtenidos de plantas y animales. Dentro de las plantas que pueden usarse como medicamento natural se encuentran las de la Familia Celastraceae, encontrándose especies que pueden ser empleadas como medidas terapéuticas ya que se le han atribuido propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antimaláricas, insecticidas, anticancerígenas, antirreumáticas y antitumorales.

A pesar de que en Guatemala existen reportadas más de 25 especies pertenecientes a la Familia Celastraceae no existen estudios previos sobre la composición fitoquímica y la actividad biocida de las mismas. Es aquí donde radica la importancia de esta investigación ya que la misma ofrece un estudio exploratorio sobre la Familia Celastraceae de la flora de Guatemala. Gracias a esta investigación se obtienen datos de la composición fitoquímica de las especies de estudio, así como datos sobre su actividad biocida.

Es por ello que se espera que la presente investigación sea empleada como fundamento para estudios posteriores, en donde el conocimiento obtenido sobre la composición química y la actividad biológica de las especies de Celastraceae de estudio sirvan como posibles precursores para el desarrollo de una opción terapéutica natural. Además se pretende que se estimule el estudio de otras especies de la Familia Celastraceae pertenecientes a la Flora de Guatemala cuyos resultados podrían ser muy prometedores.



V. OBJETIVOS

Parte I

1. Aislar y elucidar la estructura de los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto etanólico de las hojas de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa).
2. Estudiar las actividades antifúngica, antibacteriana y citotóxica de los metabolitos secundarios nuevos aislados del extracto etanólico de las hojas de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa).
3. Realizar Revisión bibliográfica de los metabolitos secundarios bioactivos conocidos que se aislen de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa).

Parte II

1. Determinar la composición fitoquímica (alcaloides, antraquinonas, cumarina, cardenólicos y bufadienólicos, saponinas, Principios amargos, taninos, flavonoides y antocianinas, esteroides o triterpenoides) del extracto etanólico de las hojas de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan).
2. Evaluar la actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica, del extracto etanólico obtenido de las hojas de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan).

VI. HIPÓTESIS

Parte I

Es posible aislar y elucidar la estructura de por lo menos un metabolito secundario del extracto etanólico de las hojas de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) no reportado previamente en la literatura.

Parte II

Por lo menos una de las familias de metabolitos secundarios que componen el extracto etanólico de las hojas de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan), posee como mínimo un tipo de actividad biocida: antifúngica, antibacteriana o citotóxica.



VII. Materiales y Métodos

A. Universo

Parte I

Planta de la flora de Guatemala perteneciente a la Familia Celastraceae, especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa).

Parte II

Planta de la flora de Guatemala perteneciente a la Familia Celastraceae, especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan).

B. Muestra

Parte I

Extracto etanólico de hojas secas de planta de la flora de Guatemala perteneciente a la Familia Celastraceae, especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) de la región boscosa del Volcán Acatenango en el Departamento de Sacatepéquez en la República de Guatemala, cuya composición fitoquímica, actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica no han sido estudiadas con anterioridad.

Parte II

Extracto etanólico de hojas secas de planta de la flora de Guatemala perteneciente a la Familia Celastraceae, especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) de la región boscosa del Volcán San Pedro en el Departamento de Sololá en la República de Guatemala, cuya composición fitoquímica, actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica no han sido estudiadas con anterioridad.



C. Medios

Parte I y II

1. Recursos Humanos

- Autora: Carmen Teresa Garnica Marroquín.
- Asesor: Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D.
- Consultores Internos:
 - Licenciada Isabel Gaitán, Investigadora del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
 - Ingeniero Mario Veliz, Director del Herbario BIGU de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Consultores Externos:
 - Doctor Marvin Núñez, Profesor e Investigador de la Universidad de El Salvador.
 - Doctora Doña Isabel López Bazzocchi, Directora del Instituto de Bio-Orgánica “Antonio González” de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.
 - Doctor Don Ignacio Antonio Jiménez Díaz, Profesor de Investigador del Instituto de Bio-Orgánica “Antonio González” de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

2. Recursos Materiales

Parte I y II

1. Equipo

- Estereoscopio
- Refrigeradora
- Rotavapor
- Vortex (agitador)



- Incubadora
- Liofilizador
- Mechero
- Autoclave
- Manta de calentamiento
- Estufa con agitación
- Lámpara uv 365 y 254 nm
- Pistola de calor
- Bomba de Vacío
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Compartimentos para secado con calor artificial
- Bruker Avance 300 (300 MHz para ^1H)
- Equipo para ultrasonido (Sonicador)
- Campana bacteriológica
- Campana de Flujo Laminar
- Microscopio
- Lámpara de luz blanca
- Bomba de oxígeno para pecera
- Bomba para recirculación de agua
- Pipetas automáticas de 10 a 1000 μl

2. Reactivos

- Etanol 50%, 70% y 95%
- n-Hexano (Grado Reactivo)
- Metanol (Grado Reactivo)
- Acetona (Grado Reactivo)
- Cloroformo (Grado Reactivo)
- Diclorometano (Grado Reactivo)
- Acetato de etilo (Grado Reactivo)
- Agua desmineralizada



- Cloroformo deuterado
- Acetona deuterada
- gel de sílice fina de 0,063–0,200 nm de diámetro
- gel de sílice de 0,2-0,5 nm de diámetro.
- Sephadex LH-20
- Agar-agar
- Agar saboraud
- Agar Muller Hinton
- Caldo tripticasa soya
- Dextrosa
- Fosfato diácido de potasio (Grado Reactivo)
- Sulfato de sodio anhidro (Grado Reactivo)
- Peptona
- Sangre de carnero
- Solución salina estéril
- Sal de mar
- Ácidos, bases, disolventes y estándares según el ensayo
- Reactivos específicos para cada grupo de metabolitos

3. Materiales

- Papel parafilm
- Viales de 5, 10, 15 ml
- Frascos de vidrio ámbar 50, 100, 250 ml
- Baño maría
- Papel filtro Watman No.1
- Algodón
- Alambre de Cobre
- Cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄



- Placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm
- Placas (10 x 10 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice de 60
- Cámaras cromatográficas
- Asa de nicromo
- Fósforos
- Puntas amarillas de 200 μ L
- Puntas azules de 1000 μ L
- Huevos de *Artemia salina*
- Microplaca
- Pipeteadores
- Agitador magnético
- Algodón
- Capilares de 5 μ L
- Cajas de Petri
- Cajas de Petri cuadrilate

4. Cristalería

- Beakers de 250 y 500 ml
- Probetas de 10, 25, 100 y 200 ml
- Equipo Soxhlet
- Erlenmeyer con tapón de rosca de 250 ml
- Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- Embudo mediano y grande
- Tubos de ensayo
- Columnas cromatográficas de distintas capacidades
- Cámara de Neubauer
- Campanillas de Durham
- Tubos de vidrio con tapadera de rosca de 15 ml
- Balones aforados de 10, 100, 250 y 500 ml
- Embudo mediano y grande



- Termómetro de -10 a 300 °C
- Tubos de ensayo
- Micropipetas
- Pipetas serológicas y volumétricas de 5, 10, 25, 50 ml
- Cámaras cromatográficas

5. Otros

- Cuchillo de monte
- Tijeras
- Tijeras de podar
- Prensa
- Cuerda para apretar las rejillas
- Papel periódico
- Cartones corrugados
- Papel mayordomo
- Regla graduada en mm
- Marcador indeleble
- Pecera para cultivo de *Artemia salina*
- Asperjador de vidrio
- Lápiz
- Gradillas para tubos de ensayo
- Programa ChemDraw Ultra 8.0
- Programa ChemFinder
- Programa de computadora Finney (DOS)



D. Métodos

Para la realización del estudio se trabaja con dos plantas de la flora de Guatemala pertenecientes a la Familia Celastraceae, para la primera parte se emplea la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) y para la segunda la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan). Ambas plantas se identifican y posteriormente se recolectan en el área boscosa del Volcán Acatenango en el Departamento de Sacatepéquez y en el Volcán de San Pedro en el Departamento de Sololá, respectivamente. Ambos extractos se obtienen a partir de las hojas secas y molidas empleando el método de extracción exhaustiva con etanol al 95% usando equipo Soxhlet y la concentración de los extractos se realiza mediante el uso de rotavapor. Una vez teniendo los extractos etanólicos crudos se procede de la siguiente manera:

Parte I

Al extracto de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) se le realiza partición líquido-líquido empleando diclorometano, acetato de etilo y agua. Son fraccionadas las partes solubles en diclorometano y en acetato de etilo mediante el uso de distintas técnicas cromatográficas en columna y en capa fina conforme es necesario para aislar metabolitos secundarios. Se identifican los metabolitos secundarios aislados mediante el uso de Resonancia Magnética Nuclear empleando para ello el espectrofotómetro Bruker Avance 300 (300 MHz para ^1H).

Parte II

Al extracto de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) se le realiza el tamizaje fitoquímico y tamizaje de actividades antimicótica, antibacteriana, y citotóxica, cada una de las etapas específicas para cada parte del estudio se amplían a continuación:

1. Identificación y Colecta de la Planta

1. Colectar una muestra de cada especie a estudiar, las mismas deben ser colectadas con hojas, flor, y fruto para su identificación.



2. Comparar las muestras con la información que se tiene en las referencias del herbario.
3. Recolectar parte aérea de las especies de estudio para lograr obtener suficiente cantidad de materia vegetal.
4. Colocar la materia vegetal en bolsas plásticas y trasladar lo antes posible al lugar donde será verificada la identidad de la especie.

2. Secado de la planta:

1. Lavar con agua potable las hojas de la especie de estudio.
2. Colocar en secadora u Horno eléctrico a una temperatura no mayor a 35°C hasta que el Porcentaje de Humedad sea menor al 10%.

3. Obtención de Extracto Etanólico con Soxhlet

1. Colocar cerca de 40 gramos de la hoja de la planta a estudiar (previamente secadas, molidas y pesadas) en el dedal del extractor del equipo.
2. Agregar al balón del sistema Soxhlet una cantidad de etanol al 95% no mayor a 2/3 de su capacidad total.
3. Armar el equipo adecuadamente (ver Anexo No.5, Figura No. 1) y aplicar calor con una estufa o con una manta de calentamiento durante el tiempo que sea necesario hasta lograr que el disolvente al pasar por el dedal no posea color.
4. Repetir hasta agotar la cantidad de materia vegetal.
5. Colocar el extracto etanólico en el balón de evaporación del rotaevaporador (ver Anexo No.5, Foto No. 1)
6. Mantener la temperatura del baño entre 50-60°C de manera que el balón de evaporación no exceda los 40 °C.
7. Destilar el solvente para su eliminación.
8. Llevar extracto (ver Anexo No.5, Foto No. 2) hasta sequedad.



4. Partición líquido-líquido de extracto etanólico de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Los solventes que se emplean para la partición son agua-diclorometano-acetato de etilo, la posición relativa de ambas fases (arriba o abajo) depende de la relación de densidades. El diclorometano queda en la capa inferior y el acetato de etilo queda en la capa superior al emplearse con agua. La extracción se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Disolver el extracto etanólico en agua y verterlo en la ampolla de decantación.
2. Colocar la primera fase orgánica (disuelta en diclorometano) donde pasarán los componentes del extracto afines a este solvente.
3. Separar las fases.
4. Reconcentrar la fase orgánica (disuelta en diclorometano) y la fase acuosa se vuelve a extraer con acetato de etilo.
5. Una vez teniendo las distintas particiones proceder a realizar el fraccionamiento mediante distintas técnicas cromatográficas dependiendo las necesidades que se vayan suscitando.

5. Fraccionamiento con diferentes técnicas Cromatográficas para separar metabolitos secundarios aislados de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Cromatografía en Columna (CC)

1. Emplear para la realización de las columnas cromatográficas (secas y húmedas) gel de sílice fina de 0.063–0.200 nm de diámetro.
2. Suspender la gel de sílice en el eluyente.
3. Compactar con una bomba de vacío.
4. Aplicar las muestras disueltas y otras adsorbidas en gel de sílice de 0.2-0.5 nm de diámetro, dependiendo la necesidad.

Nota: Recordar para las muestras disueltas colocar la cabeza de la columna en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna.



Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM)

1. Usar como soporte Sephadex LH-20.
2. Estabilizar el polímero en suspensión con metanol durante cerca de doce horas.
3. Estabilizar columna con la mezcla que se emplea como eluyente, para lo cual se eluye con 1,500 ml de una mezcla de *n*-hexano–cloroformo–metanol (2:1:1).
4. Filtrar la muestra a cromatografiar.
5. Colocar la muestra en la cabeza de la columna disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna.

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

1. Realizar cromatografías en capa fina sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G de 0.25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm.
2. Realizar detección de los productos sobre las placas por fluorescencia con luz ultravioleta a 365 y 254 nm.
3. Posteriormente utilizando revelador óleum (disolución de H₂O:H₂SO₄:AcOH, 4:1:20) y posterior calentamiento a 120-200°C.

Cromatografía Preparativa en Capa Fina (CPCF)

1. Utilizar placas de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm, UV₂₅₄.
2. Sembrar cerca de 40 mg.
3. Usar para la elusión diferentes mezclas de disolventes, dependiendo de la necesidad.
4. Realizar detección de los productos sobre las placas por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y 365 nm.
5. Posteriormente usar revelador óleum, aplicando cuidadosamente sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la



placa con una lámina de vidrio, y luego calentar la zona tratada con una pistola de calor (120-200°C).

Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (CCFAR)

1. Utilizar placas de 1 mm de espesor de gel de sílice de 60, con indicador de fluorescencia a 254 nm, UV₂₅₄. La resolución de estas placas es mayor que las anteriores y la cantidad a sembrar es entorno a 10 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes.
2. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 nm, y posteriormente pulverizando óleo sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

1. Tomar los productos aislados por métodos cromatográficos.
2. Realizarles tres lavados con el solvente que se emplea para llevar a cabo la lectura en el RMN. Posterior a cada lavado debe llevarse a sequedad.
3. Disolver el producto en solvente deuterado y colocarlo en el tubo para la medición.
4. Identificar los metabolitos aislados mediante RMN. Se emplea el espectrofotómetro Bruker Avance 300 (300 MHz para ¹H).

Nota: Los disolventes deuterados ha emplear son cloroformo deuterado (CDCl₃) para los compuestos de la fracción soluble en diclorometano y acetona deuterada (CD₃COCD₃) para la fracción soluble en acetato de etilo, ambas contienen tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

7. Evaluación de Actividades

a) Tamizaje de la Actividad Antimicótica *in vitro*

Procedimiento

i. Preparación de medio de cultivo



1. Preparar tubos con 13.5 ml de agar Sabouraud.
2. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 ml del extracto de la planta a probar (dilución 1:10) y agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/ml.
3. Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 h para verificar esterilidad.
4. Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.⁴⁵

ii. Preparación de inóculo

1. Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

Dextrosa	0.6 g
Na ₂ SO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Peptona	0.3 g
Agar-agar	6.0 g.
2. Agregar a 300 ml de agua, disolver, verter 6 ml en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 h a 25°C para descartar contaminación.
3. Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).
4. Agregar a cada tubo 2 ml de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.
5. Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
6. Llevar la suspensión a 100 esporas/ μ l=1x10⁵ esporas/ml (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

iii. Inoculación de hongos filamentosos en placa

1. Abrir cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro. En forma equidistante.



2. Tomar 30 μ l de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días.
3. Hacer un total de 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo.

iv. Lectura e interpretación de los resultados

1. Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.
2. Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.
3. Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%. (ver Anexo No.5, Foto No. 3)⁴⁵

b) Tamizaje de la Actividad Antilevadura *in vitro*

Procedimiento

i. Preparación de medio de cultivo

1. Preparar tubos con 9.0 ml de agar Mueller Hinton.
2. Esterilizar a 121°C durante 15 min, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.0 ml de extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/ml.
3. Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar, e incubar a 36°C por 24 h para verificar esterilidad.
4. Guardar en refrigeración hasta el momento de uso.

ii. Preparación del inóculo

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



iii. Inoculación de levaduras en placa

1. Inocular con asa la suspensión de levaduras en cada sección según plantilla.
2. Incubar a 36°C durante 48 h.
3. Sembrar por estrías la levadura en una caja con agar Sabouraud, para el control negativo.

iv. Lectura e interpretación de los resultados

Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

c) Tamizaje de la Actividad Antibacteriana *in vitro*

i. Preparación de Agar-Planta

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

ii. Preparación del inóculo

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



iii. Demostración de la actividad antibacteriana

1. Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos (ver Anexo No.3) siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 min e incubar a 36°C durante 24 h.
2. Utilizar como control negativo 9 ml de agar Muller Hinton mezclándole 1 ml de etanol al 50%.

iv. Interpretación de resultados

1. Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
2. Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. (ver Anexo No.5, Foto No. 4)
3. Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

d) Tamizaje de la Actividad Citotóxica contra Artemia Salina

i. Preparación del agua de mar

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

ii. Cultivo de *Artemia salina*

1. Colocar en un vaso de precipitar 200 ml del agua de mar y airear por 30 minutos.
2. Colocar el agua en la pecera y agregar 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).
3. Incubar por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) (ver Anexo No.5, Foto No. 5) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).



iii. Determinación de la Citotoxicidad

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

iv. Interpretación

1. Calcular el % de camarones muertos:

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

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

Dividir X dentro de Y y multiplicarlos por 100.

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

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

e) Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

i. Preparación de Agar-Planta

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

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

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



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

3. Un cuadrante con 4.0 ml de agar como control negativo.
4. Dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
5. Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

ii. Preparación del inóculo

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

iii. Demostración de la concentración inhibitoria mínima

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

iv. Interpretación de resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. (ver Anexo No.5, Foto No. 6)
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

8. Tamizaje Fitoquímico

Procedimiento:

a) Investigación de alcaloides:

i. Ensayos macro y semimicro

1. Pesar 0.5 g de material vegetal de las hojas secas de la planta de estudio
2. Agregar 0.5 ml de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v)



3. Añadir 25 ml de etanol (95%) a 60°C y filtrar con papel filtro Whatman No.1
4. Acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2 N y dividir en 4 tubos
5. Preparar el estándar utilizando una soluciones al 1% de atropina y papaverina
6. Evaluar las reacciones de color como se indica en la Tabla No.2:

Tabla No. 2. Evaluación de reacciones de coloración para alcaloides

Tubo No.	Agregar 5 gotas del reactivo	Color	Observaciones
1	Mayer's.	blanco a crema	Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos
2	Dragendorff	rojo a naranja	
3	Wagner	marrón	
4	Testigo	----	

Tabla No. 2. Evaluación de reacciones de coloración para alcaloides. Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

ii.Preparación de Reactivos de coloración para alcaloides.

Reactivo Mayer's (yoduro de mercurio y potasio)

Preparar:

Solución A: Pesar 1.36 g de HgCl_2 y agregar 60 ml H_2O

Solución B: Pesar 5 g KI y agregar 10 ml H_2O

Mezclar Solución A y Solución B y diluir a 100 ml.

Reactivo Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)

Preparar:

Solución A: Pesar 8 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y agregar 20 ml HNO_3

Solución B: Pesar 27.2 g KI y agregar 50 ml H_2O

Mezclar, reposar, decantar sobrenadante. Diluir a 100 ml.



Reactivo Wagner (yodo-yoduro de potasio)

Preparar:

Solución A: Pesar 1.27 g I₂ + 2 g KI y agregar 5 ml H₂O

Diluir a 100 ml

iii. Cromatografía en capa fina

1. Aplicar 10 a 15 µl el extracto etanólico disuelto en etanol al 95% en una placa de silica gel 60 F₂₅₄
2. Preparar estándar con solución de atropina y papaverina al 1 % en metanol y aplicar de 10 a 15 µl sobre la placa
3. Correr la cromatografía (ver fases móviles en Tabla No.4) y detectar según Tabla No. 5

Tabla No. 4. Fases móviles empleadas para cromatografía de capa fina para alcaloides.

	Solventes	Proporciones
Fase móvil	tolueno-acetato de etilo-dietilamina	70:20:10
	acetato de etilo-metanol-agua	100:13.5:10
	cloroformo-dietilamina	90:10
	acetona-agua-amonio concentrado	90:7:3

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Tabla No. 5. Métodos de Detección empleados para cromatografía de capa fina para alcaloides.

Detección	Sin tratamiento químico	UV 254 nm	Fluorescencia
		UV 365 nm	algunos fluorescencia azul o amarillo
	Reactivo de Dragendorff	vis	zonas café o naranjas (los colores no son estables)

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



b) Investigación de flavonoides y antocianinas
i. Ensayos macro y semimicro

1. Triturar 2ml del extracto etanólico con 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora.
2. Disolver el residuo en 30 ml de etanol al 95 %⁴⁶
3. Filtrar y dividir en tubos como se muestra en la Tabla No. 6.
4. Observar resultados y comparar con la Tabla No.7

Tabla No. 6 Evaluación de reacciones de coloración para flavonoides y antocianinas.

Tubo	Cantidad a agregar	Reactivo a agregar	Observaciones
No.1	0.5 ml	ácido sulfúrico concentrado	Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.
No.2	3 a 5 gotas	cloruro férrico al 10 por ciento (p/v)	
No.3	0.5 ml	ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).	
No.4	0.5 ml	ácido clorhídrico concentrado y magnesio metálico	
No.5	----	un álcali a un extracto acuoso	
No.6	----	solución de ácido bórico en anhídrido acético	
No.7	Testigo	----	

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Tabla No. 7. Interpretación de cambios de coloración para flavonoides y antocianinas

Metabolito	Observar desarrollo inmediato de color
Flavonas y flavonoles	amarillo a rojo
Flavanonoles	rojo a magenta
Flavanonas	rojo, magenta, violeta, azul
Isoflavonas	amarillo
isoflavononas, chalconas y auronas	no dan coloración

* Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

ii. Cromatografía en capa fina

1. Diluir cerca de 0.5 g del extracto etanólico en 5 ml de etanol al 95% y filtrar la solución
2. Aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄
3. Preparar el estándar utilizando una solución de flavonoides al 0.05 %/ metanol (10 µl). (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).
4. Correr la cromatografía utilizando las fases móviles de Tabla No.8.
5. Realizar la detección como se muestra en la Tabla No. 9.
6. Interpretar resultados según Tabla No. 10.

Tabla No. 8. Fases móviles empleadas para cromatografía de capa fina para flavonoides y antocianinas

	Solventes	Proporciones
Fase Móvil	acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua	100:11:11:27
	n-butanol-ácido acético-agua	40:10:50
	acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua	50:7:3:30:10

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Tabla No. 9. Métodos de Detección empleados para cromatografía de capa fina para flavonoides y antocianinas

Detección	Sin tratamiento químico	UV 254nm	Fluorescencia zonas azules o amarillas
		UV 365 nm	Dependiendo la estructura fluorescencia amarillo, azul o verde
	Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG)	UV-365 nm	Fluorescencia intensa

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Tabla No. 10. Preparación de Reactivos para cromatografía de capa fina para flavonoides y antocianinas

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG)	Solución 1	Solución 2
	solución metanólica al 1 % de difenilboriloxietilamina (NP)	solución etanólica al 5 % de polietilenglicol 4000 (PEG)

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

c) Investigación de antraquinonas

i. Ensayos macro y semimicro

Prueba de Bornträger

1. Disolver 0.5 ml del extracto etanólico con 30 ml de agua destilada y filtrar
2. Extraer con 10 ml de benceno
3. Añadir 5 ml de solución de test de amonio a la fase bencénica a y agitar.
4. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo)

Prueba de Bortränger modificado

1. 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 %
2. Calentar 10 minutos en baño de maría a 60°C y añadir 0.5 ml de ácido acético glacial para acidificar
3. Extraer con 10 ml de benceno y adicionar 5 ml de solución de prueba de amonio a la capa bencénica



4. Agitar y observar cambios de color en fase alcalina (positivo: rojo, rosado).

II. Cromatografía en capa fina

1. Aplicar 10 µl del extracto etanólico disuelto en etanol al 95% en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄
2. Preparar el estándar utilizando una solución al 0.1 % en metanol de antraquinonas (10 µl). (Aloína, flangulina A/B, glucofrangulina A/B y sus agliconas, reina, aloe-emodina, extracto de sen)⁴⁶
3. Correr la cromatografía utilizando las fases móviles de Tabla No.11.
4. Realizar la detección como se muestra en la Tabla No. 12.

Tabla No. 11. Fases móviles empleadas para cromatografía de capa fina para antraquinonas

	Solventes	Proporciones
Fase móvil	acetato de etilo-metanol-agua	100:17:13
	acetato de etilo-metanol-agua	100:13.5:10

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Tabla No. 12. Métodos de Detección empleados para cromatografía de capa fina para antraquinonas

Detección	Sin tratamiento químico	UV 254nm	Fluorescencia
		UV 365 nm	fluorescencia amarilla o rojo-café.
	Solución etanólica de KOH al 5 o 10 %	UV-365 nm	Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja
		UV-365 nm	Antronas y antranolas: fluorescencia amarilla
		visible	Antronas y antranolas: zona amarillas

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

d) Investigación de cumarinas

I. Ensayos macro y semimicro

1. Medir 5 ml de extracto vegetal etanólico y agregar 1 ml de agua destilada hirviendo



2. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro y agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N
3. Observar bajo luz UV de 365 nm (positivo: fluorescencia azul o verde)

ii. Cromatografía en capa fina

- A. Diluir cerca de 0.5 g del extracto etanólico en 5 ml de etanol al 95% y filtrar la solución
1. Aplicar 10-15 μ l en una cromatoplaque de sílica gel 60 F₂₅₄.
 2. Preparar el estándar utilizando una solución de canela en metanol al 1 %, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina.
 3. Correr la cromatografía utilizando las fases móviles de Tabla No.13.
 4. Detectar metabolitos según la Tabla No. 14.

Tabla No. 13. Fases móviles empleadas para cromatografía de capa fina para cumarinas

Fase móvil	Solventes	Proporciones
		tolueno-acetato de etilo
	tolueno-éter (saturado con 10% de ácido acético) *	1:1

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Tabla No. 14. Métodos de Detección empleados para cromatografía de capa fina para cumarinas

Detección	Sin tratamiento químico	UV 254nm	Fluorescencia
		UV 365 nm	todas las cumarinas muestras una intensa fluorescencia azul o verde- azul.
	Solución etanólica de KOH al 5 o 10 %	UV-365 nm	fluorescencia azul o verde.

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

e) Investigación de cardenólicos y bufadienólicos

i. Presencia de lactonas insaturadas

1. Diluir cerca de 0.5 g del extracto etanólico en 1ml de etanol al 95% y filtrar
2. Colocar tres manchas de la solución (0.1, 0.2, 0.3 ml) sobre un papel filtro
3. Secar, agregar unas gotas del reactivo Kedde y esperar a que seque



4. Preparar el estándar utilizando un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80%.
5. Observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo).

ii. Presencia de azúcares 2-desoxigenadas

1. Tomar 1g del extracto etanólico y eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo y secar el residuo
2. Agregar 3 ml de reactivo Keller-Killiani y pasar a un tubo
3. Mezclar y resbalar 1-2 ml de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo y observar la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo).

iii. Cromatografía en capa fina

1. Diluir cerca de 0.5 g del extracto etanólico en 1ml de etanol al 95% y filtrar
2. Tratar el filtrado con ácido acético glacial y extraer en 3 porciones de 15 ml de diclorometano.
3. Filtrar los extractos sobre sulfato de sodio anhidro y evaporar
4. Disolver con 1 ml de diclorometano/etanol (1:1)
5. Aplicar 30-50 μ l en la cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄.
6. Preparar el estándar utilizando una solución de digoxina 5 mg/2 ml de metanol (20 μ l), lanatósido, A, B, C; oleandrin, k-strophantin.
7. Correr la cromatografía empleando los solventes para fase móvil como se indica en la Tabla No.15 y detectar metabolitos según la Tabla No. 14.

Tabla No. 15. Fases móviles empleadas para cromatografía de capa fina para cardenólicos y bufadienólicos

	Solventes	Proporciones
Fase móvil	acetato de etilo-metanol-agua	100:13.5:10
	acetato de etilo-metanol-agua	81:11:8
	acetato de etilo-metanol-etanol-agua	81:11:4:8

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Tabla No. 16. Métodos de Detección empleados para cromatografía de capa fina para cardenólicos y bufadienólicos

Detección	Sin tratamiento químico	UV 265 nm	Fluorescencia por cardenólicos
		UV 365 nm	La mayor fluorescencia es debida a los bufadienólicos, los glicósidos cardíacos no fluorescen
	Reactivo de Kedde	Detección del anillo lactónico de los cardenólicos zonas rosa o azul violeta en vis, los bufadienólicos no reaccionan	

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

f) Investigación de esteroides o triterpenoides

i. Reacciones de color

Liebermann Burchard

1. Aplicar unas gotas de ácido acético.
2. Aplicar 3 ml de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1)
3. Revisar resultados en Tabla No. 17

Tabla No. 17. Interpretación de cambios de coloración para esteroides o terpenoides

	Metabolito Secundario	Coloración
Resultados	Posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.	verde, azul verdoso
	Saponinas triterpenoidales	color rosado o púrpura

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Ácido tricloroacético

1. Se le añade a la muestra unos cristales de ácido tricloroacético
2. Revisar resultados en Tabla No. 18



Tabla No. 18. Interpretación de cambios de coloración para esteroides o terpenoides

	Metabolito Secundario	Coloración
Resultados	triterpenos tetracíclicos esteroides desarrollan color a 60°C triterpenos pentacíclicos a 110°C	color naranja, rojo, rojo oscuro

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Carr-Price

1. Pesar 1 mg de muestra
2. Agregar cloroformo
3. Agrega 2 ml de tricloruro de antimonio al 30% en cloroformo.
4. Revisar resultados en Tabla No. 17

Tabla No. 19. Interpretación de cambios de coloración para esteroides o terpenoides, según prueba de Carr-Price

	Metabolito Secundario	Coloración
Resultados	posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.	color azul,

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005

g) Investigación de saponinas

i. Prueba de espuma

1. Colocar muestras y estándares como se muestra en la Tabla No. 20.
2. Agregar 10 ml de agua destilada
3. Calentar en baño de maría (60°C) durante 30 minutos y enfriar
4. Tapar los tubos y agitar vigorosamente 30 a 40 segundo
5. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos y observar la formación de capa de espuma



Tabla No. 20. Evaluación de reacciones de coloración para saponinas

Tubo	Agregar	Observar
No.1	100 mg de material vegetal pulverizado y seco	Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.
No.2	2 ml de control de saponinas (0.5 %)	
No.3	2 ml de agua	

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

ii. Cromatografía en capa fina

1. Diluir cerca de 0.5 g del extracto etanólico en 5 ml de etanol al 95%
2. Proceder a aplicar 15-20 μ l en una cromatoplaaca de silicagel 60 F₂₅₄
3. Preparar Estándar empleando solución de saponinas al 0.1 % / metanol y colocar 15-20 μ l en la placa
4. Correr la cromatografía con los solventes que se indican en la Tabla No. 21
5. Usar métodos de detección según Tabla No. 22. ¹

Tabla No. 21. Fases móviles empleadas para cromatografía de capa fina para saponinas

	Solventes	Proporciones
Fase móvil	cloroformo-metanol-agua	64:50:10
	n-butanol-ácido acético-agua	50:10:40

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

¹ Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Tabla No. 22. Métodos de Detección empleados para cromatografía de capa fina para saponinas

Detección	Reactivo de Liebermann-Burchard (UV-365 o vis)	saponinas esteroidales	zonas azules y verdes
		Triterpenoides	rojas y violetas
	Reactivo de Komarowsky	zonas azules, amarillas y rojas	
	Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico	zonas azules, violetas, amarillentas	

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



E. Diseño Estadístico

1. Tipo de estudio

La primera parte de la investigación es de tipo observacional descriptivo transversal ya que pretende conocer la composición fitoquímica de la primera planta de estudio *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa).

La segunda comprende dos tipos de estudio, el primero es de tipo observacional descriptivo transversal ya que pretende conocer la composición fitoquímica de las plantas de estudio y el otro de tipo experimental inferencial transversal ya que pretende conocer el efecto que tiene la presencia de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) sobre el crecimiento de los organismos evaluados.

2. Variables de interés

Parte I

Metabolitos secundarios contenidos en el extracto etanólico de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

a) Variable independiente: especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) de la flora de Guatemala

b) Variable dependiente: metabolitos secundarios del extracto etanólico la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa).

Parte II

Metabolitos secundarios contenidos en el extracto etanólico de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan).

Respuesta de los organismos de estudio frente a las distintas pruebas de tamizaje de actividad biológica.



a) Variable independiente: especie de la flora de Guatemala *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan).

b) Variable dependiente: metabolitos secundarios y actividad biocida del extracto etanólico de la planta *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan).

4. Validez del método

Parte I

No se incluye por el tipo de investigación.

Parte II

Cada una de las actividades evaluadas dentro del Tamizaje de Actividades Biocidas, así como los ensayos para el tamizaje fitoquímico contemplan dentro del método un control positivo y uno negativo.

5. Diseño de la Investigación

(a) Composición Fitoquímica

Evaluación: Se evalúa en forma descriptiva de acuerdo a los resultados del tamizaje fitoquímico.

Análisis: Cambio de coloración de la muestra vegetal en reacciones y en cromatografía de capa fina, comparada con testigos y coloración de estándares específicos para cada prueba.

(b) Tamizaje de Actividades antifúngicas y antibacterianas

Evaluación: La determinación y detección de la concentración de los extractos de la planta a estudiar tiene de base una concentración de 1mg/ml; para antifúngica y 10 mg/ml; para antibacteriana. En caso de observarse una actividad positiva significativa ($p > 0.10$) se realizan diluciones seriadas para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). El diseño es totalmente al azar con 4 replicas por cada



microorganismo a probar (Anexo No.3) para un nivel de significancia $\alpha=0.10$, para el experimento, se realizan cuatro repeticiones para cada actividad correspondiente a cada extracto.

Análisis: Se espera que en las cuatro repeticiones se observe el 100% de mortandad de los microorganismos (Anexo No. 3), de ser así se procede a realizar las diluciones para medir la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Prueba de hipótesis binomial de la respuesta crecimiento (actividad negativa) o inhibición de crecimiento (actividad positiva), se espera que las cuatro replicas den actividad positiva para rechazar H_0 y concluir que los metabolitos del extracto tienen actividad.

H_0 : $p=q= 0.5$ (No tiene actividad)

H_a : $p>q$

(c) Actividad Citotóxica

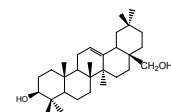
Evaluación: Se realiza un ensayo de citotoxicidad con *Artemia salina* donde inicialmente se prueba una solución del extracto en agua de mar, con cuatro repeticiones, a una concentración 0.01 g/ ml. En caso de que se observe una actividad significativa positiva ($p>0.1$) se determina la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) haciendo diluciones seriadas a partir de la concentración inicial probada.

Análisis: Se espera que en las cuatro repeticiones iniciales se observe el 100% de mortandad de los nauplios de *A. salina*, en caso sea así se procede a realizar las diluciones.

Prueba de hipótesis binomial de la respuesta crecimiento (actividad negativa) o inhibición de crecimiento (actividad positiva), se espera que las tres replicas den actividad positiva para rechazar H_0 y concluir que los metabolitos del extracto tienen actividad.

H_0 : $p=q= 0.5$ (No tiene actividad)

H_a : $p>q$



VIII. Resultados

Parte I

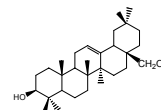
Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios mayoritarios del extracto etanólico de las hojas de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Tabla No. 23 Identificación y Colecta de Material Vegetal

Nombre Científico	<i>Perrottetia longistylis</i>
Autoridad	Rose
Nombre Común	Manteco, Capulaltapa
Lugar de colecta	Volcán Acatenango
Departamento de Colecta	Sacatepéquez
Altitud	2,500 msnm
Coordenadas Geográficas	14°32'22.66" N; 90°52'31.96" O
Fecha de colecta	7 de febrero 2007
Colectado por	Ingeniero Mario Veliz
Fecha de Determinación	10 de febrero 2007
Identificada por	Ingeniero Mario Veliz
Número de Inventario del Herbario BIGU	MV 18318-18319

Tabla No.24 Secado de Materia Vegetal y Obtención de extracto etanólico con Soxhlet

Parte empleada	Hojas
Peso del material seco y molido	900 g
Porcentaje de Humedad	10.01
Solvente empleado	Etanol al 95%
Peso de extracto seco crudo obtenido	90.0 g
Porcentaje de Rendimiento	10 %



**Tabla de Resultados No. 25 Partición líquido-líquido de extracto etanólico
Perrottetia longistylis (Manteco, Capulaltapa)**









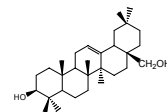
Producto obtenido	Peso (g)	% de materia vegetal	% de Extracto Etanólico seco	Fotografías
Fracción soluble en diclorometano	40.7	45.22	4.52	
Fracción soluble en acetato de etilo	6.07	6.74	0.0674	
Fracción soluble en agua	15.02	16.69	0.1669	

Tabla No. 26 Resumen de las Cromatografías en columna realizadas a la partición soluble en diclorometano de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Nombre	Analito	Técnica empleada	Fracción	Resumen de resultados	Fotografías
A	Fracción diclorometánica	Cromatografía al Vacío Fase Estacionaria: Gel de Capa fina Fase Móvil: Hexano con gradiente creciente de Acetato de etilo	27	Cromatografía B	
			26	Cromatografía C	
			24	Cromatografía D	
			20	Cromatografía E	
			16	Cromatografía F	
			14	Cromatografía G	
			11	Cromatografía H	
B	Fracción 27A	Cromatografía Flash o Media Presión Fase Estacionaria: Silica capa fina Fase Móvil: hexano con gradiente creciente de acetona	1-1	Glucósido del β -sitosterol	
			1-2	Triterpeno	
			1-3	Mezcla blumenoles	
			1-4	Eritodiol (3-beta,28-dihidroxi-olean-12-en)	
C	Fracción 26A	Cromatografía Flash o Media Presión Fase Estacionaria: Gel capa fina Fase Móvil: Diclorometano con gradiente creciente de acetona	1-1	cera	
			1-2	cera	
			1-3	cera	
			1-4	cera	
			13	cera	
			33	cera	
D	Fracción 24A	Cromatografía de exclusión molecular (CEM) Fase Estacionaria: Sephadex Fase Móvil: mezcla de <i>n</i> -hexano-cloroformo-metanol (2:1:1)	8	luteína y β -caroteno	
			12		
			16	cera	
			20-1	Uvaol	
			20-2		
			20-3	Triterpeno de la serie del Ursano	
			20-4	Triterpeno de la serie del Ursano	
			24	cera	
E	Fracción 20A	Cromatografía de exclusión molecular (CEM) Fase Estacionaria: Sephadex Fase Móvil: mezcla de <i>n</i> -hexano-cloroformo-metanol (2:1:1)	17	Triterpeno de la serie del oleano Con 3 grupos -OH Y 1 grupo -CH ₂ OH	
			22	cera	



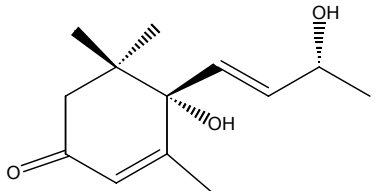
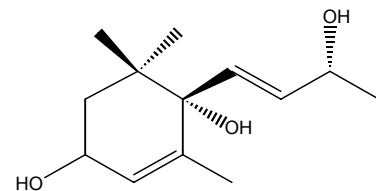
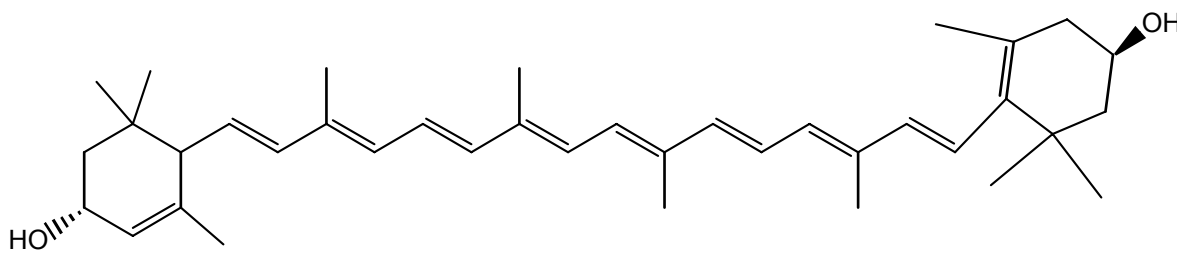
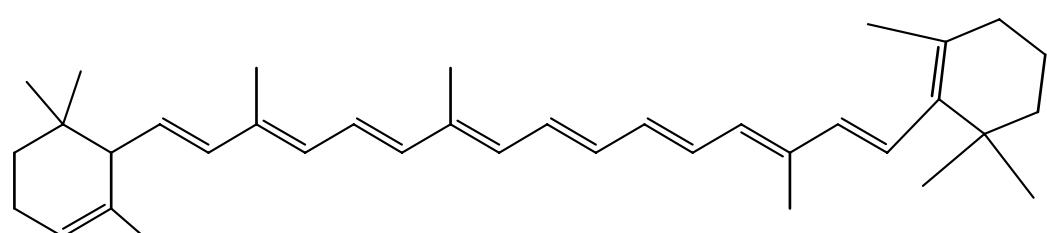
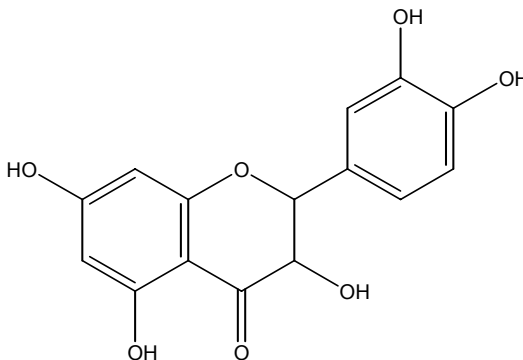
Continuación Tabla de Resultados No. 26

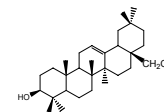
Nombre	Analito	Técnica empleada	Fracción	Resumen de resultados	Fotografías
F	Fracción 16 A	Cromatografía de exclusión molecular (CEM) Fase Estacionaria: Sephadex Fase Móvil: mezcla de <i>n</i> -hexano-cloroformo-metanol (2:1:1)	22	Ácidos grasos y ceras	
G	Fracción 14A	Cromatografía de exclusión molecular (CEM) Fase Estacionaria: Sephadex Fase Móvil: mezcla de <i>n</i> -hexano-cloroformo-metanol (2:1:1)	8-3	β -amirina	
			11 a la 16	Ácidos grasos	
			17-1	Cera	
			17-2	Cera	
			17-3	Cera	
			17-4	6, 14, 15-trihidroxiabieta-8, 11, 13-trieno	
			21-1	β -sitosterol	
21-4	α -amirina				
H	Fracción 11A	Cromatografía de exclusión molecular (CEM) Fase Estacionaria: Sephadex Fase Móvil: mezcla de <i>n</i> -hexano-cloroformo-metanol (2:1:1)	9	cera	
			19	Ácido graso de 13 Carbonos	

Tabla No. 27 Cromatografías en columna realizadas a las partición soluble en acetato de etilo de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Nombre	Analito	Técnica empleada	Fracción	Resumen de resultados	Fotografías
I	Fracción del extracto etanólico soluble en acetato de etilo	Cromatografía por gravedad Fase Estacionaria: Gel fina Fase Móvil: Hexano con gradiente creciente de acetato de etilo	11	Se procede a agrupar fracciones de interés para realizar cromatografía en columna (Cromatografía J)	
			12		
			13		
			14		
J	Fracciones 11, 12, 13, 14 de la Cromatografía I	Cromatografía Flash o media presión Fase Estacionaria: Gel fina Fase Móvil: Hexano con gradiente creciente de acetato de etilo	19	Triterpeno Δ^{12} Ursano 2 Me doblete 3 R-OH	
			23	Esterol 1-OH y 1 insaturación sin protones vecinos	
			27	Triterpeno con dos -OH con varios insaturaciones	
			31	cera	
			33	Triterpeno	
			37	Quercetina	

Tabla No. 28 Estructuras de Compuestos Mayoritarios de la parte del Extracto Etanólico de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) soluble en Diclorometano y en Acetato de Etilo

Blumenoles	
	
Figura No.9 Estructura Blumenol A	Figura No.10 Estructura Blumenol
Fracción 1B-3	Fracción 1B-3
Carotenoides	
	
Figura No.11. Estructura Luteína	
Fracción 8 D 12D	
	
Figura No.12. Estructura β-caroteno	
Fracción 8 D 12D	
Flavonoides	
	
Figura No.20. Estructura Quercetina	
Fracción 37 J	

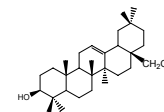


Continuación Tabla No. 28

Terpenos	
Diterpeno	
Figura No.13. 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8,11,13-trieno	
Fracción 17G-4	
Triterpenos	
Serie del Ursano	
Figura No.14. Estructura α -amirina	Figura No.15. Estructura Uvaol (3-beta,28-dihidroxi-urs-12-en)
Fracción 21G-4	Fracciones 20D-1 y 20D-2
Serie del Oleano	
Figura No.16. Estructura β -amirina	Figura No.17. Estructura Eritodiol (3-beta,28-dihidroxi-olean-12-en)
Fracción 8G-3	Fracción 1B-4
Esteroles	
Figura No.18. Estructura β -Sitosterol	Figura No.19. Estructura Glucósido del β -Sitosterol
21G-1	1 B -1

Tabla No.29 Revisión Bibliográfica de las Actividad Reportada en la Bibliografía

Grupo de Metabolito	Metabolito	Actividad Reportada en la Bibliografía
Apocarotenoides	Blumenoles	<ul style="list-style-type: none"> • Antiulcerogénica, antibacteriana, citotóxica y antiparasitaria • Regulador endógeno
Carotenoides	β-caroteno	<ul style="list-style-type: none"> • Provitamínica A, antioxidante, disminuye daño del ADN y permite una mayor actividad reparadora • Contribuye en la prevención de diversas enfermedades degenerativas humanas como la aterosclerosis o incluso el cáncer. • Son potenciadores positivos de la respuesta inmune. • Aumentan la proporción entre los linfocitos CD4 y CD8, que es muy bajo en enfermos de VIH. • Participan en la elaboración de enzimas en el hígado y de hormonas sexuales y suprarrenales.
	Luteína	<ul style="list-style-type: none"> • Puede disminuir el riesgo de la pérdida de visión relacionado con la edad ya que protege la retina del daño de la foto-oxidación ocasionada por la luz azul. • Reduce el riesgo de enfermedades arteriales. • Reduce la oxidación del colesterol reduciendo así la probabilidad de obstrucción arterial. • Puede reducir el riesgo de quemaduras de sol y cáncer de piel • Protege contra el daño ocasionado por el efecto de la radiación uv.
Flavonoides	Quercetina	<ul style="list-style-type: none"> • Capaz de interferir con la generación de especies activas y/o dificultar el curso de la cascada peroxidativa (que convierte la hipoxantina en xantina y ésta en ácido úrico) • Se ha descrito como agente secuestrador de radicales libres e inhibidor de xantina oxidasa, jugando por ello un papel hepatoprotector



Continuación Tabla No.26

Grupo de Metabolito	Metabolito	Actividad Reportada en la Bibliografía
Triterpenos	<ul style="list-style-type: none"> • Antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral, antituberculosa, anti-VIH y citotóxica frente a diferentes tipos de células cancerígenas y también actividad anti-VIH 	
	Triterpenos de la serie del Oleano y el Ursano (Uvaol, Eritodiol, α-amirina, β-amirina)	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria y supresora, tanto de la promoción tumoral como de la síntesis de inmunoglobulinas, actividad hepatoprotectora e inductora de la síntesis de colágeno, actividad antiartrítica, anti-VIH, antidiabética, antiulcerosa, antibacteriana, antifúngica hipolipidémica, antiarterioesclerótica. • Actividad citotóxica frente a varias líneas celulares de tumores humanos como las de leucemias linfocíticas P-388 y L-1210, y frente al carcinoma humano A-549, así como citotoxicidad frente a las células tumorales humanas de colon (HCT-8) y mama (MCF-7). • Inhibe el crecimiento de <i>Candida albicans</i> y <i>Microsporium lenosum</i> • La aplicación tópica inhibe la iniciación y promoción del crecimiento tumoral inducido por TPA. • Inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr, lo que sugiere que pueden ser valiosos agentes inhibidores de la promoción de tumores han mostrado un perfil farmacológico similar al de los retinoides y esteroides
	α-amirina y β-amirina	<ul style="list-style-type: none"> • Antibacterianas, antiinflamatoria significativa y dependiente de la dosis y actividad en contra de la promoción tumoral.
Esteroles	β-sitosterol y su glucósido	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad antiinflamatoria y antipirética, con un efecto similar a la hidrocortisona y la oxifenbutazona • Se ha descrito como posible fármaco para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (BPH por sus siglas en inglés) ya que aparentemente reduce los niveles de colesterol en la próstata.
Diterpeno	6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidora de la inducción del virus Epstein-Barr. • Reducen la carcinogénesis inducida en ratones, resultados que hacen que compuestos de este tipo sean agentes potenciales quimiopreventivo

Parte II

Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan), evaluación de su actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica

Tabla de No. 29 Identificación y Colecta de Material Vegetal

Nombre Científico	<i>Euonymus enantiophylla</i>
Autoridad	(Donn. Sm.) Lundell
Nombre Común	Alís, Rou'j Xiwáan
Lugar de colecta	Volcán San Pedro, Municipio de San Pedro La Laguna
Departamento de Colecta	Sololá
Altitud	2,477 msnm
Coordenadas Geográficas	14°39'45.5"N 91°16'18.2"O
Fecha de colecta	Junio 2006
Colectado por	Licenciado Pedro Pardo Guardarecursos Marcos Porón
Fecha de Determinación	julio 2006
Identificada por	Ingeniero Mario Veliz
Número de Inventario del Herbario BIGU	MV 16243

Tabla de No.30 Secado de Materia Vegetal y Obtención de extracto etanólico con Soxhlet

Parte empleada	Hojas
Peso del material Seco y molido	40 g
Porcentaje de Humedad	8.5
Solvente empleado	Etanol al 95%
Peso de extracto etanólico seco crudo obtenido	4.5 g
Porcentaje de Rendimiento	11.25 %

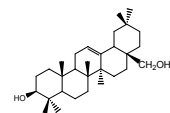
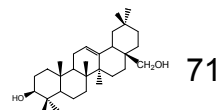


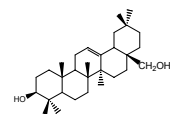
Tabla No.31 Resultados Tamizaje Fitoquímico del Extracto

Familia de Metabolito	Prueba			Resultados Esperados	Resultados Observados	Interpretación
Alcaloides	Reactivo de Mayer			Color blanco a crema	Al compararlo con el testigo presenta mas ppt y coloración del sobrenadante mas claro	(+)
	Reactivo de Dragendorff			Color rojo a naranja	Al compararlo con el testigo presenta mas ppt y coloración del sobrenadante mas naranja	(+)
	Reactivo de Wagner			Color marrón	Al compararlo con el testigo presenta mas ppt y coloración del sobrenadante mas café	(+)
	Cromatografía en Capa fina	Sin tratamiento químico	UV 254 nm	Fluorescencia	Fluorescencia	(+)
			UV 365 nm	Algunos fluorescen azul o amarillo	Fluorescencia amarilla	(+)
		Con Tratamiento Químico	Reactivo de Dragendorff	Zonas cafés o naranjas en vis (los colores no son estables)	Manchas naranjas y cafés	(+)
Antraquinonas	Prueba de Börtrager			Color rojo o rosado	Coloración rojiza	(+)
	Prueba de Börtrager Modificado			Color rojo o rosado	Coloración rojiza	(+)
	Cromatografía en Capa fina	Sin tratamiento químico	UV 254 nm	Fluorescencia	Fluorescencia	(+)
			UV 365 nm	Fluorescencia amarilla o rojo-café.	Fluorescencia amarilla y rojo-café	(+)
		Solución etanólica de KOH al 5 o 10%	UV 365 nm	Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja	Fluorescencia roja	(+)
			visible	Antranas y antranolas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla	Zona rojo-café	(+)
Cumarinas	Hidróxido de potasio 0.5N Observar bajo luz UV de 365 nm			Fluorescencia azul o verde	Fluorescencia verde	(+)
	Cromatografía en Capa fina	Sin tratamiento químico	UV 254 nm	Fluorescencia	Fluorescencia	(+)
			UV 365 nm	Intensa fluorescencia azul o verde-azul.	Fluorescencia verde-azul	(+)
		Solución etanólica de KOH al 5 o 10%	UV 365 nm	Fluorescencia azul o verde.	Fluorescencia verde	(+)



Continuación Tabla No. 31 Resultados Tamizaje Fitoquímico del extracto

Familia de Metabolito	Prueba			Resultados Esperados	Resultados Observados	Interpretación
Cardenólicos y bufadienólicos	Presencia de lactonas insaturadas reactivo Kedde.			Mancha o anillo púrpura:	No se observó formación mancha o anillo púrpura	(-)
	Presencia de azúcares 2-desoxigenadas Keller-Killiani			Anillo púrpura en la interfase	No se observó anillo púrpura en la interfase	(-)
	Cromatografía en Capa fina	Sin tratamiento químico	UV 254 nm	Fluorescencia por cardenólidos	No se observó Fluorescencia	(-)
			UV 365 nm	Fluorescencia debida a los bufadienólidos Los glicósidos cardíacos no fluorescen	No se observó Fluorescencia	(-)
		Con Tratamiento Químico	Reactivo de Kedde	Detección del anillo lactónico de los cardenólidos Zonas rosa o azul violeta en vis, los bufadienólidos no reaccionan	No se observó	(-)
Saponinas	Prueba de Espuma			Capa de espuma mayor de 3 cm persistente en la superficie líquida después de 30 minutos	No se observó presencia de espuma mayor de 0.5 cm	(-)
	Cromatografía en Capa fina	Con Tratamiento Químico	Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico	Zonas azules, violetas, amarillentas	No se observaron zonas azules, violetas o amarillentas	(-)
Principios amargos	Cromatografía en Capa fina	Con Tratamiento Químico	vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico	Zonas rojas-violetas, cafés-rojas, azules-verdes	No se observaron zonas	(-)
		Reactivo Liebermann	uv-363	Manchas gris, café	No se observaron manchas grises o cafés	(-)
			vis	Manchas café oscuro, gris	No se observaron manchas café oscuro o grises	(-)



Continuación Tabla No. 31 Resultados Tamizaje Fitoquímico del extracto

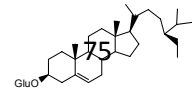
Familia de Metabolito	Prueba		Resultados Esperados	Resultados Observados	Interpretación	
Taninos	Adición de solución de gelatina 1%p/v		Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración	No se observó la formación de ppt ni cambio de coloración	(-)	
	Adición de disolución de gelatina-sal					
	Adición de FeCl3 al 10%p/v		grisáceo-negro: catecol negro-azulado: pirogalol	No fue observada coloración característica	(-)	
Flavonoides y antocianinas	H2SO4 concentrado		Reacciones, cambios de color y/o formación de ppt comparados con testigo	Mas azul que el testigo	(+) flavanonas	
	FeCl3 al 10% p/v			Sin cambio	(-)	
	HCl concentrado y calentar en Baño María por 5 min			Azulado	(+) flavanonas	
	HCl concentrado y Mg metálico			Turbidez Solución azulada	(+) flavanonas	
	Cromatografía en Capa fina	Sin tratamiento químico	UV 254 nm	Fluorescencia zonas azules o amarillas	Fluorescencia amarilla	(+)
			UV 365 nm	Dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde	Fluorescencia amarilla	(+)
	Con revelador	Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG)	Fluorescencia intensa Flavonoles (amarillo-verde, anaranjado-amarillo), Flavonas (anaranjado)	Fluorescencia amarilla mas intensa que sin tratamiento químico	(+)	
Esteroides o Triterpenoides	Liebermann-Bürchard		Rosado, púrpura, verde o azul verdoso	Se observó cambio de color	(+)	
	Ácido Tricloroacético		Color naranja, rojo o rojo oscuro	Se observó cambio de color	(+)	
	Carr- Price		Color azul	Se observó cambio de color	(+)	

Interpretación de Resultados: (+): presencia, (-): ausencia; de la Familia de Metabolitos ensayada. Pueden verse fotografías del Tamizaje fitoquímico en Anexo No.5

Tabla No. 32 Resultados Tamizaje de Actividades Biocidas

Organismo de estudio		Especie Representante	Código Cepa	Resultados	Actividad
Bacteria	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	Crecimiento MOO	(-)
	Gram -	<i>Escherichia coli</i>	-----	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028	Crecimiento MOO	(-)
Hongo	Miceliar	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-----	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Micobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	Crecimiento MOO	(-)
	Levaduriforme	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	CCQQ C13	Crecimiento MOO	(-)
	Filamentosos	<i>Aspergillus flaus</i>	CCQQ A75	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Aspergillus. niger</i>	-----	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	-----	Crecimiento MOO	(-)
	Dermatofitos	<i>Trichophyton. rubrum</i>	-----	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Microsporum gypseum</i>	-----	Crecimiento MOO	(-)
		<i>Sacharomices cereviciae</i>	-----	Crecimiento MOO	(-)
Organismo Crustáceo	<i>Artemia salina</i>		-----	0% mortandad	(-)

Ver interpretación de resultados en Anexo No.3. Pueden observarse fotografías en Anexo No. 5



IX. Discusión de Resultados

Obtención de los Extractos

Para la realización del estudio se trabajó con dos plantas de la flora de Guatemala pertenecientes a la Familia Celastraceae, para la primera parte se empleó la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) y para la segunda la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan). Como se muestra en las Tablas No.23, 24, 29 y 30 en los Resultado, las plantas fueron identificadas y posteriormente recolectadas en el área boscosa del Volcán Acatenango en el Departamento de Chimaltenango y en el Volcán de San Pedro en el Departamento de Sololá. Para garantizar la correcta identificación de las plantas a colectar fueron comparadas muestras de las plantas a recolectar con especímenes botánicos del Herbario BIGU para afirmar la identidad de dichas especies. Ambos extractos se obtuvieron a partir de las hojas secas y molidas empleando el método de extracción exhaustiva usando equipo Soxhlet y etanol al 95% como solvente, posteriormente fue eliminado el solvente a presión reducida.

Una vez obtenidos los extractos etanólicos crudos se trabajó cada planta por separado con distinta metodología y cubriendo distintos objetivos, por ello la discusión de resultados se encuentran dividida en dos partes, la Parte I incluye lo realizado con la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) que consistió en el aislamiento y la elucidación estructural de metabolitos secundarios mayoritarios del extracto etanólico de sus hojas y la Parte II que incluye lo realizado con la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) que consistió en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de esta especie y la evaluación de la actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica de dicho extracto.

Parte I: Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios mayoritarios del extracto etanólico de las hojas de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

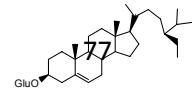
Partición líquido-líquido del extracto etanólico crudo

Se realizó la partición líquido-líquido empleando las mezclas de solventes agua-diclorometano, y acetato de etilo-agua, para lo cual se resuspendió el extracto etanólico crudo en agua y se extrajo tres veces con diclorometano, obteniéndose una fracción orgánica soluble en CH_2Cl_2 y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevó a sequedad obteniéndose 40.7g del extracto diclorometánico, mientras que a la fracción acuosa se le realizó una partición con acetato de etilo saturado con agua obteniéndose 6.07 g de fracción soluble en acetato de etilo, la fase acuosa fue congelada a -50°C y posteriormente liofilizada obteniéndose así 7.5 g del extracto acuoso.

En la Tabla No.25 en los resultados puede observarse que la fracción que presentó mayor rendimiento fue la soluble en diclorometano constituyendo un 45.22% del extracto etanólico crudo. A pesar de este resultado se esperaba que la fracción con un mayor rendimiento fuera la acuosa, ya que de los solventes empleados para la partición, es el agua el solvente que posee una polaridad más cercana a la del etanol el cual fue el solvente empleado para la extracción.

Fraccionamiento de las particiones

Las fracciones a las cuales se les realizó la partición fueron las solubles en acetato de etilo y en diclorometano obteniéndose en ambas metabolitos de interés. Para ello la fracción soluble en diclorometano se sometió a una serie de cromatografías sobre sílica gel con sistemas de elusión de polaridad variable con mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo; cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20 eluída con una mezcla de *n*-hexano/metanol/cloroformo (2:1:1); cromatografías de media presión y cromatografías sobre placas preparativas, utilizando como fase móvil mezclas de distintos disolventes como: *n*-hexano/éter dietílico, *n*-hexano/acetato de etilo y diclorometano/acetona. Un resumen de dichas cromatografías se muestra en la Tabla No. 26 y 27. Así también la fracción soluble en acetato de etilo se sometió a cromatografía en columna en gel fina y Cromatografía en Columna Flash o media



presión en ambas se empleo como Fase Móvil: Hexano con gradiente creciente de acetato. Los componentes de las cromatografías se evaluaron mediante el uso de Cromatografía de Capa Fina, empleando como fases móviles mezclas de solventes en proporciones y polaridades acordes con las diferentes fracciones que se iban obteniendo. Fue empleado revelador óleum y fueron agrupándose las fracciones dependiendo de las similitudes en coloración y Rf de las manchas.

Identificación de los metabolitos mayoritarios por Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H)

Una vez aislados los distintos componentes obtenidos a partir de las fracciones se procedió a llevar a cabo la identificación de los mismos mediante el uso de RMN ¹H. Se aislaron 46 compuestos de las fracciones provenientes de las particiones solubles en diclorometano y en acetato de etilo, entre los que se encuentran ácidos grasos, ceras, así como de metabolitos secundarios como apocarotenoides, carotenoides, triterpenos entre los cuales se encontraron algunos esteroides.

Algunos de los metabolitos secundarios aislados eran metabolitos reportados previamente en la bibliografía científica por lo que fue posible identificarlos a partir de la comparación de sus espectros de RMN ¹H. Las estructuras propuestas para dichos metabolitos pueden observarse en la Tabla No.28 en los resultados, las estructuras pudieron ser propuestas al identificar señales características en los espectros de los compuestos aislados. Dichos metabolitos eran dos distintos apocarotenoides: blumenol A (Figura No.9) y el blumenol de la Figura No.10, dos carotenoides: luteína y β-caroteno (Figura No.11 y 12, respectivamente). Terpenos como el diterpeno 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8,11,13-trieno y distintos triterpenos entre los que destacan de la serie del Ursano la α-amirina y el Uvaol (3-beta,28-dihidroxi-urs-12-en) (Figura No.13 y 14, respectivamente), así como de la serie del Oleano el Eritodiol y la β-amirina (Figura No.15 y 16, respectivamente), además dentro de los triterpenos identificados se encontraron esteroides como el β-sitosterol y el glucósido del β-sitosterol (Figura No.17 y 18, respectivamente), y el flavonoide Quercetina. Para estos metabolitos existen reportadas diversas actividades que se comentan posteriormente. Las señales

características con las que se pudo identificar los compuestos aislados para los extractos se detallan a continuación:

Ceras y Ácidos Grasos

Se identificaron como ceras o ácidos grasos los compuestos correspondientes a las fracciones 1C-1, 1C-2, 1C-3, 1C-4, 13C, 33C, 16D, 24D, 22E, 22F, 11G, 12G, 13G, 16G, 17G-1, 17G-2, 17G-3, 9H, 19H de la parte soluble en diclorometano y el 31J de la parte soluble en acetato de etilo. El espectro de RMN ¹H de estos se caracteriza por una zona de alto campo, que no excede las 2.5 ppm, congestionada pero en menor grado que lo observado para triterpenos y esteroides, estas señales corresponden a los protones alquílicos del esqueleto carbonado de ceras y ácidos grasos. Los cuales normalmente no presentan ninguna señal característica por arriba de 2.5 ppm, por lo que pueden confundirse fácilmente con triterpenos cuando éstos no poseen señales arriba de 2.5 ppm.

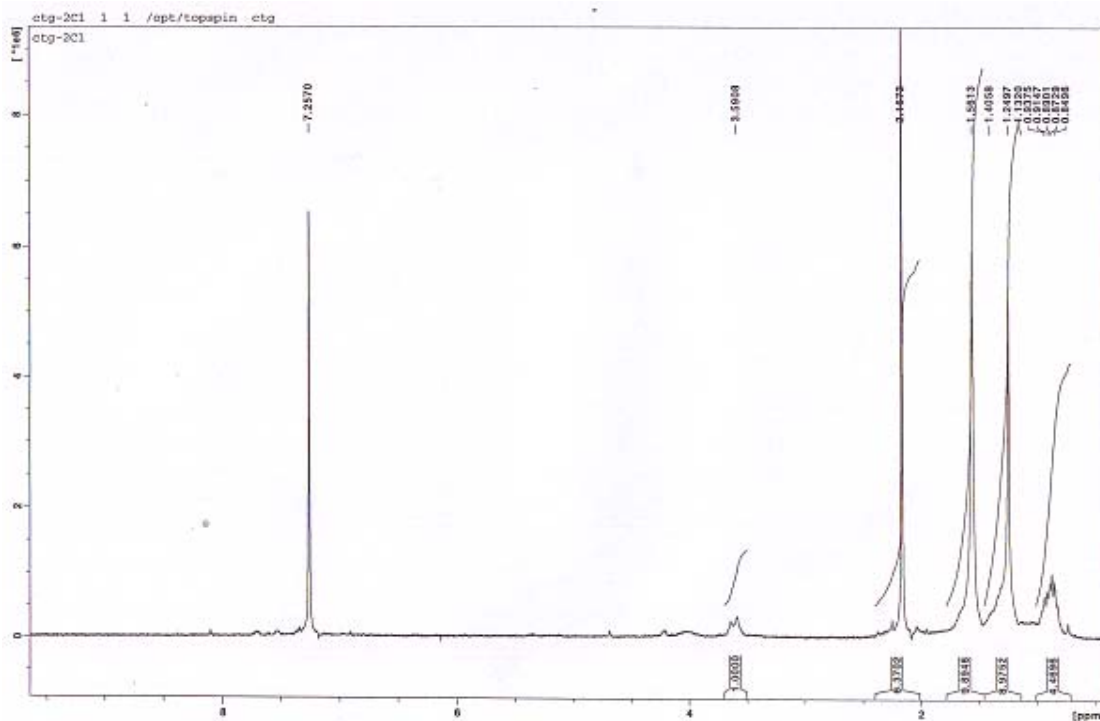


Figura No. 21. Espectro RMN ¹H (fracción 2C-1) característico de ceras y ácidos grasos

Apocarotenoides (Blumenoles de las Figuras N.9 y No.10)

Los compuestos identificados como apocarotenoides fueron los blumenoles de las Figuras N.9 y No.10 que se observaron como una mezcla en la fracción 1B-3 aislados de la parte del extracto soluble en diclorometano. El espectro de RMN ^1H de estos compuestos presentan señales características en zona de alto campo correspondiente a los protones alquílicos del esqueleto carbonado que no excede las 2.5 ppm. Además posee señales características arriba de las 2.5 ppm como lo son las señales de sus grupos hidroxilo cerca de 4 ppm, así también las dos señales correspondientes a las insaturaciones entre carbono y carbono que se observan entre 5.5 y 6 ppm.

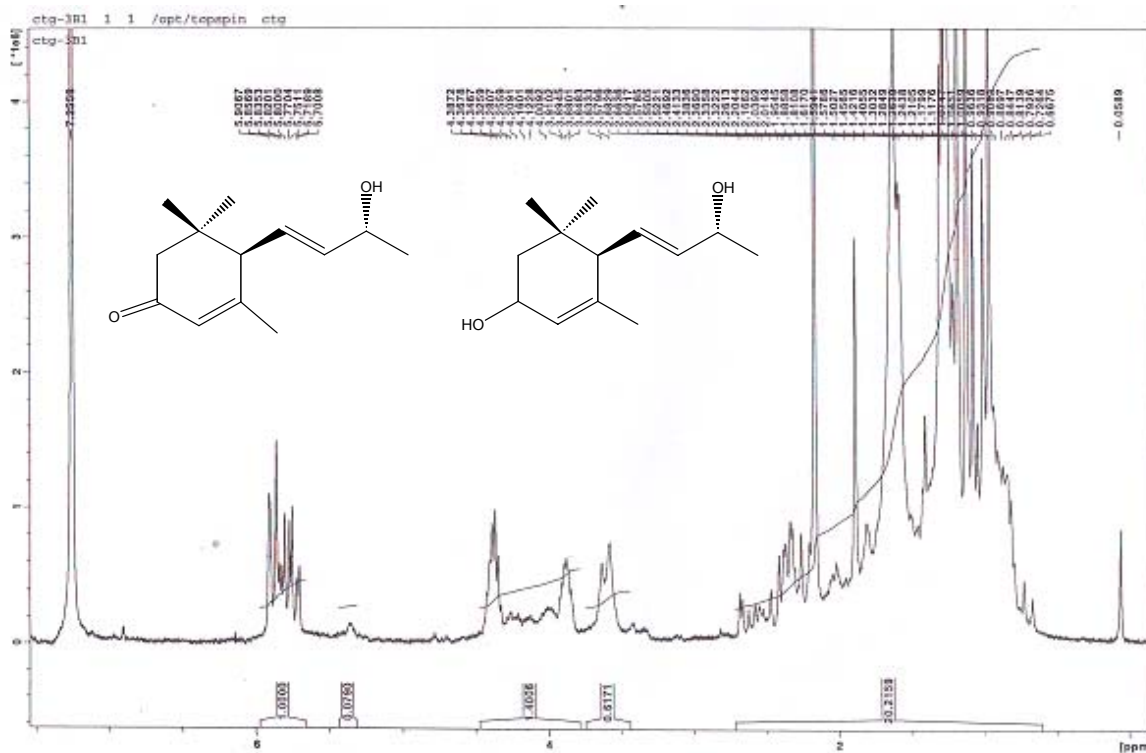


Figura No.22. Espectro RMN ^1H y estructura de mezcla de Blumenoles, Blumenol A (izquierda) y Blumenol (derecha) Fracción 1B-3

Carotenoides

Se identificaron como carotenoides los compuestos correspondientes a las fracciones 8D y 12D provenientes de la parte del extracto soluble en diclorometano que se observaron como una mezcla. Los espectros de los carotenoides se caracterizan por una zona de alto campo congestionada en mayor grado que lo observado para

triterpenos y esteroides, esta zona de alto campo no excede las 2.5 ppm y son las señales correspondientes a los protones alquílicos del esqueleto carbonado. Además se observan las señales de los grupos hidroxilo en torno a las 4 ppm, así como las señales de los dobles enlaces conjugados que se observan entre 5.5 y 6.5 ppm

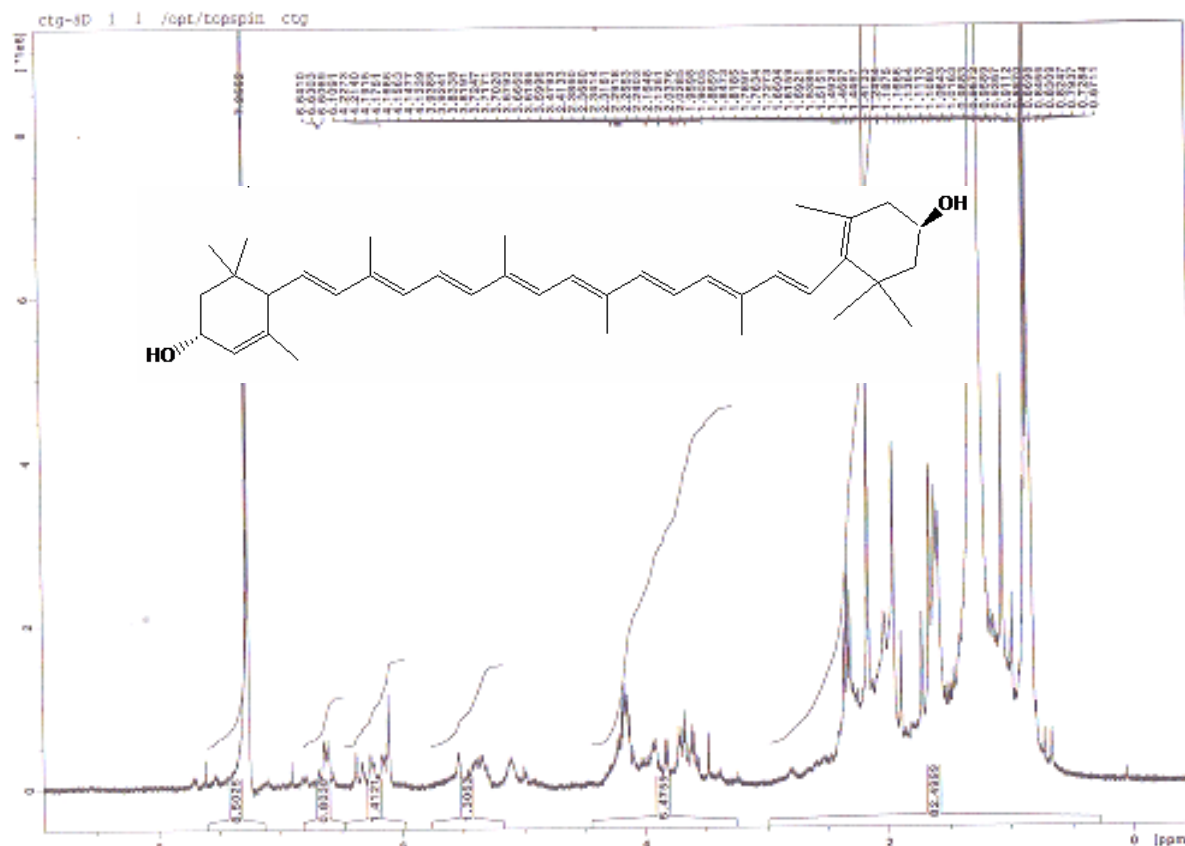
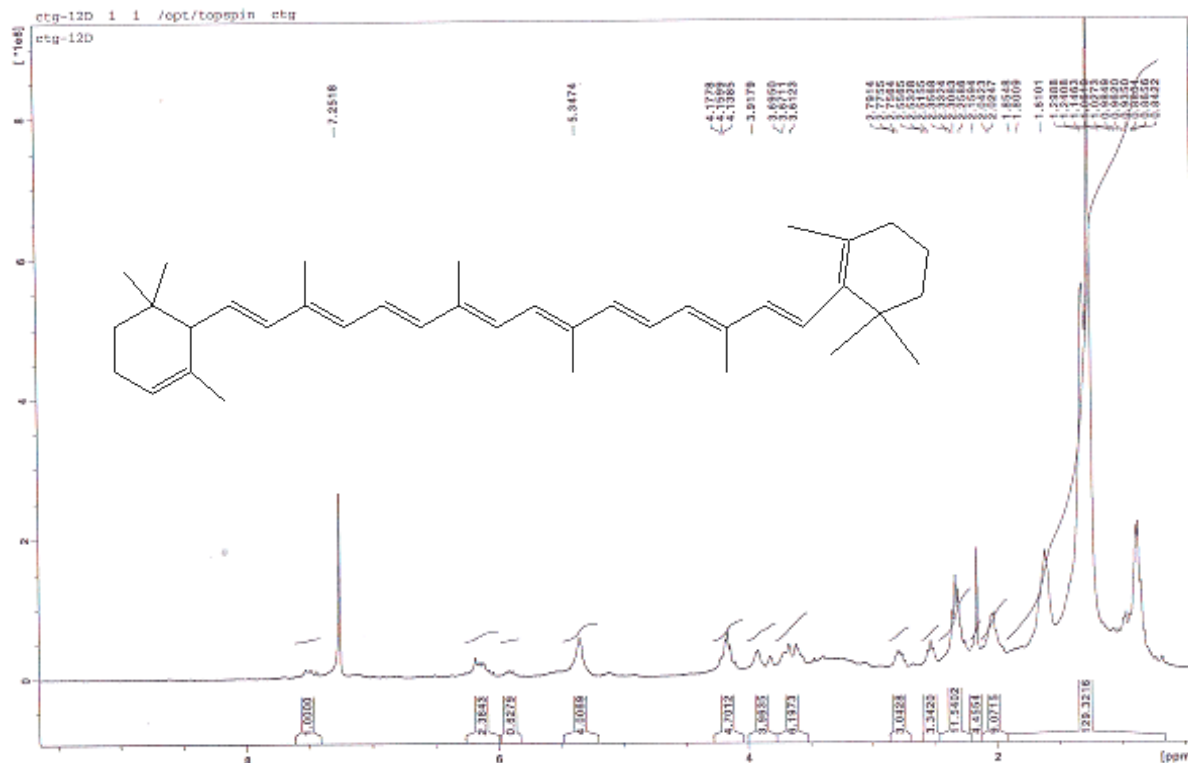


Figura No.23 Espectro RMN ¹H y estructura Luteína (Fracción 8 D)

Figuras No.24. Espectro RMN ^1H y estructura β -caroteno (Fracción12D)

Terpenos

El 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno (Diterpeno de la serie del Abietano)

El compuesto identificado como el 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno es un diterpeno que corresponde a la fracción 17G-4 de la parte del extracto soluble en diclorometano. Fue posible identificarlo al compararlo con el espectro del 6 β , 14-dihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno (reportado por primera vez por M. Núñez en el 2004), en el espectro de RMN ^1H de este diterpeno pueden observarse entre 1 ppm y 1.3 ppm las señales de los protones correspondientes a los carbonos 16,17, 18 y19, así también las señales de 1 α , 5, 3 β , 20 y 2 α se observan entre 1.3 ppm y 1.64 ppm, las señales correspondientes a 1 β y 2 β se observan entre 1.7 pm y 2.4 ppm. También se observan 3 señales entre 3.5 ppm y 4.5 ppm correspondientes a los grupos hidroxilo y por último las señales correspondientes a los dos protones aromáticos aparecen en 7.52 y 7.70 ppm.

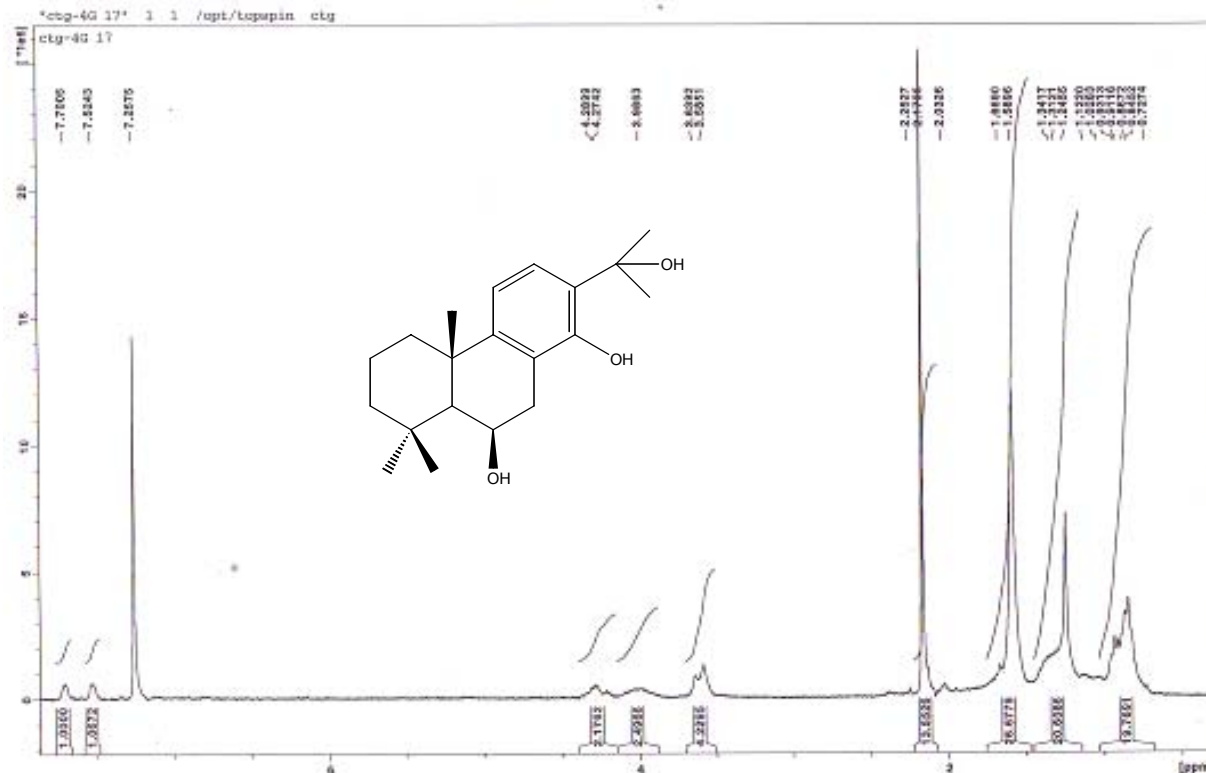
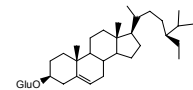


Figura No.25. Espectro RMN ¹H y estructura del 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno (Fracción 17G-4)

Triterpenos

Los compuestos identificados como triterpenos son los correspondientes a las fracciones 1B-2, 1B-4, 20D-3, 20D-4, 17E de la parte soluble en diclorometano y el 19J, 27J, 33J de la parte soluble en acetato de etilo. El espectro de RMN ¹H de estos triterpenos se caracteriza por una zona de alto campo bastante congestionada, que corresponde a los protones alquílicos del esqueleto carbonado pentacíclico, normalmente no excede de 2.5 ppm. Poseen varios grupos hidroxilo o grupos éster que generalmente aparecen en la posición número 3 del esqueleto carbonado como un multiplete entre 3.5 y 4 ppm y la insaturación bastante común en este tipo de compuestos en el carbono aparece entre 5 y 5.5 ppm. Cuando el triterpeno es saturado o bien no posee oxigenación no presentan estas dos últimas señales, siendo difícil distinguirlos de los esteroides e incluso de las ceras mediante RMN ¹H.

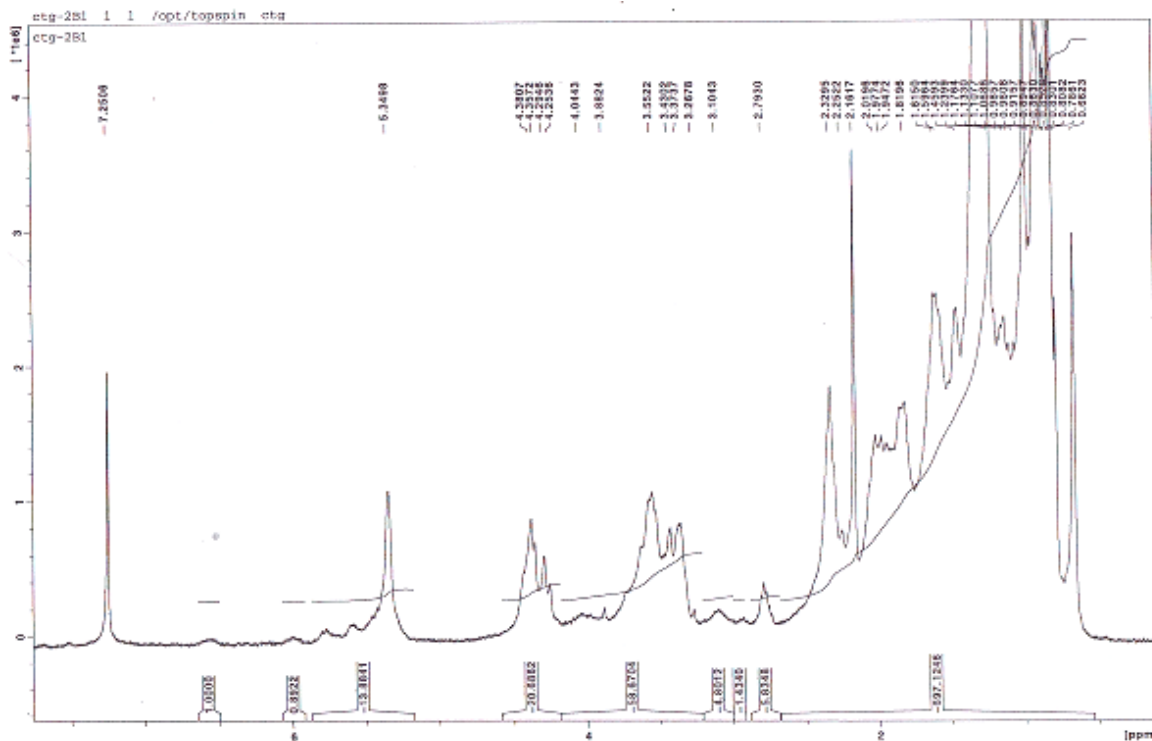


Figura No. 26. Espectro RMN¹H (fracción 1B-2) característico de triterpenos

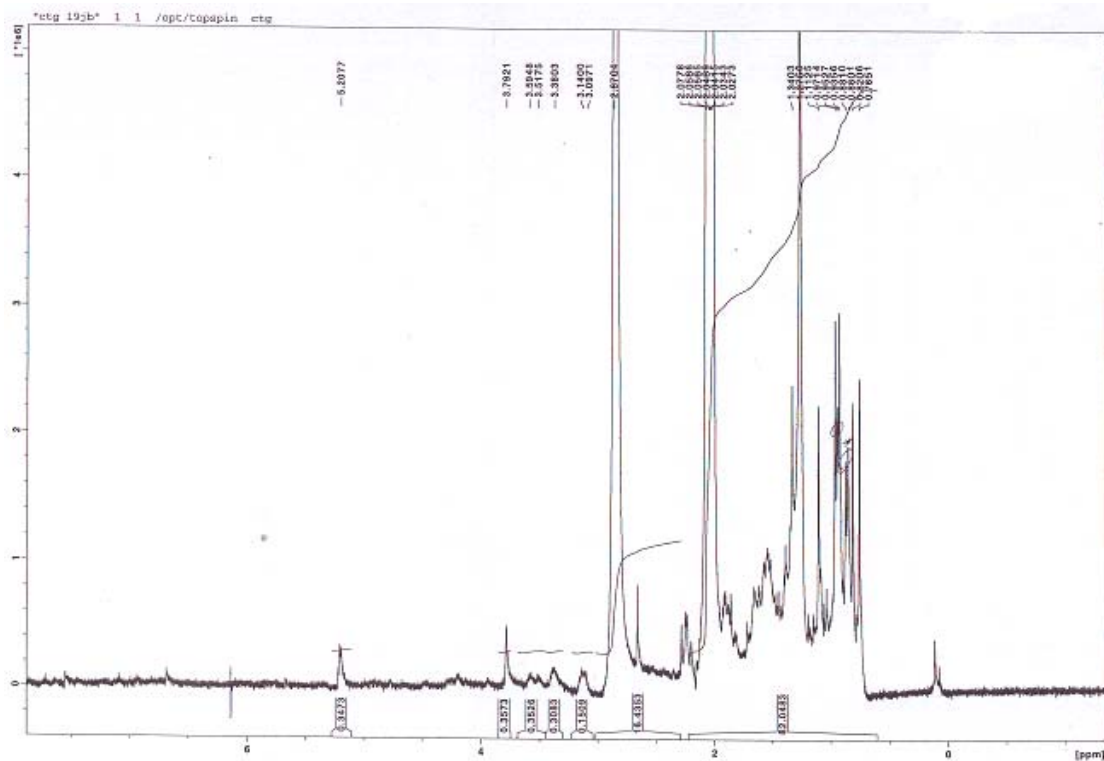


Figura No. 27. Espectro RMN¹H (fracción 19J) característico de triterpenos

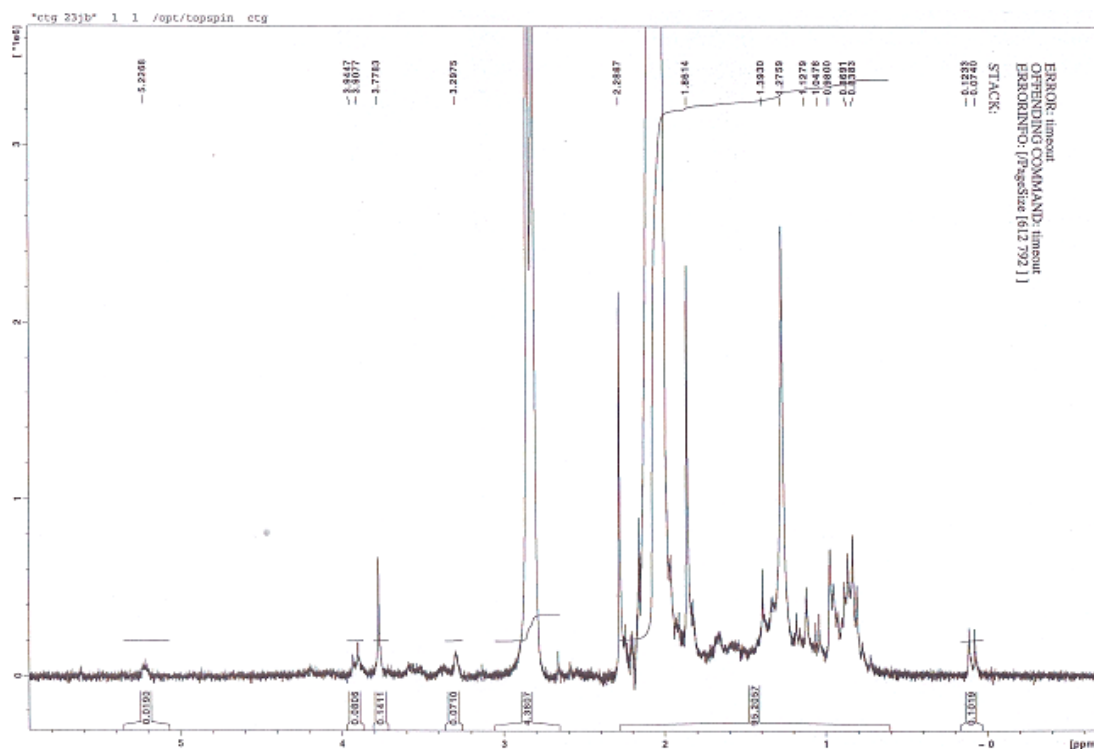
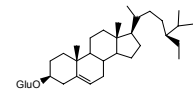


Figura No. 28. Espectro RMN¹H (fracción 23J) característico de triterpenos

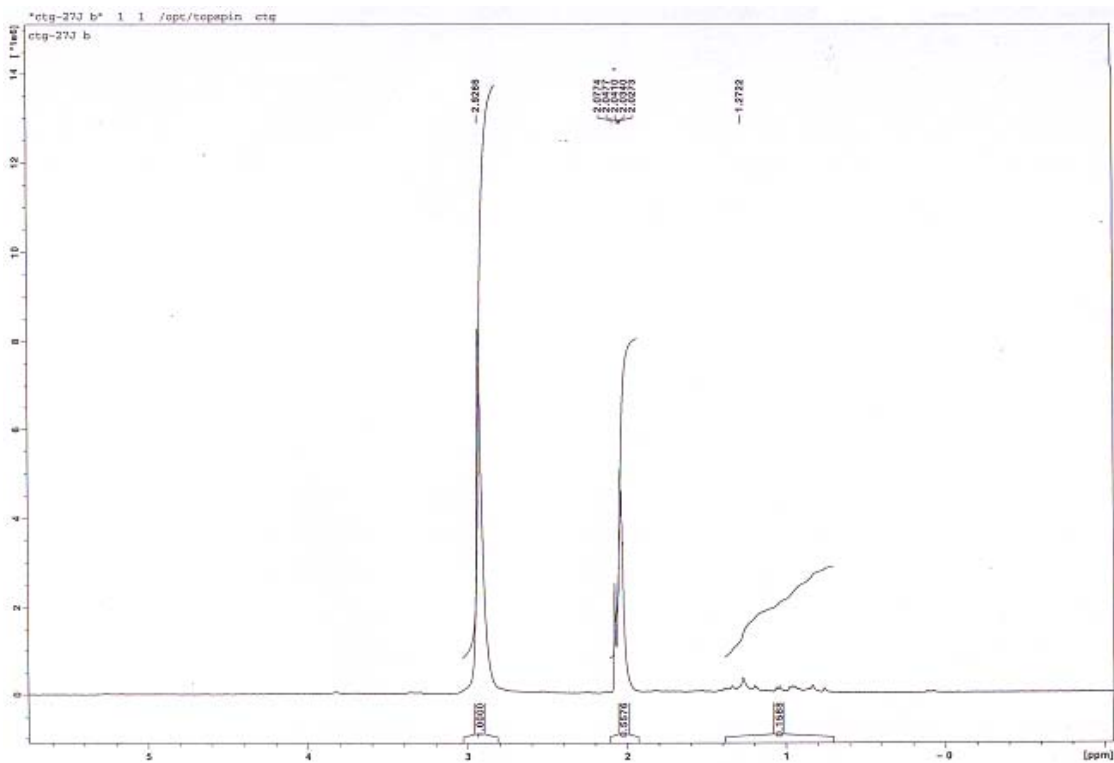


Figura No. 29 Espectro RMN¹H (fracción 27J) característico de triterpenos

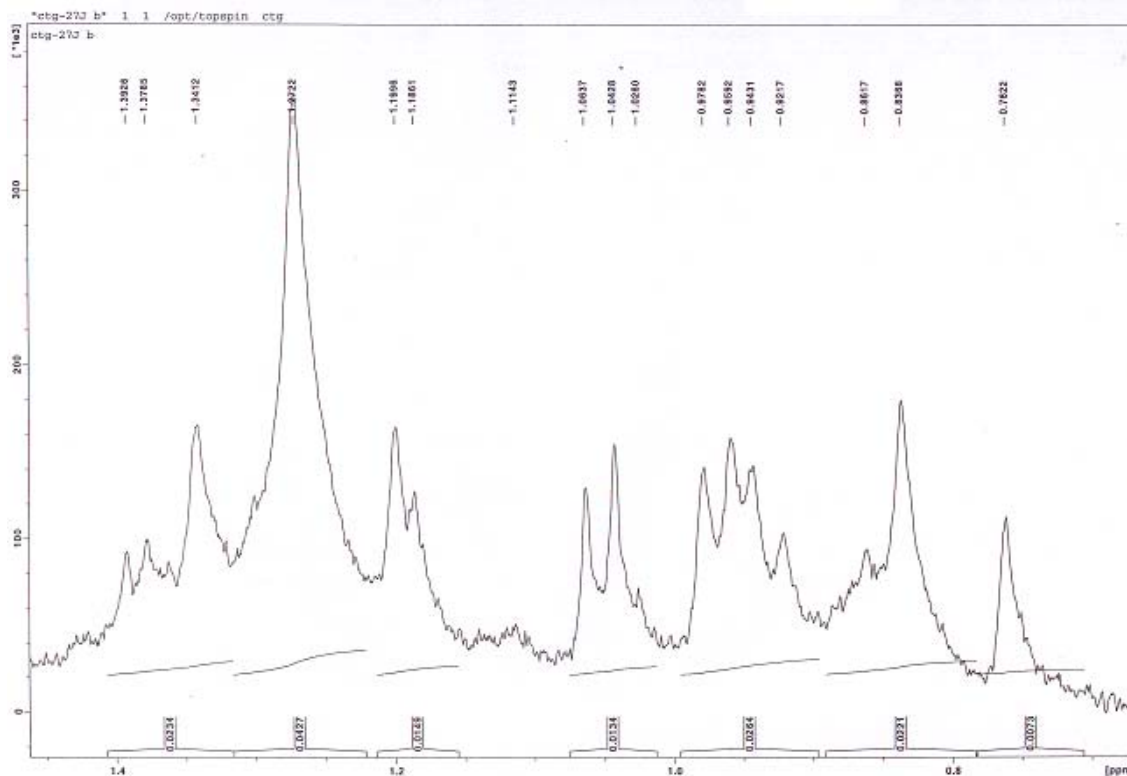


Figura No. 30. Complemento Espectro RMN¹H de Figura No. 29 (sección de 0.5-1.5 ppm ampliada)

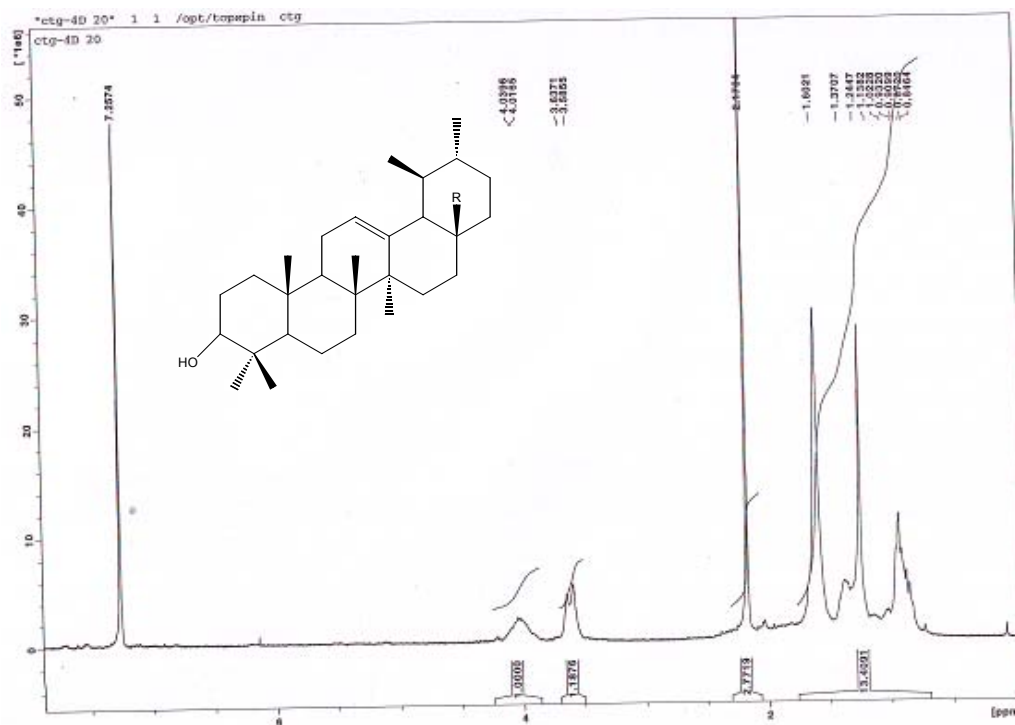


Figura No. 31. Espectro RMN¹H (fracción 20D-4) y estructura general triterpenos de la serie del Ursano

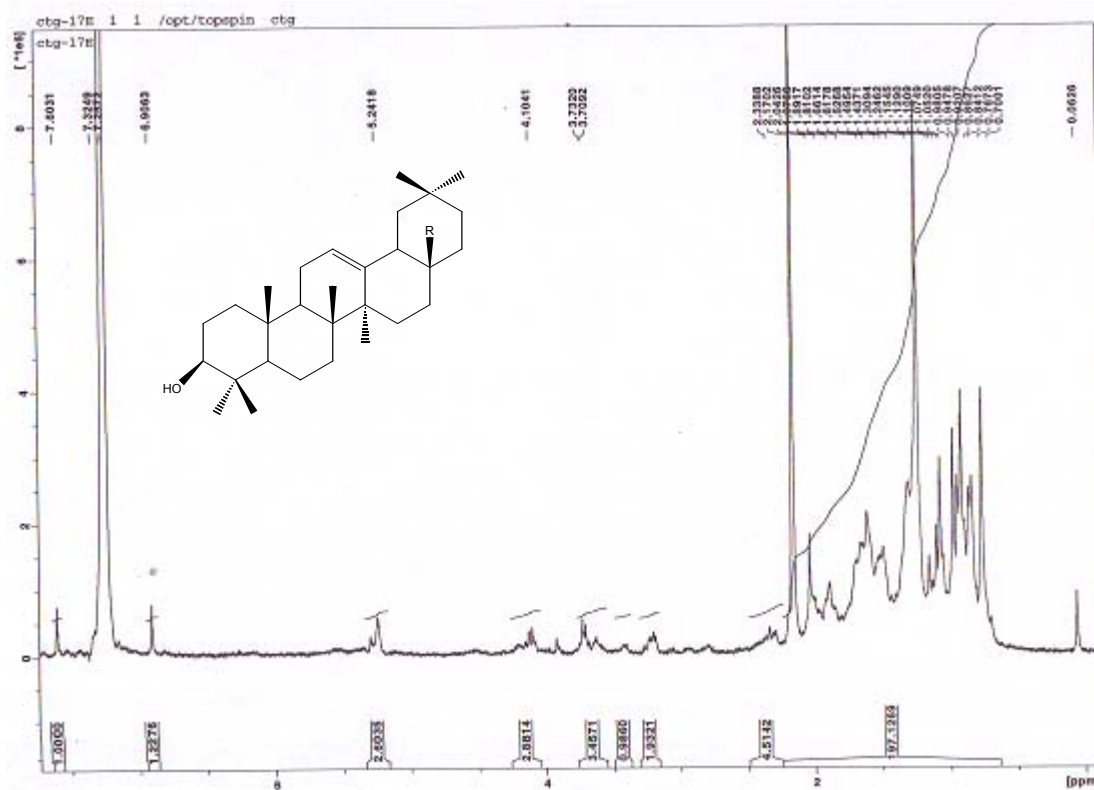
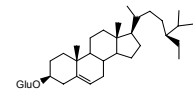


Figura No. 32. Espectro RMN¹H (fracción 17E) y estructura general triterpenos de la serie del Oleano

Triterpenos de la serie del Ursano (α -amirina y uvaol) y de la serie del Oleano (tipo β -amirina y eritrodiol)

Las fracciones 21G-4, 20D-1, 20D-2, 8G-3, 1B-4 corresponden a compuestos triterpénicos de la serie del Ursano (α -amirina y Uvaol) y de la serie del Oleano (tipo β -amirina y Eritrodiol), ya que al ser comparados los espectros de RMN ¹H obtenidos con los disponibles en la literatura se identifican las siguientes señales características como lo son una zona de alto campo bastante congestionada, que corresponde a los protones alquílicos del esqueleto carbonado del núcleo pentacíclico, los grupos hidroxilo que generalmente aparecen como un multiplete entre 3 y 4.3 ppm, la señal de la insaturación bastante común en este tipo de compuestos que aparece alrededor de 5.4 entre 5 y 5.5 ppm.

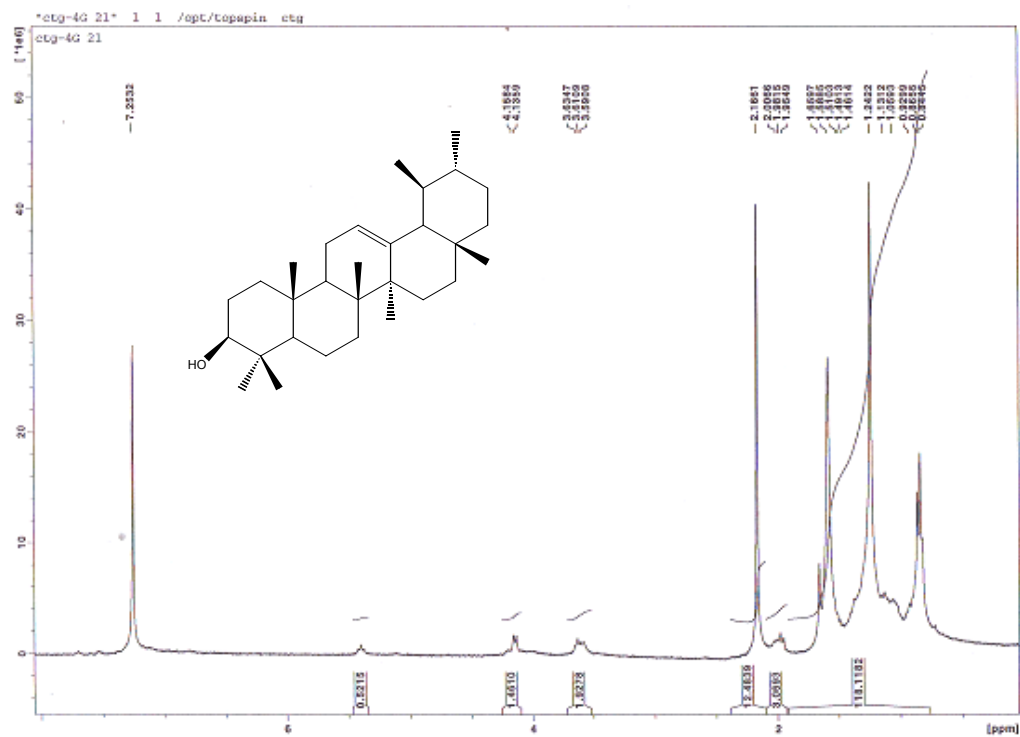


Figura No. 32. Espectro RMN¹H (fracción 20D-3) y estructura de α -amirina, triterpeno de la serie del Ursano

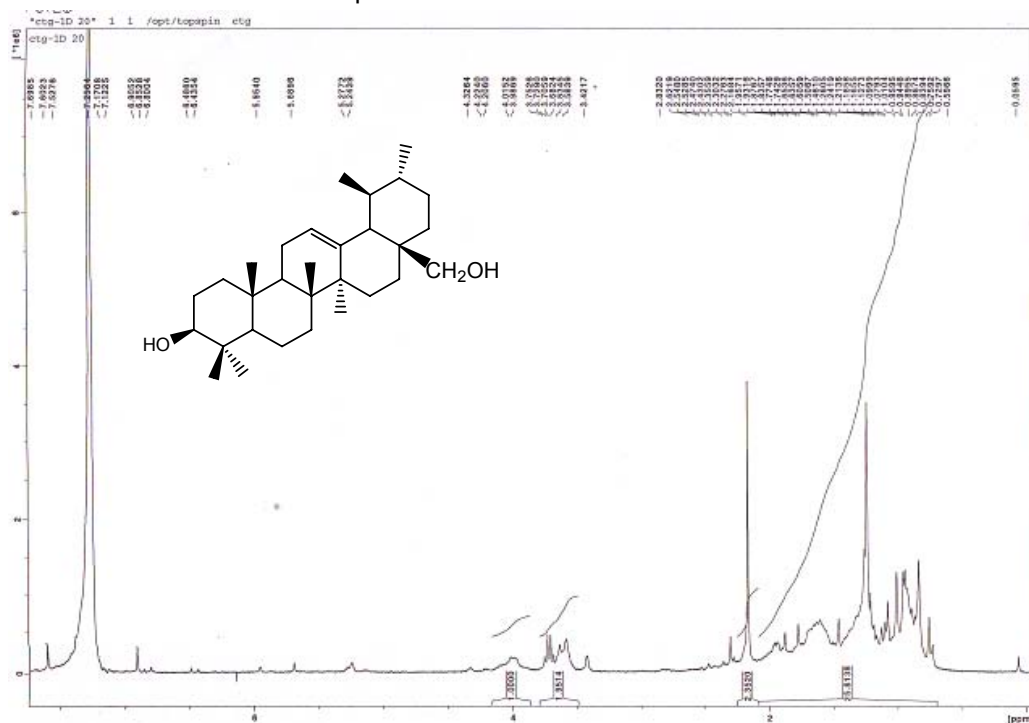


Figura No.33. Espectro RMN¹H (fracciones 20D-1 y 20D-2) y estructura Uvaol (3-beta 2,8-dihidroxi-urs-12-en), triterpeno de la serie del Ursano

La fracción 1B-4 corresponde al Eritrodinol y la fracción 8G-3 corresponde a la β -amirina, ambos son triterpenos de la serie del Oleano por lo que al ser comparados con los espectros reportados se identificaron señales características muy parecidas para ambos por lo que se reportan juntos. Fue observada una zona de alto campo bastante congestionada, que corresponde a los protones alquílicos del esqueleto carbonado del núcleo pentacíclico. Posee varios grupos hidroxilo que son las señales que se observan entre 3 y 4.3 ppm, la señal del doble enlace aparece alrededor de 5.4 ppm.

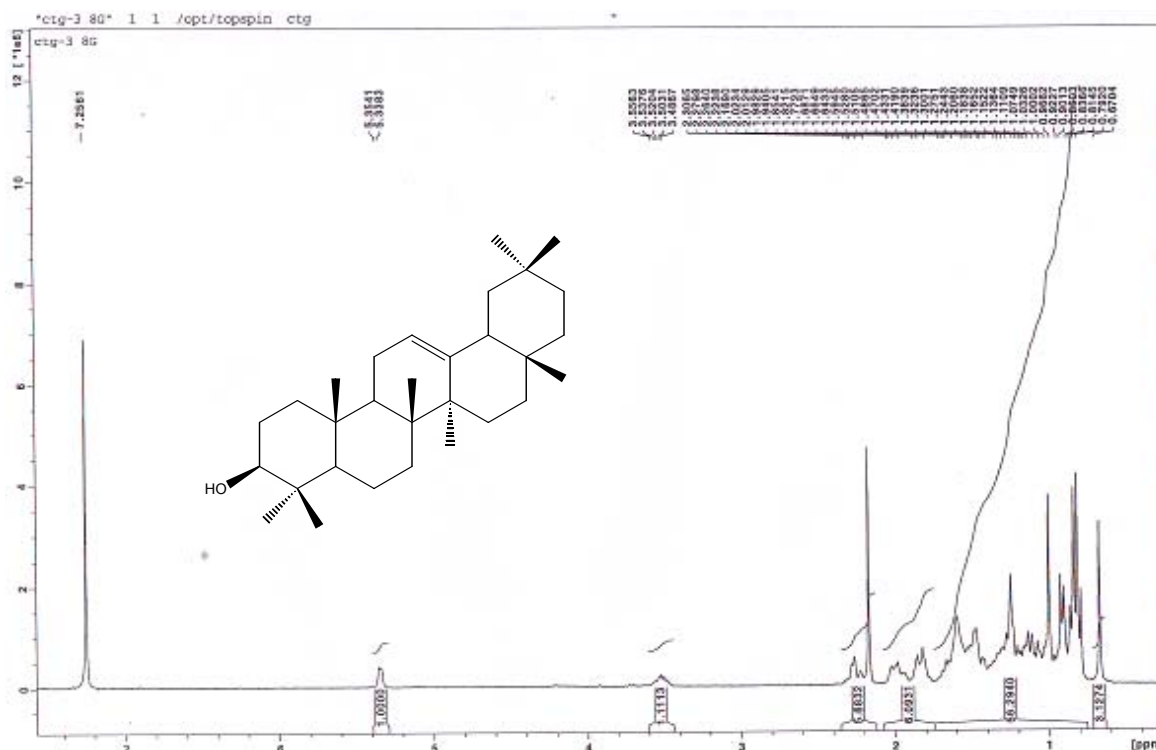


Figura No.34. Espectro RMN¹H (Fracción 8G-3) y Estructura de β -amirina, Triterpeno de la serie del Oleano

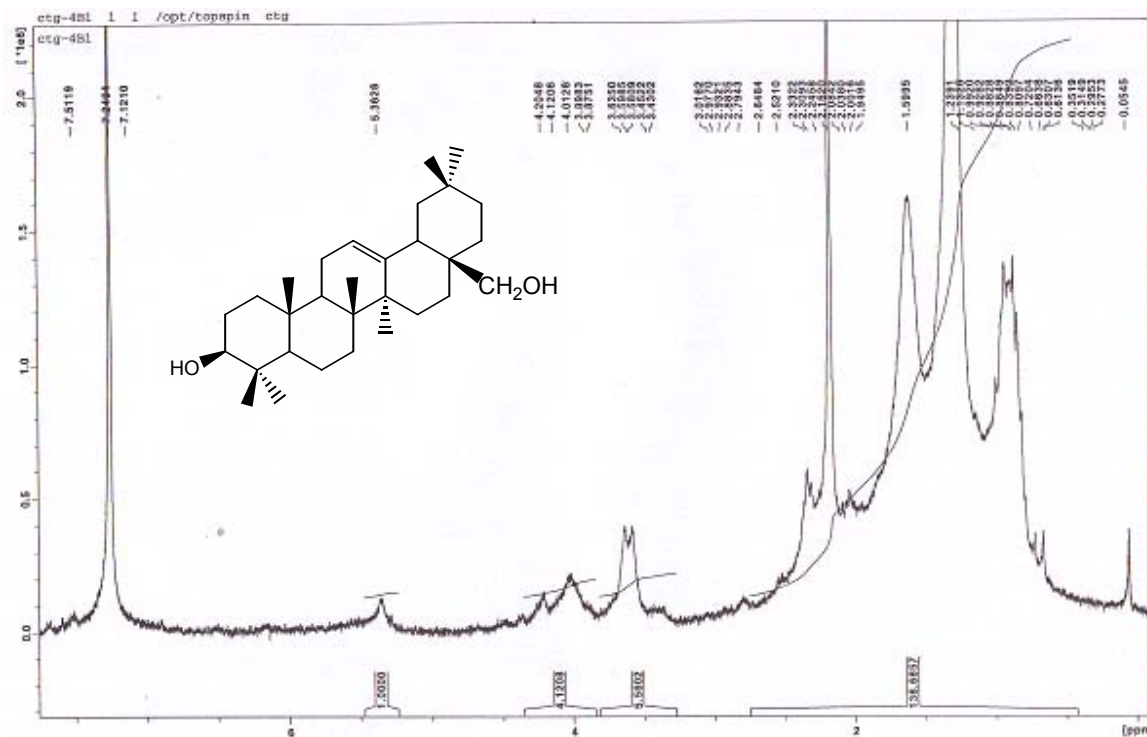


Figura No.34. Espectro RMN¹H (Fracción 1B-4) y Estructura Eritodiol (3-beta,28-dihidroxi-olean-12-en), triterpeno de la serie del Oleano

Esteroles

El espectro de RMN ¹H de los esteroides correspondientes a los compuestos 1B-1 y el 21G-1, que se caracterizan por una zona de alto campo bastante congestionada, que corresponde a los protones alquílicos del esqueleto carbonado del ciclopentano perhidrofenantreno y la cadena alifática lateral, normalmente no excede de 2.5 ppm . El grupo hidroxilo o grupo éster que generalmente aparecen en la posición número 3 del esqueleto carbonado aparecen como un multiplete entre 3.5 y 4 ppm y la insaturación bastante común en este tipo de compuestos aparece entre 5 y 5.5 ppm. Cuando el esteroide es saturado o bien no posee oxigenación no presentan estas dos últimas señales, siendo difícil distinguirlos de los triterpenos policíclicos e incluso de las ceras mediante RMN¹H.

β-sitosterol

La fracción 21G-1 corresponde a un estero, que se pudo identificar como el β-sitosterol que presentó similitud en el desplazamiento y en la forma de los señales de los espectros reportados previamente. observándose señales características como una zona de alto campo bastante congestionada que corresponde a los protones alquílicos del esqueleto carbonado del ciclopentano perhidrofenantreno y la cadena alifática lateral que presenta señales entre 2 ppm y 2.4 ppm. La señal cercana a 5.4 ppm corresponde a la insaturación del compuesto, el grupo hidroxilo aparece como un multiplete entre 3.5 y 4 ppm y la insaturación del compuesto corresponde a la señal que aparece entre 5 y 5.5 ppm.

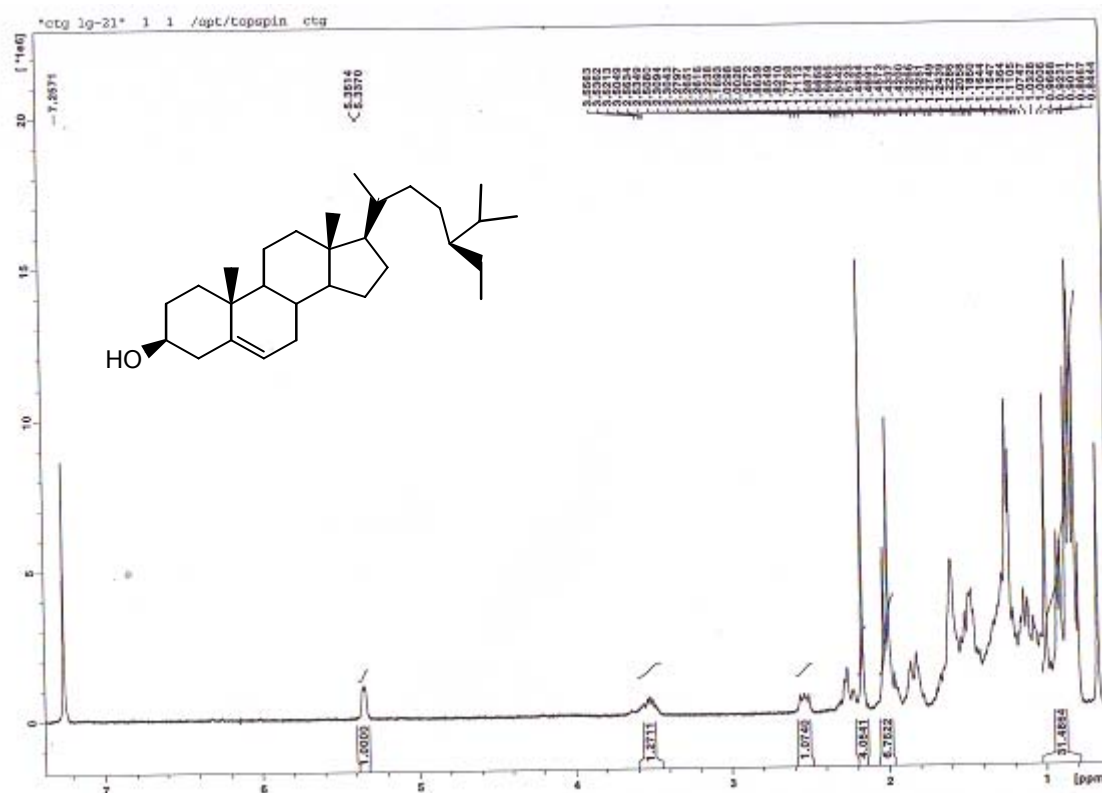


Figura No.34. Espectro RMN¹H (fracción 21G-1) y Estructura del β-Sitosterol

Glucósido del β -sitosterol

La fracción 1B-1 corresponde a un esteroide, que se pudo identificar como el glucósido del β -sitosterol que presentó similitud en el desplazamiento y en la forma de los señales de los espectros reportados previamente. Siendo estas señales características la zona de alto campo congestionada que corresponde a los protones alquílicos del esqueleto carbonado del ciclo-pentano perhidrofenantreno, la cadena alifática lateral que presenta señales entre 2 ppm y 2.4 ppm, también se observa una señal cercana a 5.4 ppm correspondiente a la insaturación del compuesto y la señal correspondiente a los protones axiales del anillo de glucosa se observan entre 3.2 y 3.4.

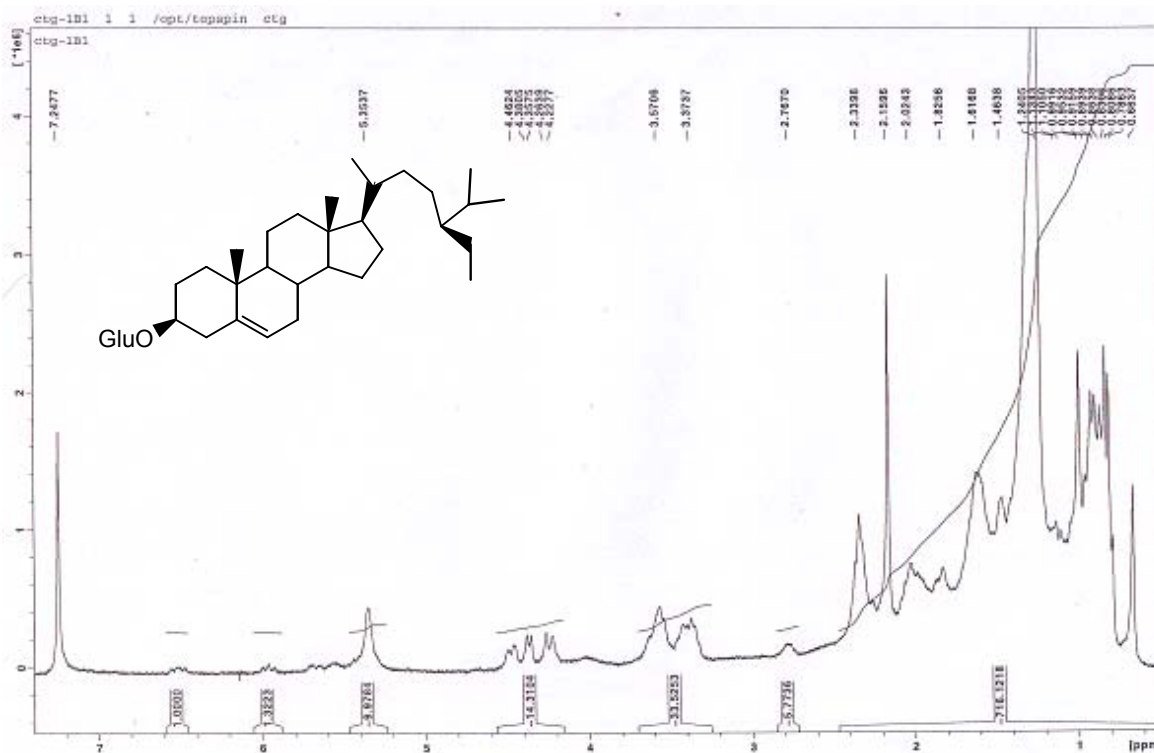
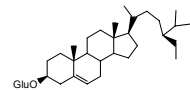


Figura No.35. Espectro RMN¹H (fracción 1B-1) y Estructura Glucósido del β -Sitosterol

Flavonoides

El flavonoide identificado en la fracción 37J de la fracción soluble en acetato de etilo fue la Quercetina que presentó señales características, para el anillo "a" se observaron las señales de los protones como dos picos en 5.90 y 6.00 ppm, los de el



anillo "b" se observaron en 6.71 y 6.90 y los de el anillo "c" se observaron como varias señales entre 2.5 ppm y 4.76 ppm

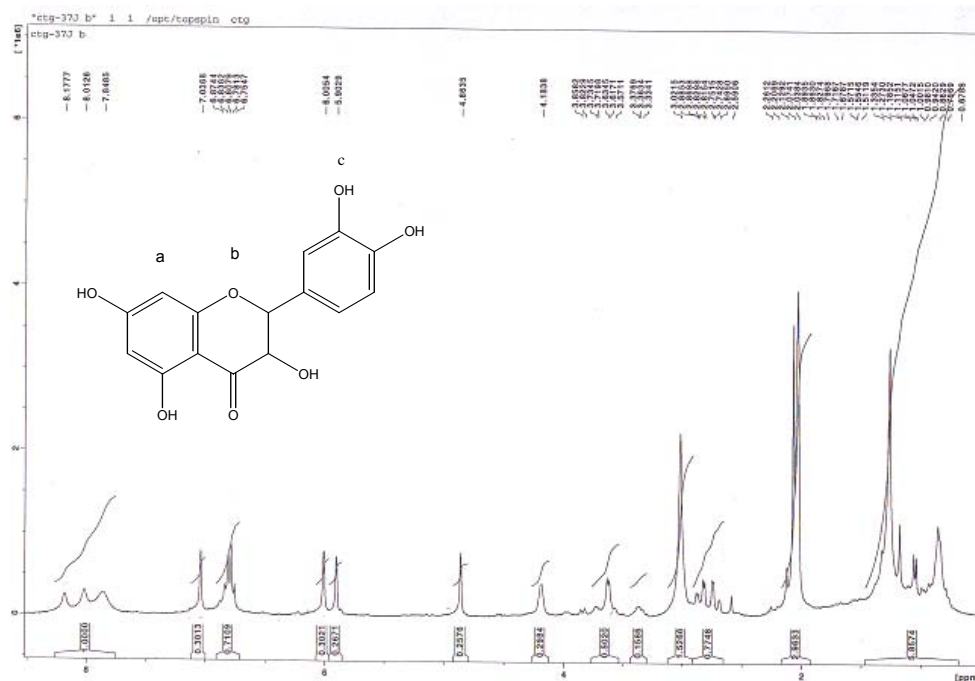


Figura No. 36. Espectro RMN¹H (fracción 37J) y estructura de la Quercetina

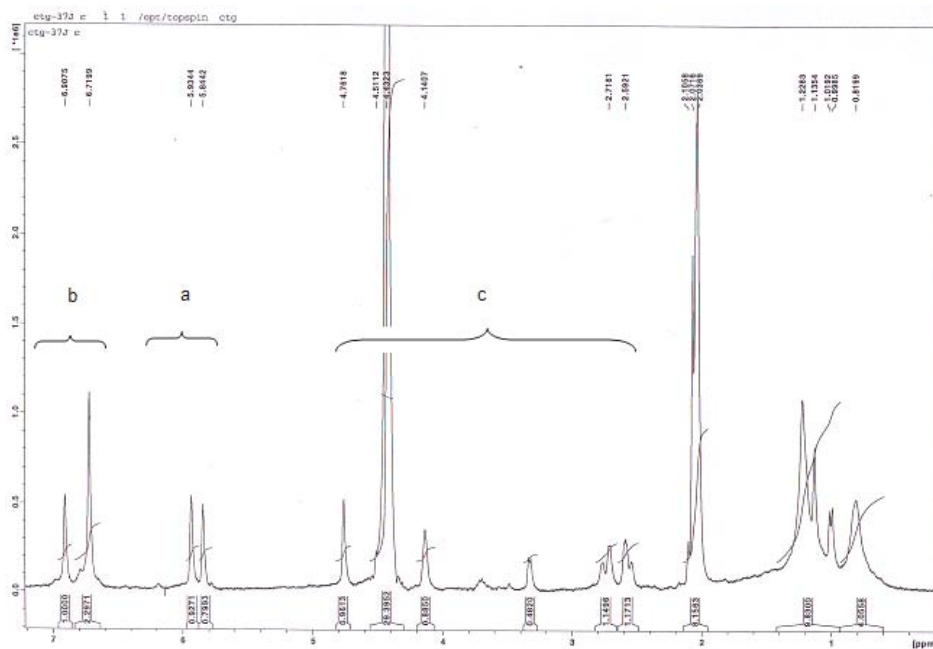
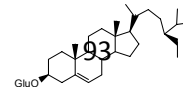


Figura No. 37. Espectro RMN¹H complementario de la Figura No. 36 se muestran ampliadas las señales, se pueden observar claramente las correspondientes a los anillos a, b y c de la estructura de la Quercetina



Revisión Bibliográfica de las Actividades reportadas para Metabolitos Secundarios aislados de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Apocarotenoides (Blumenoles)

Los blumenoles son compuesto con estructura de C13-norisoprenoide, conocidos como dihidro- β -ionanos, estos metabolitos se biosintetizan a través de la degradación enzimática de los carotenoides por medio de oxigenasas regioespecificas.¹ Los C13-norisoprenoides poseen actividades biológicas interesantes, tales como actividad antiulcerogénica, antibacteriana, citotóxica y antiparasitaria.² Así como regulador endógeno y como un componente saborizante del tabaco.³

Carotenoides

Gran parte de la importancia nutricional de los pigmentos carotenoides ha radicado en el hecho de que algunos de ellos poseen actividad provitamínica A, además existen estudios que demuestran su actividad antioxidante. En un reciente ensayo se demostró que una dieta rica en carotenoides implicaba un aumento de resistencia frente a los procesos oxidativos. De igual forma se observó que el incremento de los niveles plasmáticos de carotenoides estaba asociado con un menor daño del ADN y una mayor actividad reparadora.

Recientemente se ha demostrado que juegan un papel importante en la prevención de diversas enfermedades degenerativas humanas como la aterosclerosis o incluso el cáncer. Por otra parte, desde hace tiempo se viene postulando que los carotenoides actúan como potenciadores positivos de la respuesta inmune. Por ejemplo, parece ser que elevadas dosis de β -caroteno aumentan la proporción entre los linfocitos CD4 y CD8, que es muy bajo en enfermos de VIH.

Son muchos los investigadores que trabajan en las propiedades antioxidantes y antitumorales de estos compuestos, por lo que continuamente se están aportando

¹ Baumes, R.; Wirth J.; Bureau S.; Gunata Y.; Razungles, A. *Anal. Chim. Acta*, 458, 3-14, **2002**.

² 13 Busch, J.; Grether, Y.; Ochs, D.; Séquin, U. *J. Nat. Prod.*, 61, 591-597, **1998**.

³ Ito, N.; Etoh, T.; Hagiwara, H. y Michiharu, K. *Synthesis J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1997 pag. 1572

nuevos datos al respecto y poniéndose de manifiesto estas propiedades en distintos carotenoides. Cabe señalar que la mayoría de los estudios sobre la actividad antioxidante de los carotenoides se han llevado a cabo *in vitro*, aunque en los últimos años el número de ensayos *in vivo* ha aumentado considerablemente.⁴

Los carotenoides también participan en la elaboración de enzimas en el hígado y de hormonas sexuales y suprarrenales. El déficit de vitamina A produce ceguera nocturna, sequedad en los ojos (membrana conjuntiva) y en la piel y afecciones diversas de las mucosas. En cambio, el exceso de esta vitamina produce trastornos, como alteraciones óseas, o incluso inflamaciones y hemorragias en diversos tejidos. Se recomienda el consumo de fuentes de vitamina A en personas propensas a padecer infecciones respiratorias (gripes, faringitis o bronquitis, problemas oculares (fotofobia, sequedad o ceguera nocturna) o con la piel seca y escamosa (acné incluido)⁵

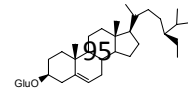
Luteína

La luteína es un antioxidante el cual pertenece a la familia de los carotenoides. Es un pigmento color amarillo. La luteína no es categorizada como vitamina sino como un nutriente esencial para la visión. La luteína puede disminuir el riesgo de la pérdida de visión relacionado con la edad, el cual causa pérdida gradual de la visión central. La luteína se encuentra concentrada en la parte central de la retina, llamada la macula, en la cual se encuentran pigmentos amarillos compuestos por luteína y zeaxantina, las cuales protegen la retina del daño de la foto-oxidación ocasionada por la luz azul. La luteína puede también reducir el riesgo de enfermedades arteriales. También reduce la oxidación del colesterol reduciendo así la probabilidad de obstrucción arterial, además puede reducir el riesgo de quemaduras de sol y cáncer de piel, ya que protege contra el daño ocasionado por el efecto de la radiación uv.⁶ Actualmente se investiga el potencial

4 Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Meléndez-Martínez, A. Vicario, I.; Hereda, F. Area de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. España. Disponible en: http://www.alanrevista.org/ediciones/2004-2/importancia_nutricional_pigmentos_carotenoides.asp. Fecha de consulta: 22.01.2008

5 Carotenoides. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/labt/bonifaz_p_ve/capitulo3.pdf. Fecha de Consulta: 22.01.2008.

⁶ Phitochemicals. Lutein. <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/lutein.php>



del licopeno, la luteína y la zeaxantina, en la prevención de enfermedades como el cáncer y la enfermedad coronaria.⁷

Terpenos

Diterpenos

Los diterpenos comprenden un grupo de compuestos de 20 átomos de carbono que pueden presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas, y ácidos carboxílicos. Se les atribuye función protectora en las plantas y algunos son responsables de la naturaleza venenosa de algunas especies. Varios diterpenos muestran actividad antitumoral, otros muestran actividad irritante, tóxica o cocarcinogénica, actividad anti-inflamatoria, edulcorante, agente para el tratamiento de cardiomiopatía congestivos, glaucoma y asma.⁸

El 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno (Diterpeno de la serie del Abietano)

El Abietano encontrado, el 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno, es un diterpeno tricíclico de la serie del Abietano. Este tipo de metabolitos han presentado actividad inhibidora de la inducción del virus Epstein-Barr. Los estudios previos indican que la presencia de una lactona bicíclica entre las posiciones C-2 y C-7 es relevante para la actividad, mientras que la presencia de una lactona condensada insaturada entre C-3 y C-4 los inactiva. Se ha comprobado que compuestos de este tipo reducen la carcinogénesis inducida en ratones hasta un 73.4% en 10 semanas de tratamiento, resultados que hacen que compuestos de este tipo sean agentes potenciales quimiopreventivo.⁹

⁷ Carotenoides. Martínez Martínez, A. Universidad de Antioquia. Colombia. 2003. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/carotenoides2001.pdf>. Fecha de consulta: 22.01.2008

⁸ Lock, Olga. *Investigación Fitoquímica; Métodos en el estudio de productos naturales*. 2d Edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú. 1994. Pág.64

⁹ Nuñez, M. *Metabolitos secundarios bioactivos aislados de Maytenus chiapensis y Crossopetalum uragoga (Celastraceae)*. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. 2003. España.

Triterpenos

En los últimos años, los triterpenos han tomado relevancia debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan, entre las que cabe destacar actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral, antituberculosa y anti-VIH.^{10, 11, 12, 13, 14, 15}

Los triterpenos son bastante abundantes en la familia Celastraceae, la gran parte de estos pertenecen, casi invariablemente, a las series friedelano, oleano, glutinano, taraxerano, ursano (todos estos dispuestos en cinco anillos de seis miembros), el lupano (dispuesto en cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco) y el dammarano.^{16, 17, 18, 19, 20} Existen numerosos ejemplos de estos triterpenos de la familia Celastraceae que han mostrado actividad citotóxica frente a diferentes tipos de células cancerígenas²¹ y también actividad anti-VIH.²²

Triterpenos de la serie del Oleano y el Ursano (Uvaol, Eritodiol, α -amirina, β -amirina)

Este es otro grupo de triterpenos presente en las celastráceas que han mostrado un perfil farmacológico similar al de los retinoides y esteroides, destacando su actividad antiinflamatoria y supresora, tanto de la promoción tumoral como de la síntesis de inmunoglobulinas, actividad hepatoprotectora e inductora de la síntesis de colágeno.²³

Un triterpeno pentacíclico común en las especies de celastráceas es el ácido ursólico que es el ácido del Uvaol (Figura No.15), ensayos biológicos realizados han mostrado

¹⁰ Nozaki, H.; Matsuura, Y.; Hirano, S.; Kasai, R.; Chang, J. J.; Lee, K. *J. Nat. Prod.*, 53, 1039-1041, **1990**.

¹¹ Tane, P.; Tsopmo, A.; Ngnokam, D.; Ayaford, J. F.; Sterner, O. *Tetrahedron*, 47, 14989-14994, **1996**.

¹² Kuo, Y.H.; Yang-Kio, L. M. *Phytochemistry*, 44, 1257-1281, **1997**.

¹³ Wächter, G. A.; Valvic, S.; Franzblau, S. C.; Suarez, E.; Timmermann, B. N. *J. Nat. Prod.*, 64, 37-41, **2001**.

¹⁴ Kashiwada, Y.; Chiyo, J.; Ikeshiro, Y.; Nagao, T.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Fowke, K.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 183-185, **2001**.

¹⁵ Zhang, H.-J.; Tan, G. T.; Hoang, V. D.; Hung, N. V.; Cuong, N. M.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H. S. *J. Nat. Prod.*, 66, 263-268, **2003**.

¹⁶ Cota, A. B.; Mascarenhas, Y. P.; Silva, G. D. F.; De Souza, J. R. *Acta Crystallogr. C*, C46, 326-327, 1990.

¹⁷ González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G.; Domínguez, X. A. *Rev. Latin. Química*, 20, 17, 1989.

¹⁸ Dantanarayana, A. P.; Kumar, N. S.; Muthukuda, P. M.; Balasubramaniam, S. *Phytochemistry*, 22, 473-474, 1983.

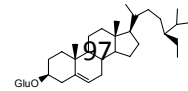
¹⁹ De Fatima, G. D. S.; Duarte, L. P.; Da Silva, H. C. P.; De Sousa, J. R.; Nonato, M. C.; Portezani, P. J.; Mascarenhas, Y. P. *J. Brazil Chem. Soc.*, 9, 461-464, 1998.

²⁰ Chavez, H.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; González, A. G. *Tetrahedron*, 53, 6465-6472, 1997.

²¹ Nozaki, H.; Matsuura, Y.; Hirano, S.; Kasai, R.; Chang, J. J.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.*, 53, 1039-1041, 1990.

²² Chen, K.; Shi, Q.; Kashiwada, Y.; Zhang, D.C.; Hu, C. Q.; Jin, J.Q.; Nozaki, H.; Klilkuskie, R.E.; Tramontano, E.; Chen, Y.C.; McPhail, D.R.; McPhail, A. T.; Lee, K.H. *J. Nat. Prod.*, 55, 340-346, 1992.

²³ Honda, T.; Finlay, H. J.; Gribble, W. J. *J. Nat. Prod.*, 60, 1174-1177, 1997.



que posee actividad antiinflamatoria, antiartrítica, anti-VIH, antidiabética, antiulcerosa, así como, hipolipidémica y antiarterioesclerótica. Este ácido y varios estéres derivados del mismo han mostrado actividad citotóxica frente a varias líneas celulares de tumores humanos, probando que inhibe el crecimiento celular de las leucemias linfocíticas P-388 y L-1210, y frente al carcinoma humano A-549, así como citotoxicidad frente a las células tumorales humanas de colon (HCT-8) y mama (MCF-7).²⁴

El ácido ursólico además es utilizado en muchas preparaciones cosméticas por sus propiedades antiinflamatorias, antitumorales y antimicrobianas y en pomadas para tratar quemaduras. Posee también actividad antibacteriana y antifúngica, además. los ensayos han mostrado que inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y *Microsporium lenosum*. La aplicación tópica inhibe la iniciación y promoción del crecimiento tumoral inducido por TPA.²⁵

Por otro lado, el ácido ursólico, junto con el ácido oleanólico que son los ácidos del Uvaol y el Eritodiol, respectivamente (Figura No.15 y 17) son inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr, con actividad similar a los conocidos agentes quimiopreventivos, ácido retinoico y glycyrrhizina, lo que sugiere que estos ácidos pueden ser valiosos agentes inhibidores de la promoción de tumores.²⁶

α -amirina y β -amirina

La revisión bibliográfica de trabajos sobre α y β -amirina; asignan a estas sustancias propiedades antibacterianas.²⁷ Además la β -amirina ha mostrado actividad antiinflamatoria significativa y dependiente de la dosis. En ensayos con ratones demostró actividad antiinflamatoria al inhibir la inflamación inducida por el TPA en un rango de 0.1-0.3 mg por oreja en una dosis inhibitoria al 50%, exhibiendo efecto inhibitorio mas alto que el mostrado en el mismo ensayo por el β -sitosterol (0.12 mg por oreja). La combinación dual de la β -amirina con el β -sitosterol de 0.25 mg por oreja,

²⁴ Lee, K. H.; Lin, Y. M.; Wu, T. S.; Zhang, D. C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I. H.; Chang, J. J.; Wu, R. Y.; Yang, T. H. *Planta Med.*, 54, 308-311, **1988**.

²⁵ Phitochemicals. Ursolic Acid. <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/ursolic-acid.php>

²⁶ Tokuda, H.; Ohigashi, H.; Koshimu, K.; Ito, Y. *Cancer Lett.*, 33, 279-285, **1986**.

²⁷ Plutarco Naranjo; Antonio Crespo; Raúl Mideros Etnomedicina : progresos italo-latinoamericanos : memorias del IV Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Felice Fontana", Quito, 6-9 de noviembre de 1995. Ecuador : UNICEF ; Quito : Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador : Ediciones Abya-Yala, 1997.

presenta mejores resultados que la adición de cada triterpeno por separado. La β -amirina ha demostrado también actividad en contra de la promoción tumoral.²⁸

Esteroles (β -sitosterol y glucósido del β -sitosterol)

Los esteroides son triterpenos que juegan un importante papel biológico ya que forman parte de las membranas celulares y actúan como precursores de las hormonas esteroideas. En la planta de estudio *Perrottetia longistyllis* (Manteco, Capulaltapa) fueron encontrados los esteroides β -sitosterol y su glucósido. El β -sitosterol (Figura No.17) cuya estructura es similar a la del colesterol, pero difiere de éste por la presencia en el primero de un grupo etilo extra, es un esteroide presente en muchas plantas superiores y ha sido aislado de la familia Celastraceae y sobre él se ha publicado una extensa relación de actividades biológicas. Cabe destacar que posee actividad antiinflamatoria y antipirética, con un efecto similar a la hidrocortisona y la oxifenbutazona. Además, presenta un amplio margen de seguridad debido a su mínimo efecto ulcerogénico, lo que le confiere un alto valor terapéutico. Recientemente, se ha descrito como posible fármaco para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata²⁹ (BPH por sus siglas en inglés) ya que aparentemente reduce los niveles de colesterol en la próstata.³⁰

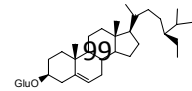
Flavonoides

Los pigmentos flavonoides son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antotaxinas. Se emplearon mucho tiempo como colorantes de lana y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a sus propiedades antioxidantes. Poseen extensa y variada acción farmacológica entre las que se encuentran actividad contra la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, espasmolítica,

²⁸ Martínez- Vázquez, M.; Ramirez, T.; Lazcano, M. Bye, R. Rev. Soc. Quím. Méx. Vol. 43, Núms.3,4 (1999)

²⁹ Wilt, T. J. *B. J. U. Int.*, 83, 976-983, 1999.

³⁰ Phitochemicals. β -sitosterol <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/beta-sitosterol.php>



antihepatotóxica, colerética, estrógena y diurética. También destaca la actividad antimicrobiana, acción fungitóxica³¹ e inhibidora de la inducción de tumores.³²

Quercetina

La Quercetina es una molécula capaz de interferir con la generación de especies activas y/o dificultar el curso de la cascada peroxidativa (que convierte la hipoxantina en xantina y ésta en ácido úrico).^{33,34} Se ha descrito como agente secuestrador de radicales libres e inhibidor de xantina oxidasa, jugando por ello un papel hepatoprotector.³⁵

³¹ Lock, Olga. *Investigación Fitoquímica; Métodos en el estudio de productos naturales*. 2d Edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú. 1994. Pág.114-120.

³² Konoshima, T.; Tabasaki, M.; Kozuka, M.; Inada, A.; Nekanishi, T.; Tokuda, H.; Matsumoto, T. *Shoyakugaku Sass.*, 43, 135-141, 1989.

³³ Schmeda, G. H.; Zúñiga, J.; Dutra, M. B.; Habermehl, G. *Phytother. Res.*, 10, 260-262, 1996.

³⁴ Costantino, L.; Rostelli, G.; Albasini, A. *Int. J. Pharm.*, 86, 17-23, 1992.

³⁵ Gao, Y.; Lin, Z.-H.; Huang, M.; Zhou, S. *Int. J. Med. Mush.*, 5, 111-131, 2003.

Parte II

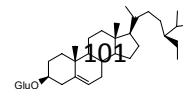
Al extracto obtenido de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) le fue realizado el tamizaje fitoquímico y tamizaje de actividades antimicótica, antibacteriana, y citotóxica, según procedimientos empleados en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT). Se lograron identificar varias familias de metabolitos secundarios, sin embargo el extracto estudiado no presentó actividades positivas para ninguna de las actividades biocidas estudiadas.

Tamizaje Fitoquímico

Para determinar la composición fitoquímica del extracto de estudio, el mismo fue evaluado en forma descriptiva basándose en los procedimientos para Tamizaje Fitoquímico empleados en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Dichos procedimientos consistieron en distintas marchas de reacciones y cromatografías en capa fina (CCF) que permitieron la identificación de las familias de metabolitos secundarios mediante el cambio de coloración y comparación con testigos para las reacciones; y fluorescencia y comparación de coloración con estándares específicos para las cromatografías de capa fina.

La sensibilidad y efectividad de las pruebas para realizar el tamizaje fitoquímico depende de la concentración de la muestra, concentración de los metabolitos en el extracto, caducidad de los reactivos y errores humanos, sin embargo, muestran el panorama general de los metabolitos existentes en la planta de estudio³⁶. Como se observa en la Tabla No. 31 que se encuentra en los resultados, fue posible identificar en el extracto etanólico de las hojas de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) a las siguientes familias de metabolitos secundarios: alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides y antocianinas, así como esteroides y triterpenoide. Sin embargo no se logró detectar a las familias de metabolitos secundarios correspondientes a cardenólicos y bufadienólicos, saponinas, principios amargos ni

³⁶ http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/tecanhuey_f_lr/capitulo6.pdf



taninos, al menos en cantidades que pudieran ser detectadas por los métodos empleados para el tamizaje fitoquímico.

Debido a que la planta no había sido estudiada previamente no fue posible comparar los resultados obtenidos con información disponible en bibliografía científica, sin embargo han sido estudiadas otras especies del género *Euonymus* como lo son las especies *Euonymus sieboldiana* y *Euonymus europeus* L. de las cuales se han aislado sesquiterpenos macrocíclico, poliésteres de tipo β -agarofuránico que pueden ser entre otros sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos, algunos de ellos alcaloídicos, con propiedades antialimentarias e insecticidas.³⁷ Se les han descrito una gran diversidad de propiedades como inmunosupresoras, antitumorales, inhibidoras de la multirresistencia a fármacos y de la activación del virus Epstein-Barr, así como actividad anti-VIH.³⁸

De otros géneros de celastráceas se han aislado varios metabolitos secundarios destacando las fenilalquilaminas, maytensinoides, terpenoides y Glicósidos cardiotónicos, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas.^{39, 40}. El grupo más numeroso de compuestos bioactivos de la familia Celastraceae son los terpenoides, los Glicósidos, los elaeodendrósidos y los esteroides, con una marcada actividad cardiotónica.⁴¹

Tamizaje de Actividad Biocida

Actividad Citotóxica contra *Artemia Salina*

La actividad citotóxica del extracto de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rouj Xiwáan) fue evaluada empleando para el ensayo huevos de *Artemia salina* y preparando una solución del extracto etanólico de la planta en agua de mar para obtener una concentración de 0.01 g/ml. Tras estar los nauplios en la solución durante 24 horas se observó un 100% de los nauplios de *Artemia salina* vivos dando así una

³⁷ Descoins, C. Tesis Doctora., Universidad de La Laguna, 1999.

³⁸ 27 Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.*, 31, 43-59, 2002.

³⁹ Spivey, A.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.*, 31, 43-59, 2002.

⁴⁰ González, A. G; Bazzocchi, I. L; Jiménez, I. A; Mojir, L. *Bioactive Natural Products (Part D)*, Elsevier Science: The Netherland, 23, 649-738, 2000.

⁴¹ 31 Shimada, K.; Kyuno, T.; Nambara, T.; Uchida, I. *Heterocycles*, 15, 355-360, 1981.

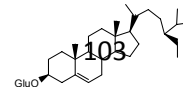
actividad negativa para el extracto etanólico de la planta ya que a pesar de las familias de metabolitos secundarios identificadas como constituyentes del extracto el mismo no produjo mortandad de la *Artemia salina* a la concentración evaluada. Ésto debido a que las familias de metabolitos identificados para el extracto no presenten actividad citotóxica o no se encuentran en la concentración necesaria para lograr una actividad citotóxica ya que al hacer una prueba con una concentración de 0.02g/ml se observó el 100% de la mortandad de los nauplios. A pesar de esto no fue realizada la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ya que según el Procedimiento Estándar la concentración a la cual se debe realizar la prueba es a 0.01 g/ml y a partir de esta se deben realizar las diluciones seriadas.

Para la prueba de hipótesis binomial de la respuesta crecimiento (actividad negativa) o inhibición de crecimiento (actividad positiva), se esperaba que las cuatro réplicas presentarán una actividad positiva para rechazar H_0 y concluir que los metabolitos del extracto de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) tienen actividad citotóxica contra *Artemia salina*, por los resultados obtenidos se puede concluir que no tiene actividad positiva significativa ($p > 0.1$).

Tamizaje de Actividades antifúngicas y antibacterianas

Para el tamizaje de actividades antifúngicas y antibacterianas se realizó un ensayo *in vitro* evaluando la actividad biocida del extracto etanólico de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) contra bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, hongos levaduriformes, hongos filamentosos y hongos dermatofitos representantes de distintos géneros de microorganismos patógenos para el ser humano.

El ensayo se llevó a cabo con soluciones del extracto etanólico crudo en etanol al 50%, en una concentración de 1mg/ml; para la actividad antifúngica y 10 mg/ml; para antibacteriana. El diseño empleado fue totalmente al azar con 4 replicas por cada microorganismo a probar (Anexo No.3), para un nivel de significancia $\alpha = 0.10$. Se esperaba observar el 100% de mortandad en los microorganismos, sin embargo los resultados señalan una actividad biocida negativa en vista de que el extracto no inhibió



el crecimiento in vitro de los microorganismos a las concentraciones estudiadas, por lo que no fue realizada la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Para la prueba de hipótesis binomial de la respuesta crecimiento (actividad negativa) o inhibición de crecimiento (actividad positiva), se esperaba que las cuatro replicas dieran una actividad positiva, dados los resultados, se concluye que no tiene una actividad positiva significativa ($p>0.1$).

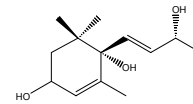
X. Conclusiones

Parte I *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

1. La fracción que presentó mayor rendimiento fue la soluble en diclorometano constituyendo un 45.22% del extracto etanólico crudo.
2. De las hojas de *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) se aislaron dos distintos apocarotenoides conocidos en la bibliografía científica; blumenol A y el blumenol de la Figura No. 10.
3. También se aislaron los carotenoides luteína y β -caroteno reportados previamente en la literatura científica.
4. Así mismo se aislaron diferentes triterpenos: triterpenos de la serie del Ursano como la α -amirina y el Uvaol (3-beta,28-dihidroxi-urs-12-en) y triterpenos de la serie del Oleano como el Eritodiol y la β -amirina.
5. Se aislaron también esteroides como el β -sitosterol y el glucósido del β -sitosterol, ambos metabolitos conocidos previamente.
6. Así también se aislaron diterpeno 6, 14, 15-trihidroxi-abieta-8, 11, 13-trieno y la Quercetina, ambos metabolitos reportados con anterioridad en la bibliografía científica.

Parte II *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan)

1. La sensibilidad y efectividad de las pruebas empleadas para realizar el tamizaje fitoquímico dependieron de varios factores por lo que muestran el panorama general de los metabolitos existentes en la planta de estudio .



2. En el extracto etanólico se identificaron las familias de metabolitos secundarios correspondientes a Alcaloides, antraquinonas, Cumarinas, Flavonoides y antocianinas, así como Esteroides y Triterpenoides.
3. No se detectaron a las familias de metabolitos secundarios correspondientes a Cardenólicos y bufadienólicos, saponinas, principios amargos ni taninos.
4. No se observó actividad citotóxica positiva significativa ($p > 0.10$) contra *Artemia salina*.
5. En el tamizaje de actividades antifúngicas y antibacterianas realizado se observó una actividad biocida negativa del extracto etanólico, al no inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, hongos levaduriformes, hongos filamentosos y hongos dermatofitos a las concentraciones empleados para el ensayo.
6. El extracto no presentó actividad positiva significativa ($p > 0.10$) contra los Microorganismos ensayados.



XI. Recomendaciones

1. Realizar el fraccionamiento del extracto etanólico de *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) para obtener los metabolitos secundarios puros y estudiar la actividad biológica de los mismos.
2. Realizar estudios de tamizaje fitoquímico y posterior fraccionamiento, con los extractos orgánicos provenientes de otras partes de la planta de las especies estudiadas y estudiar la actividad biológica de los metabolitos secundarios que se aíslen.
3. Realizar otros ensayos con las especies de estudio para ampliar el conocimiento adquirido sobre las mismas.
4. Realizar estudios con otras especies de plantas guatemaltecas pertenecientes a la Familia Celastraceae para ampliar el conocimiento en cuanto a las especies de Celastraceae de Guatemala.



XII. Referencias

1. Hughton, P. J. *Chem. Ed.*, 2001, 78, 175
2. Zaragosa, F. G. *Plantas Medicinales (Fitoterapia Práctica); Infusiones La Leonesa*. 2ª edición. León. Manasul Internacional. 2001.
3. Vlientinck, A.J.; Aspers, S. *Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, Characterisation and biological properties*, Ed, Corrado Tringali, Londres. Taylor & Francis Inc, 2001.
4. Chou, T. Q.; Mei, P. F. *J. Physiol.*, 1936, 10, 529.
5. Beroza, M. J. *Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2136.
6. Kupchan, S. M.; Court, W. A.; Dailey, J. R.; Gilmore, C. J.; Bryan, R. F. J. *Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 7194.
7. Wang, X. W.; Xie, H. *Drugs of the Future*, 1999, 24, 991.
8. Royal Botanic Garden, Kew.: *Vascular Plant Families and Genera*. disponible en: <http://www.rbgkew.org.uk/cgi-bin/web.dbs/genlist.pl?Celastraceae>. (Fecha de consulta 21/07/2005).
9. Heywood, V. H.: *Flowering Plants of the World*. New York: Oxford University Press, 1993.
10. Woodland, D. W.: *Contemporary Plant Systematics*. New Jersey: Prentice-Hall, 1991.
11. Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. 1978, 17, 1821.
12. Zheng, J. R.; Gu, K.; Xu, L.; Gau, J.; Yu, Y.; Tang, M. *Acta Acad. Med. Sin.*, 1991, 13, 391.
13. Gattu, M.; Boss, K. L.; Terry, A. V. Jr.; Buccafusco, J.J. *Pharmacology*, 1997, 57, 793.
14. Kapoor, L. D.: *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*. Boca Raton: CRC Press, 2000. 111p.
15. Borrelli, F.; Borbone, N.; Capasso, R.; Montesano, D.; Izzo, A. A.; De Marino, S.; Capasso, F.; Ferrara, L.; Longo, R.; Zollo, F. *Planta Med.*, 2004, 70, 652.
16. Der Krikorian, A. J. *Etnopharmacol*, 1984; 12: 115.



17. González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L.; Jiménez, I. A. *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products*, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier. 2000; Vol. 23: 649.
18. González, J. G.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G. B. *J. Ethnopharmacol.*, 1982, 5, 73.
19. Colas, R.: *Les plantes amazoniennes designées sous le nom de "Chuchuhuasha"*. Paris: These Imprimerie André Lesot, 1937.
20. Perrot, E. *Les Plantes Medicinales, Part 1*. Paris: R. R., Press Universitaires de France, 1971.
21. Descoins, C., España: Universidad de La Laguna, 1999. (Tesis Doctoral)
22. Otero, J.: *Nuestras hierbas medicinales*. Santa Cruz de Tenerife, España: Caja Insular de Ahorros. 1984.
23. González, A. G.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *Tetrahedron*. 1993, 49, 6637.
24. González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Canela, N. J.; Moujir, L. M. *Phytochemistry*, 1996, 43: 129.
25. Ahmed, M. B.; El Qirbi, A. B. *J. Ethnopharmacol.*, 1993, 39: 213.
26. Pullen, C.; Schmitz, P; Hoffmann, D.; Meurer, K.; Boettcher, T.; Bamberg, D.; Pereira, A.; Castro, F.; Hauser, M.; Geertsema, H.; Van Wyk, A.; Mahmud, T.; Floss, H.; Leistner, E. *Phytochemistry*, 2003, 62: 377.
27. Liu, C.; Chari, V. J. *Expert. Opin. Invest. Drugs*, 1997, 6: 169.
28. Saleh. Q. *Planta Med.*, 1972, 21: 410.
29. Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.*, 2002, 31: 43.
30. Yang, D.; Ye, M. X.; Pang, K. W.; Zou, N.; Letcher, R. M. *J. Org. Chem.*, 1998, 63: 6446.
31. Zhang, Z.; Ding, L.; Qian, S.; An, D. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 1993, 2: 144.
32. Spivey, A. C.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.*, 2002, 31: 43.
33. Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Hopper, A.; Moriaty, D.; Lehrman, G. K.; Niekman, A.; Morcomb, S.; Bates, R. B.; Mc. Clure, K.; Stessman, C.; Haber, W. *Planta Med.*, 1998, 64: 583.

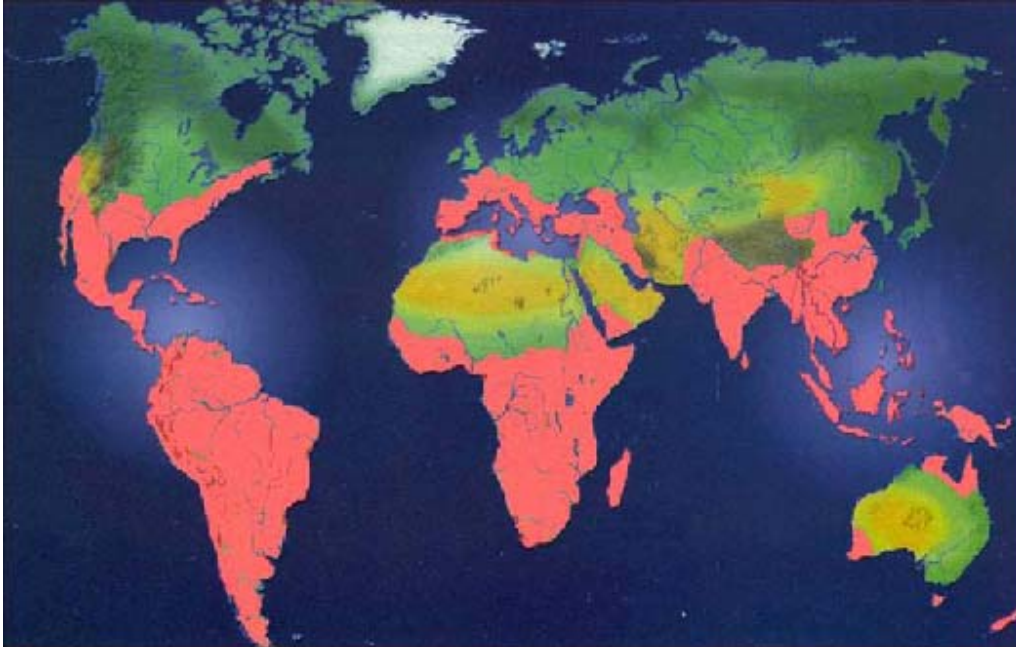


34. Sotanaphun, U.; Lipipum, V.; Suttisri, R.; Bavovada, R. *Planta Med.*, 1999, 65: 450.
35. Chen, K.; Shi, Q.; Kashiwada, Y.; Zhang, D.; Hu, C.; Jin, J.; Nozaki, H.; Kilkuskie, R.; Tramontano, E. *J. Nat. Prod.*, 1992, 55: 340.
36. Shimada, K.; Kyuno, T.; Nambara, T.; Uchida, I. *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 30: 4075.
37. Bishay, D. W.; Kowalewski, Z. *Phytochemistry*, 1973, 12: 693.
38. Yang, G.-Z.; Li, Y.- C. *Helv. Chim. Acta*, 2002, 85: 168.
39. Familia Celastraceae: disponible en www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm. (Fecha de Consulta: 20.10.2005).
40. Standley, P.; S  ller, J.; *Flora de Guatemala*, Vol.24, Parte VI. Chicago Natural History Museum. 1949. (p.201-218).
41. Manual de Operaciones, Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.
42. Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.
43. Font Quer, P. *Diccionario de Botánica*; España: Labor, S.A., 1953. 1236p.
44. Gran Sopena, *Diccionario Enciclopédico*, XX Volúmenes; Ramón Sopena S.A. Barcelona, España.



XIII. Anexos

Anexo No. 1. Mapa distribución geográfica de las Celastráceas



Se observa en rosado las regiones donde se encuentran plantas pertenecientes a la familia de las Celastráceas. Heywood, V. H.: *Flowering Plants of the World*; Oxford University Press, New York, 1993.

Anexo No. 2. Clasificación Taxonómica de la Familia Celastraceae

División	<i>Spermathophyta</i>
Subdivisión	<i>Magnoliophyta (Angiospermas)</i>
Clase	<i>Magnoliatae</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Suborden	<i>Celastranae</i>
Orden	<i>Celastrales</i>
Familia	<i>Celastraceae</i>

Información tomada de Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. 1978, 17, 1821.



Anexo No. 3. Cuadros de Microorganismos a empleados y de Interpretación de Resultados para Tamizaje de Actividades Biológicas

Microorganismos empleados

Organismo de estudio		Especie Representante	Código Cepa	Observaciones
Bacteria	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Empeora cuadro IG
		<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	Empeora cuadro IG
	Gram -	<i>Escherichia coli</i>	-----	Gastrointestinal
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Nosocomial
		<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028	Gastrointestinal
Hongo	Miceliar	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-----	-
		<i>Micobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	-
	Levaduriforme	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	-
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	CCQQ C13	-
	Filamentosos	<i>Aspergillus flaus</i>	CCQQ A75	-
		<i>Aspergillus. niger</i>	-----	-
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	-----	-
	Dermatofitos	<i>Trichophyton. rubrum</i>	-----	-
		<i>Microsporum gypseum</i>	-----	-
		<i>Sacharomices cereviciae</i>	-----	-
<i>Organismo Crustáceo</i>	<i>Artemia salina</i>		-----	-

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

Interpretación de Resultados

Actividad	+	Inhibición crecimiento
	-	crecimiento

Elaborado por Carmen Garnica, datos tomados Manual de Operaciones, Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Anexo No. 4. Glosario

1. **Arilo:** (del bajo latín arillus, pepita de la uva). M. Excrecencia que se forma en la superficie del rudimento seminal (o en el extremo del funículo) localizada en muy diversos puntos del tegumento externo y también muy variable por su desarrollo. Aplícase al fruto cuyo pericarpio se abre naturalmente al llegar la época de la madurez, para dar salida a la semilla.¹
2. **Baya:** (del francés baie, y éste del latín, baca). Fruto de algunas plantas, carnoso y jugoso. Contiene semillas rodeadas de pulpa, como la uva y la grosella.
3. **Coriáceas:** (del latín coreacêus, de coriûm, cuero). Dícese de los órganos que, como a veces las hojas y las brácteas, y también los pericarpios secos y delgados de algunos frutos, con sus alas, sus espermodermos, etc. , son firmes duros y presentan una consistencia bastante parecida a la del cuero.
4. **Dehiscente:** (del latín dehicens, -entis, p.a. de dehiscere, abrirse), adj que se abre, hablando de un fruto o de esporangio, de una antera etc.
5. **Dídimos:** (del griego dídumos, gemelo, mellizo), adj. Aplicase a los órganos o partes orgánicas que forman pareja, hermanados o gemelos como los tubérculos de diversas orquídeas.²
6. **Distribución Pantrópica:** (del griego pân, todo y de trópico). Dícese de todas los animales y las plantas distribuidos por todas las regiones tropicales de la Tierra.
7. **Drupa:** (del latín drupa, aceituna que empieza a madurar), f. termino introducido por LINNÉ. En general se llama así toda suerte de fruto carnoso con un hueso en su interior.

¹ Dr. P. Font Quer, Diccionario de Botánica; Labor, S.A. España, 1953, 1236 pags

² Gran Sopena, Diccionario Enciclopédico, XX Volúmenes; Ramón Sopena S.A. Barcelona, España.



8. **Especie:** Grupo de individuos dotados de caracteres esenciales comunes. Es división del género, y a veces se subdivide en variedades o especies. Conjunto de especies.
9. **Estaminodio:** (del latín staminodium, der de stamen, -inis, estambre). Aplicase al estambre que, habiendo perdido su función, permanece completamente estéril al final de su desarrollo.
10. **Estípulas:** (del latín stîpula, diminutivo de stipa). Apéndice foliáceo situado en los lados del pecíolo o en la unión de este con el tallo.
11. **Excrecencia:** (del latín, excrecentia). Carnosidad superflua que altera la superficie del cuerpo vegetal.
12. **Género:** Conjunto de especies que tienen ciertos caracteres comunes.
13. **Hibridación:** Producción de seres híbridos.
14. **Híbridos:** (del latín hybrîda). Ser viviente procreado por dos individuos de distinta especie.
15. **Indehiscente:** Que no es dehiscente.
16. **Oblongo-elíptico:** Que es más largo que ancho - Que tiene forma de elipse, es decir, de una curva plana y cerrada, resultante de cortar un cono por un plano que encuentra todas las generatrices a un mismo lado del vértice.
17. **Ovado-lanceolado:** De figura de huevo, ovalado – Dícese de las hojas y de los lóbulos de ellas cuya figura es semejante al hierro de la lanza.



18. **Sámara:** (del latín samâra, simiente del olmo). Fruto seco, indehiscente, con pocas semillas y pericarpio extendido a modo de ala, como el del fresno, el del olmo, etc.
19. **Sépalo:** (del latín separ, _ârem, separado, apartado). Cualquiera de las divisiones del cáliz de la flor.
20. **Vermífugo:** (del latín vermis, gusano, y fugâre, ahuyentar). Que tiene virtud o eficacia para matear las lombrices intestinales.
21. **Zimosa:** (de zimo, fermento fermento, y la terminación osa, propia de nombres de carbohidratos y derivados hidrolíticos de las proteínas.). Bioquímica; invertida.

Anexo No.5. Figuras y Fotos de Materiales y Métodos

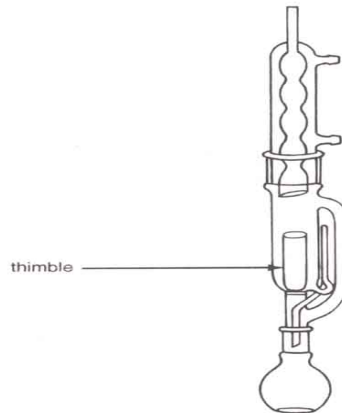
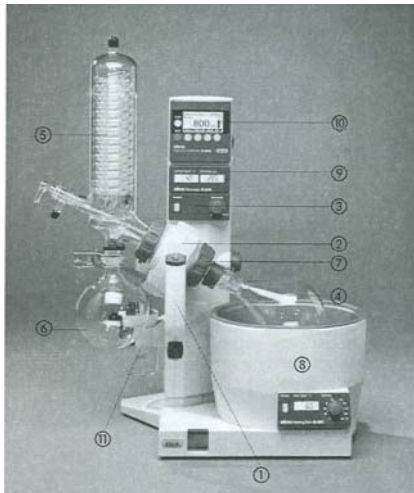


Figura No. 1. Equipo Soxhlet. Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



1. Alzador rápido.
2. Accionamiento
3. Cabezal electrónico.
4. Matraz de evaporación.
5. Módulo de vidrio.
6. Matraz receptor.
7. Sistema de hermetización.
8. Baño calefactor.
9. Módulo indicador de velocidad de rotación y temperatura del vapor.
10. Control de Vapor.
11. Conjunto de válvulas.

Foto No. 16. Rotavapor con sus partes señaladas. Extraído de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Foto No.17. Extractos etanólicos de una planta estudiada en el Lipronat. Extraído de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Foto No. 18. Resultados de una Prueba de Actividad Antimicótica *in vitro*. A la izquierda se muestra una actividad negativa y a la derecha un control. Extraído de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005

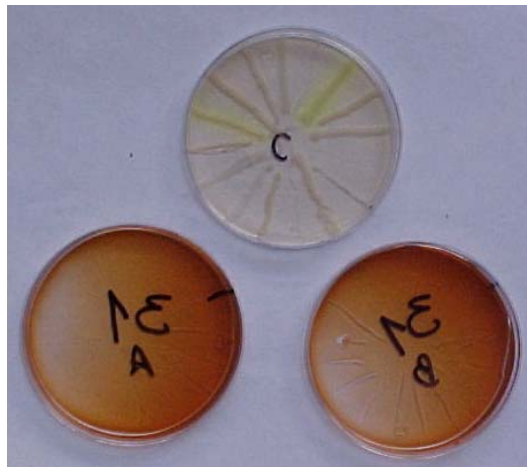


Foto No. 19. Resultados de una Prueba de Actividad Antibacteriana *in vitro*. Abajo se muestra actividad positiva de agar-planta y arriba el. Extraído de Manual de Operaciones, Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.

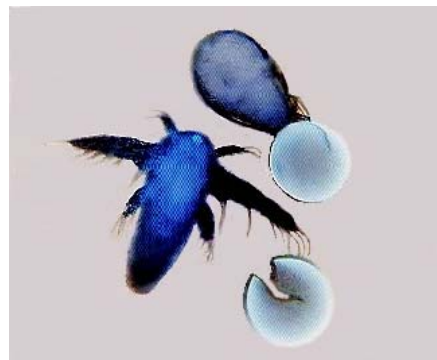


Foto No. 20. Huevos y nauplios de *Artemia Salina*. Extraído de Manual de Operaciones, Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Foto No.21. Equipo y material necesario para llevar a cabo ensayo de Citotoxicidad con *Artemia Salina*. Extraído de Manual de Operaciones, Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Foto No. 22. Foto que muestra inóculos hechos a varias concentraciones del extracto, cada Caja de Petri posee 4 concentraciones distintas. Manual de Operaciones, Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Foto No. 23. Se observa una cámara cromatográfica al fondo y distintas cromatoplasmas de cromatografías hechas a extractos de plantas. Extraído de Manual de Operaciones, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005.



Anexo No.6 Fotografías de Resultados

Parte I: *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa)

Tabla No. 33. Cromatografías en Capa Fina realizadas

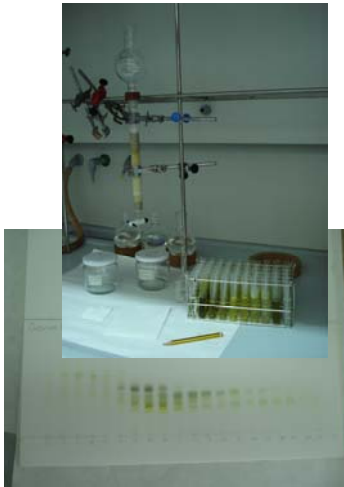


Cromatografía Realizada	Capa fina (CCF)	Preparativa en capa fina (CPCF)	Capa fina de alta resolución (CCFAR)
<p>Fotografías</p>			
<p>Observaciones</p>	<p>Se realizan sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm.. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 nm, y posteriormente utilizando revelador oleum (H₂O:H₂SO₄:AcOH, 4:1:20) y calentamiento a 120-200°C.</p>	<p>Se utilizan placas de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm. La cantidad de muestra a sembrar es de 40 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes. La detección de los productos se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 nm, y su posterior revelado con revelador oleum, aplicando cuidadosamente sobre el borde, protegiendo el resto de la placa y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.</p>	<p>Se utilizan placas de 1 mm de espesor de gel de sílice de 60, con indicador de fluorescencia a 254 nm. La resolución de estas placas es mayor que las anteriores y la cantidad a sembrar fue entorno a 10 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes. La detección de los productos se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 nm, y posteriormente pulverizando oleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.</p>

Tabla No. 34. Información de Cromatografías en Columna realizadas



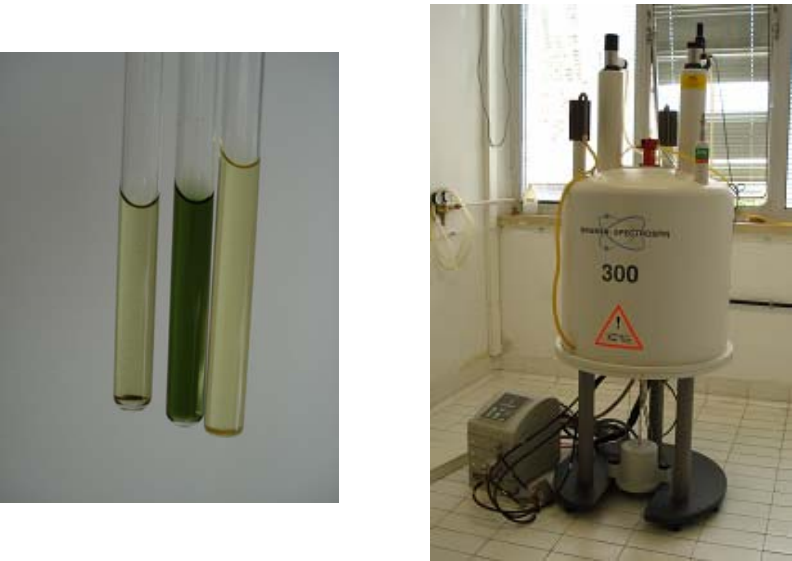
Cromatografía Realizada	Cromatografía en columna (CC)	Cromatografía de exclusión molecular (CEM)
<p>Fotografías</p>		
<p>Observaciones</p>	<p>En la realización de las columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina de 0,063–0,200 nm de diámetro. La gel de sílice se suspende en el eluyente y se compactó con una bomba de vacío. Algunas de las muestras fueron aplicadas disueltas y otras adsorvida en gel de sílice de 0,2-0,5 nm de diámetro.</p>	<p>En estas se usa como soporte Sephadex LH-20. Posterior a una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol durante cerca de doce horas. Esta columna se estabiliza posteriormente con la mezcla que se usa como eluyente, para lo cual se eluye con 1,500 ml de una mezcla de <i>n</i>-hexano–cloroformo–metanol (2:1:1). La muestra a cromatografiar tras ser filtrada se coloca en la cabeza de la columna disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna.</p>



Tabla No. 35 Resonancia magnética nuclear (RMN-¹H)

Resonancia	Resonancia magnética nuclear (RMN- ¹ H)
Fotografías	 The image contains two photographs. The left photograph shows three test tubes containing liquids of different colors: a pale yellow liquid, a dark green liquid, and a light yellow liquid. The right photograph shows a Bruker Avance 300 NMR spectrometer, a large white cylindrical machine with various tubes and a warning sign, sitting on a tiled floor in a laboratory setting.
Observaciones	<p>Los espectros de RMN se obtienen en el espectrofotómetro Bruker Avance 300 (300 MHz para ¹H), para ello los productos son disueltos en los solventes deuterados afines a la polaridad de las fracciones que se van a ser identificadas.</p>



Parte II: *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan)

Fotografías de Tamizaje Fitoquímico vía prueba húmeda y CCF



FotoNo.24



FotoNo.25



FotoNo.26



FotoNo.27

Fotos No.24, 25,26, 27 Pueden observarse distintas reacciones de precipitación y de cambio de coloración que verifican la presencia de familias de metabolitos secundarios específicas



Foto No.28. Materiales empleados para Cromatografía en Capa Fina, se observan las muestras aplicadas en placa

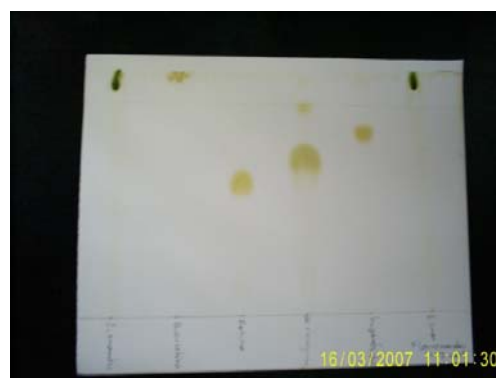


Foto No.29. Placa Cromatográfica posterior a la corrida



Foto No.30. Placa Cromatográfica previo al tratamiento químico observada a 365 nm



Foto No.31. Placa Cromatográfica tratada químicamente observada a 365 nm

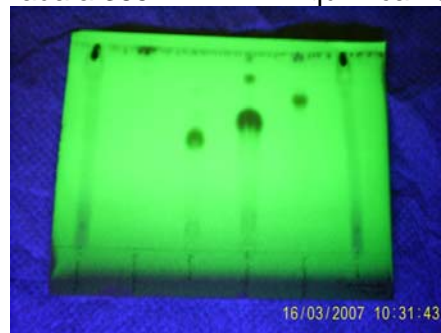


Foto No.32. Placa Cromatográfica tratada químicamente observada a 264 nm

En las fotografías No. 30 a la 32 puede observarse la fluorescencia y coloraciones características de las manchas del extracto y de los estándares empleados.



Foto No.32 Se observa el crecimiento de los Microorganismos Ensayados *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Micobacterium smegmatis*, *Candida albicans* *Cryptococcus neoformans*



Fotografías de Tamizaje de Actividades Biocidas



Foto No.33 *Sacharomices cereviciae*



Foto No.34 *Trichophyton. rubrum*



Foto No.35 *Micobacterium smegmatis*



Foto No.36 *Microsporium gypseum*



Foto No.37 *Aspergillus. niger*



Foto No.38 *Aspergillus flaus*

Foto No.33 a la 38. Puede observarse el crecimiento de los Microorganismos Ensayados, lo que indica una actividad negativa del extracto