

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

**CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES Y  
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
DE HOJA DE TRES ESPECIES DE PIPERACEAS  
(*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*)**

**ANA LUCRECIA GÓMEZ LÓPEZ**

**Química Farmacéutica**

**Guatemala, octubre de 2008**

# INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	5
4. Justificación.....	15
5. Objetivos.....	16
6. Hipótesis.....	17
7. Materiales Y Métodos.....	18
8. Resultados.....	35
9. Discusión de Resultados.....	46
10. Conclusiones.....	50
11. Recomendaciones.....	52
12. Referencias.....	53
13. Anexos.....	57

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

**CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES Y  
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
DE HOJA DE TRES ESPECIES DE PIPERACEAS  
(*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*)**

**INFORME DE TESIS**

**PRESENTADO POR  
ANA LUCRECIA GÓMEZ LÓPEZ**

Para optar al título de

**Química Farmacéutica**

Guatemala, octubre de 2008

## 1. RESUMEN

En el presente estudio se seleccionaron tres especies del género *Piper* (*Piper jacquemontianum*, *Piper oradendron* y *Piper umbellatum*), con el fin de evaluar sus características medicinales atribuidas por la población en base a la caracterización de sus metabolitos secundarios y a la actividad biocida (antibacteriana, antilevadura, larvicida y citotóxica) de los extractos metanólicos, diclorometánicos y sus aceites esenciales.

Se colectaron muestras de las especies en diferentes áreas del interior de la república (Ecoparcela “El Cacaotal” en Samayac, Suchitepéquez; Parque ecológico Laguna de Lachuá en Cobán Alta Verapaz; Parque Ecológico Cerro San Gil, municipio de Livingston, departamento de Izabal), las cuales fueron identificadas botánicamente en el Herbario USCG, Centro de Estudios Conservacionistas (CECON).

La extracción se realizó mediante percolación con diclorometano y metanol y se concentró utilizando rotavapor. El mayor rendimiento de extractos se obtuvo con el extracto diclorometánico de *P. umbellatum* (7.90%) y de los extractos metanólicos el de mayor rendimiento fue *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (11.01%).

Para la caracterización química de los extractos se realizaron ensayos macro, semi-micro y cromatografía en capa fina, determinándose la presencia de alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, cumarinas y aceites volátiles.

Se determinó la actividad antimicrobiana (bacterias y levaduras) de los extractos y aceites mediante el método de difusión para los aceites esenciales y el método de dilución en el caso de los extractos. Evidenciándose actividad significativa ( $P < 0.10$ ) del extracto *P. umbellatum* (diclorometánico), *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metanólico) contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium smegmatis*. Los extractos diclorometánico de *P. jacquemontianum* presentaron una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*. En cuanto a los aceites esenciales de *P. jacquemontianum* y *P. umbellatum* se encontró únicamente actividad significativa ( $P < 0.10$ ) en la fase de tamizaje contra *Escherichia coli*.

Ninguno de los extractos o aceites esenciales presentaron actividad citotóxica contra *Artemia salina* y los extractos no presentaron actividad insecticida significativa ( $P > 0.10$ ) contra *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* por lo que, se determinó la concentración letal mayor a 1mg/mL.

Se alcanzó el objetivo de generar información fitoquímica y de actividad biocida de tres especies de género *Piper* que habían sido estudiadas anteriormente.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace varios miles de años (1). Recientemente la utilización de la medicina tradicional ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una alternativa económicamente viable para poblaciones de países en desarrollo (2). La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia, a pesar de la gran variedad de medicamentos de síntesis química existente, ya que las plantas medicinales ofrecen la ventaja de causar menos efectos secundarios en comparación con los medicamentos de síntesis, además representan una mayor disponibilidad para la población. Esta situación exige que se profundice en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extrae (3).

Cada región del mundo posee diferentes atribuciones medicinales para su flora (4). En Guatemala la medicina natural representa una alternativa importante para el tratamiento de diversas patologías y fue el recurso curativo utilizado por nuestros antepasados, los mayas. Afortunadamente, las condiciones climáticas y agrícolas de nuestro país favorecen el crecimiento de especies con distintas propiedades terapéuticas (5).

Dentro de la flora guatemalteca existe una gran variedad de especies vegetales con propiedades aromáticas y medicinales, como es el caso de las Piperáceas a las cuales se les atribuyen propiedades analgésicas, antipiréticas y descongestionantes.

En esta investigación se seleccionaron tres especies de este género de uso común que no cuentan con la validación científica de sus propiedades atribuidas popularmente, siendo el objetivo de la presente investigación: *P. jacquemontianum* (cordoncillo), *P. oradendron* (cordoncillo) y *P. umbellatum* (Santa María) las cuales se encuentran distribuidas en diferentes regiones del país.

Las muestras fueron evaluadas en función a los siguientes parámetros: demostración de la actividad biocida (bacterias, levaduras, larvas y citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina*) de los extractos diclorometánicos y metanólicos, caracterización fitoquímica del extracto metanólico y de los aceites esenciales se evaluaron las actividades antibacteriana, antilevadura y citotóxica.

Este estudio tuvo como objetivo contribuir al aprovechamiento de los recursos naturales de Guatemala. La continuidad al mismo permitirá que estas plantas puedan validarse y así utilizarse como base para nuevos productos medicinales y/o el desarrollo de nuevos productos aromáticos.

### 3. ANTECEDENTES

Las especies pertenecientes a la familia *Piperaceae* frecuentemente son arbustos aromáticos, rara vez como árboles, lianas o epifitos. Hojas alternas, enteras a menudo lobuladas en la base, con frecuencia la morfología foliar puede variar drásticamente en una misma planta. Inflorescencias terminales, opuestas y solitarias, raramente axilares y en grupo sobre un eje común ramificado simulando umbelas o panículas, las flores forman bandas alrededor de la espiga; el fruto al madurar es ligeramente distorsionado por compresión de los frutos adyacentes. La familia *Piperaceae* comprende 10 géneros y aproximadamente 1,400 a 2,000 especies, distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del planeta. En Guatemala, están descritas aproximadamente 88 especies de *Piper*, la Flora de Guatemala informa de 11 especies distribuidas en 7-9 departamentos, 24 con una distribución media en 2-9 departamentos y 53 con una distribución escasa, de las cuales 45 son endémicas del departamento (6).

Las plantas del género *Piper* son conocidas como cordoncillo y se les atribuyen propiedades analgésicas, antirreumáticas, diuréticas, carminativas, estimulantes, digestivas, antiulcerosas, dermatológicas, antidiarreicos, antihelmínticas, antiflogísticas y bactericidas (7, 8, 9).

Se le da el nombre de aceite esencial a los aceites volátiles o aceites etéreos, mezclas complejas de sustancias de variadas funciones químicas. Constituidas por monoterpenos y sesquiterpenos, que están asociados a otros componentes generando un olor característico del vegetal.

Los métodos de obtención, la mayoría son por destilación. Tres procesos pueden ser considerados: la destilación con agua o hidrodestilación, la destilación con agua y vapor de agua (cohobación) y la destilación directa con vapor de agua (por arrastre con vapor). Además de la destilación los aceites esenciales pueden ser obtenidos por extracción con solventes y por expresión (10,11).

En el 2005, se realizó un estudio sobre la caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de cinco especies nativas de piperaceas. Se encontró que el aceite esencial obtenido de las especies evaluadas tenía un rendimiento entre 0.3-2.0% y la presencia de metabolitos secundarios tales como flavonoides, saponinas, principios amargos, alcaloides y aceite esencial en todas las especies, cumarinas únicamente en *P. auritum*, y antraquinonas en muy poca cantidad en *P. auritum*, *P. aduncum*, *P. oradrendron* y *P. hispidum*. La evaluación de la actividad biológica se realizó

mediante el método de dilución y el método de difusión en disco, el cual resultó más efectivo en el caso de aceites esenciales. Los aceites esenciales de *Piper aeruginosibaccum*, *P. hispidum*, *P. patulum*, *P. auritum*, *P. aduncum* y *P. oradendron* presentaron actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis* a una concentración menor de 0.1 mg/mL, presentando *P. oradendron* la mayor actividad. Los aceites esenciales de las especies de *Piper* antes mencionadas presentaron actividad contra *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* y *Artemia salina* a una concentración menor de 0.5 mg/mL (10).

### **3.1. Familia Piperaceae**

Presenta 10 géneros, aproximadamente 1,400-2,000 especies, la mayoría pertenecen a dos géneros, los cuales son *Piper* y *Peperomia*.

**3.1.1. Reino:** Plantae

**3.1.2. Filo:** Magnoliophyta

**3.1.3. Clase:** Magnoliopsida

**3.1.4. Orden:** Piperales

**3.1.5. Nombres comunes:** Cordoncillo

#### **3.1.6. Descripción botánica del género *Piper***

Arbusto. Tallo estriado, pubescente, con pelos largos simples o segmentados. Pecíolo mide entre 2.5 a 3 cm de largo, vaginado hacia la mitad, pubescente, con pelos simples y segmentados. Hojas alternas, ovado-elípticas, miden entre 11 a 17.5 cm de largo y 6 a 9 cm de ancho, ápice agudo, borde diminutamente aserrado, haz diminutamente pubescente; envés diminutamente puberulento, las nervaduras y nervios son pubescentes; nervadura pinnada. Muestra sin flor ni fruto. Su determinación botánica fue llevada a cabo con la ayuda de un experto botánico (7,12).

#### **3.1.7 Hábitat y distribución geográfica**

Las especies de este género se encuentran una mayor diversidad en bosques húmedos premontanos y de tierras bajas. Su distribución es en regiones tropicales y subtropicales (12).

### **3.2. Usos etnomédicos**

Este género tiene interés por su amplia utilización en la medicina tradicional de varios países, dichas especies presentan una gran complejidad tanto desde el punto de vista botánico como químico. Es utilizado localmente como antídoto contra mordeduras de serpientes y así mismo como remedio eficaz en el tratamiento de cálculos renales y afecciones bronquiales. Muchas especies se conocen comúnmente como "Cordoncillo"(9).

### **3.3. Extracción y caracterización química**

Cuando se realizan investigaciones para buscar o confirmar una actividad biológica es importante la determinación de los constituyentes químicos de la planta. El escrutinio fármaco químico constituye el marco de referencia convencional para el estudio de los principios activos de plantas medicinales. Este enfoque se enmarca en la extracción y fraccionamiento bioguiado el cual consiste en la preparación de extractos crudos, fracciones obtenidas a partir de dichos extractos y la evaluación de su bioactividad (13,14).

**3.3.1. Extracción:** Para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar.

La extracción para tamizaje consiste en realizar una extracción con disolventes con diferentes polaridades, generalmente diclorometano o hexano, éter, metanol, etanol y agua (5). Por la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rotavapor) hasta alcanzar un estado de miel. En el caso de los extractos acuosos se suele concentrar por medio de liofilización. En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar (15).

**3.3.2. Tamizaje fitoquímico:** Permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés, éste se fundamenta en la reacción selectiva de grupos funcionales específicos con reactivos capaces de formar complejos visualizables por el desarrollo de coloraciones características o por la formación de precipitados. Para el análisis fitoquímico preliminar se usan técnicas macro o micrométricas en tubo o capa fina y para el análisis fitoquímico definitivo y elucidación estructural se técnicas de cromatografía en papel, capa fina (TLC) o columna, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),

cromatografía de gases, espectroscopia infrarroja, análisis de espectroscopia de masas, técnicas de refracción y cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (MNR), etc., pero en todos los casos se recomienda un fraccionamiento bioguiado (5).

La cromatografía en capa fina es un método simple y eficiente. Este método sirve para identificar las drogas vegetales, sus extractos y tinturas. La respuesta reactiva de estándares conocidos de grupos funcionales particulares se utiliza frecuentemente como medio de comparación.

### 3.4. Evaluación de la actividad biocida

La actividad biocida se refiere a la capacidad de una sustancia para causar la muerte en determinados organismos, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Micobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli*, es detectada por medio de una serie de ensayos biológicos *in vitro*.

Esta serie de ensayos biológicos (bioensayos), es decir, fase de pretamizaje es útil para dar una idea preliminar de las potencialidades de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro de especies vegetales. Las técnicas utilizadas en la fase de pretamizaje pueden tener distintos grados de dificultad en la medida en que se identifican con mayor claridad las potencialidades de las especies en estudio, son relativamente sencillas siempre que no involucren animales; además son baratas, rápidas, reproducibles y permiten evaluar un número grande de muestras.

Estos bioensayos han sido empleadas exitosamente en un sinnúmero de estudios realizados alrededor del mundo y sin ir más lejos en Guatemala, propiamente en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia para evaluar la actividad biocida de distintas plantas de uso popular en el país (13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

La actividad biocida abarca un amplio espectro de organismos, pero con fines prácticos nos remitiremos a la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica), larvicida y citotóxica en las especies vegetales.

**3.4.1. Ensayo para evaluar la actividad citotóxica contra *Artemia salina* (Camarón salino) *in vitro*:** Por lo general el término citotóxico es empleado para describir la actividad tóxica de un compuesto aislado en células tumorales

*A. salina* (también llamado camarón amarillo) es un pequeño crustáceo que vive en aguas hipersalinas y salobres, actúa como un indicador natural de la presencia de toxicidad en estas fuentes. Las larvas (nauplios) de este crustáceo son altamente

sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas por lo que son útiles para medir la potencial citotoxicidad de una sustancia y se utiliza para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y sensible, aunque es una prueba útil no es selectiva para ninguna molécula química. Este organismo también es empleado como indicador en estudios ambientales, tamizaje de toxinas ambientales y en el tamizaje de toxinas naturales (24, 25).

El primer reporte de su uso como organismo de prueba aparece en 1956, el procedimiento fue descrito por Michael *et al.*, y posteriormente fue adaptado por Meyer *et al.*, como un útil bioensayo en la investigación de productos naturales (17, 24, 26). En 1993, Solís y un grupo de investigadores propusieron un nuevo ensayo en microplacas para evaluar citotoxicidad contra *A. salina*, el cual mostró resultados comparables al método de tubo de ensayo publicado previamente, este ensayo requiere pequeñas cantidades del extracto y facilita el ensayo de gran número de muestras y diluciones (17, 25).

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* es utilizado comúnmente para determinar la actividad antitumoral de las fracciones de extractos, a pesar de no representar un medio eficaz para la predicción de la actividad antitumoral *in vivo*. Además es útil como prueba de pretamizaje en la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, antimicrobianas y/o plaguicidas debido la pequeña cantidad de muestra requerida para su realización, rapidez, bajo costo, simplicidad, y facilidad para evaluar gran número de plantas, así también por la sensibilidad demostrada por *A. salina* ante pequeñas cantidades de extractos vegetales. El método tiene importante correlación con la actividad anti*Trypanosoma cruzi*, aunque su correlación con otras actividades no ha sido bien estudiada.

Este bioensayo es aplicable para detectar citotoxicidad en plantas que contienen cumarinas, ya que detecta la presencia de compuestos bioactivos en extractos, guía el fraccionamiento químico y se inicia con la caracterización biológica de un compuesto aislado (14). La realización del bioensayo a lo largo del fraccionamiento asegura que todo el esfuerzo se orienta hacia los compuestos activos, que frecuentemente están presentes en concentraciones de menos de un miligramo por kilogramo de planta seca.

El ensayo se realiza sobre larvas del crustáceo, de no más de 24 horas de "nacimiento" y toma aproximadamente 24 horas más la evaluación de los resultados. Los ensayos se realizan sobre agua de mar natural o artificial en presencia de la luz, a una temperatura máxima de 30°C. En número de 10 a 15 nauplios se depositan en los

pocillos de una placa a la cual se le agrega el extracto a evaluar. Los extractos son evaluados a distintas concentraciones, 10, 100 y 1000 ppm, con el fin de encontrar la concentración letal media, que es la concentración en la que el 50% de las larvas mueren por efecto del extracto. Si el porcentaje de muertos es mayor del 50 por ciento se procede a calcular la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ), que representa la dosis a la cual se presentará el 50 por ciento de nauplios muertos con un límite de confianza del 95 por ciento. Este valor puede calcularse ya sea por la fórmula:  $SE\ CL_{50} = \sqrt{(0.79 h R/n)}$  donde  $h$  = promedio de intervalo entre dosis (dosis logarítmica),  $R$  = rango intercuartil ( $CL_{75}$  o  $CL_{25}$ ) desde los porcentajes acumulativos,  $n$  = número de nauplios (o el promedio),  $R$  es obtenido a partir del porcentaje de mortalidad versus dosis o bien por medio de un gráfico se traza según el número acumulado de sobrevivientes con el número de muertos en el mismo eje (número de animales versus dosis logarítmica). Algunos factores que afectan la reproducibilidad de la prueba son la edad de la larva, la temperatura, la composición salina del medio. (27).

Esta prueba ha demostrado tener buena correlación ( $p = 0.036$ ) con la citotoxicidad, así como la prueba de inhibición de la tumefacción de la papa. Esta última prueba y la citotoxicidad contra *A. salina* son reportadas como las más adecuadas par el pretamizaje de sustancias antitumorales (28).

**3.4.2. Tamizaje antimicrobiano:** La actividad antimicrobiana es empleada para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Es indispensable en la evaluación de la actividad antimicrobiana conocer y controlar las condiciones de laboratorio del modelo microbiano, tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro* (25).

Factores como la composición y el pH del medio, el método de extracción, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo y los microorganismos utilizados en la prueba pueden hacer variar los resultados, por lo que es difícil establecer un método estandarizado para el estudio de la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales (29).

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en dos fases: tamizaje y concentración mínima inhibitoria. Este último procedimiento se realiza únicamente con los microorganismos cuyo procedimiento fue inhibido por el extracto en la primera fase. Se evalúa si hubo crecimiento, una completa supresión del crecimiento es

requerida para declarar que el extracto es activo. Los extractos que son activos deben ser probados nuevamente para confirmar los resultados, para evitar confusiones en la interpretación de resultados provocadas por probable contaminación durante la preparación del medio de cultivo deben colocarse dos cajas de control positivo por lote de pruebas (30). Adicionalmente, para los casos en los que hubo crecimiento es posible evaluar de nuevo la actividad a distintas concentraciones.

Generalmente la medición de la actividad antimicrobiana se realiza por medio del método de difusión o el método de dilución. La selección del método depende de las necesidades del investigador, las cuales han hecho que los métodos sufran modificaciones con el fin de optimizar las técnicas empleadas y por consiguiente obtener resultados confiables.

**3.4.2.1. Método de dilución en agar:** Se basa en el crecimiento exponencial de bacterias susceptibles inoculadas en superficie o profundidad en los medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y esta basado en el método descrito por Mitscher *et al.* (30, 31). En este método una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua.

El método de dilución se emplea para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, es decir, la CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible, esta prueba puede ser en caldo (tubo) y en agar (placa) (5). Se ha utilizado principalmente para determinar los valores de CIM de un extracto, aceite esencial o sustancia pura, así como para el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana (29), además permite evaluar la CIM usando diluciones decrecientes del extracto.

El método de dilución es el único método para determinar el mínimo de concentración bactericida (CMB). El CMB es determinado por subcultivos de los tubos con inhibición en un plato de agar o en medio líquido, cuando el microorganismo no crece, la muestra es un microbicida (29). La dilución en medio líquido es la técnica más complicada pero, también la más precisa. Se interpreta como resultado positivo, la ausencia del crecimiento de microorganismo.

El método de dilución sólido, es parecido al método de dilución en líquido. Este método es rápido y la CIM de un producto puede ser determinada contra seis microorganismos a la vez (30). Este método permite la inoculación de aproximadamente

20-25 microorganismos en platos estandarizados (29). El método de Mitscher L. *et al* (33) establece la cantidad de muestra necesaria, la cual no debe ser mayor de 1 mg de muestra en 1 mL del medio de cultivo. Las muestras activas son reensayadas a una concentración de 0.1 mg/mL.

Las ventajas de este método son su simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad de estandarizar y procesar gran cantidad de muestras, además ofrece la posibilidad de usarlo en el estudio de antimicrobianos solubles en agua o muestras insolubles como aceites esenciales, además pueden ser sembrados hasta seis microorganismos en una caja de Petri (29).

**3.4.2.2. Método de difusión:** Este procedimiento se basa en el descrito por Bauer-Kirby y es usado para evaluar la actividad antibacteriana vegetal (5). Se utiliza un disco, agujero o cilindro como reservorio en el agar, el cual contiene la muestra a ensayar, luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición).

El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedios o susceptibles para cada agente antimicrobiano. Este método es frecuentemente utilizado en investigación, pero tiene la desventaja de ser poco creíble en casos en los cuales la muestra se difunde con dificultad en el medio debido a la inexistente relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana lo cual fue demostrado por Pellecuer *et al* (29, 32).

Este método no requiere dispersión homogénea en agua del extracto a evaluar, la cantidad de muestra utilizada en el tamizaje es pequeña y permite probar cinco a seis compuestos contra varios organismos, además es el más conveniente para el tamizaje preliminar de sustancias puras (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.). Los resultados se evalúan de la siguiente manera:

- Crecimiento a lo largo de la estría: actividad negativa.
- No hay crecimiento a lo largo de la estría: actividad positiva, indica inhibición.
- Luego se compara con los métodos de dilución (29).

**2.4.2.3. Microorganismos:** Los microorganismos a emplearse para la detección de la actividad antimicrobiana deben ser en la medida de lo posible estándar, pertenecientes a colecciones confiables o bien ser cepas comerciales internacionalmente reconocidas que para estos fines son proveídas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC).

En Guatemala se han usado también cepas provenientes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (FCCQQF), del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) o del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta (33).

**3.4.3. Actividad insecticida:** Consiste en evaluar la actividad de los extractos vegetales para matar larvas de insectos de importancia médica en un medio micrométrico líquido, en este caso larvas de *Aedes aegypti*.

Se ha encontrado que la efectividad de las plantas para matar a las larvas depende de las dosis aplicadas, la parte de la planta utilizada así como la especie de mosquito que se utiliza. Existen aproximadamente 3200 especies de mosquitos, siendo *Anopheles* y *Aedes*, vectores de dos de las más importantes enfermedades en el mundo, paludismo y dengue, respectivamente, por lo que en el pasado han sido probados compuestos naturales puros con actividad larvicida, como una alternativa contra dichas enfermedades (16).

Las larvas pertenecientes a *Anopheles* y *Aedes*, al igual que las demás especies de mosquitos pasan por cuatro fases de mudas denominadas estadio, las formas que adquieren cada una de estas fases se llaman "instars" o estadios y son morfológicamente similares excepto por el incremento secuencial del tamaño.

El objeto de este ensayo es determinar la actividad contra larvas, es un método simple y rápido. El método a utilizar es una adaptación del usado por Agrochemical Division of CIBA-GEIGY A.G. y el laboratorio del Profesor Hostettmann en Suiza, para probar extractos crudos, fracciones y compuestos puros (16).

El método en tubo consiste en colocar los huevos de *A. aegypti* en un disco de papel filtro, para cada serie de prueba de una pequeña pieza de papel filtro que contiene los huevos es cortada e incubada por 24 horas con agua del grifo. Esta agua debe haber reposado 72 horas antes de eliminar el cloro.

Las larvas empiezan a ser visibles después de unas pocas horas y después de 24 horas (esta representa el II estadio) que es la forma como son utilizadas para las pruebas (16).

## 4. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país rico en flora, posee todas las condiciones necesarias que favorecen la diversidad y el desarrollo de plantas nativas, las cuales han sido utilizadas desde tiempos ancestrales para diferentes aplicaciones, siendo una de éstas la medicina tradicional, la cual ha sido transmitida de generación en generación en forma empírica.

Es necesario que el conocimiento popular de las plantas medicinales sea validado en forma científica y veraz, para que la población pueda utilizarlas; a manera de resolver problemas de salud de atención primaria. Además, de que representan una medida terapéutica de bajo costo y fácil acceso sin efectos adversos.

Las plantas medicinales, como todo el resto de la naturaleza en general, conforman los recursos naturales del país. Es por ello de vital importancia darles un aprovechamiento y sostenimiento adecuados, lo cual se puede lograr mediante el estudio científico de las diferentes especies.

El género *Piper* comprende un elevado número de especies, presenta una extensa aplicación etnobotánica en América Latina. Estudios previos han mostrado que dichas especies poseen una gran diversidad química. Los aceites esenciales presentan diferentes tipos de moléculas como sesquiterpenos, monoterpenos, arilpropanoides, motivo por el cual su estudio se convierte en una actividad promisoriosa y de interés.

Para esta investigación se seleccionaron tres especies de este género de uso común, que no cuentan con la validación científica de sus propiedades atribuidas, siendo objeto de la presente investigación: *P. jacquemontianum* (cordoncillo), *P. oradendron* (cordoncillo) y *P. umbellatum* (Santa María). Dicho estudio pretende proporcionar información científicamente comprobada sobre la utilización segura y eficaz de dichas especies.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

Contribuir al estudio fitoquímico y biológico, de las plantas medicinales de uso popular en Guatemala de tres especies del género *Piper*: *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*.

### 5.2. Específicos

- 5.2.1. Identificar especies aromáticas del género *Piper* útiles en medicina tradicional.
- 5.2.2. Evaluar la actividad biocida (antimicrobiana, larvicida y citotóxica) de los extractos metanólico y diclorometánico de las especies en estudio.
- 5.2.3. Evaluar la actividad biocida (antimicrobiana, larvicida y citotóxica) de los aceites esenciales de las especies en estudio.
- 5.2.4. Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los aceites esenciales y extracto metanólico de dichas especies.

## 6. HIPÓTESIS

Al menos una de las especies en estudio del género *Piper* posee actividad biocida y un patrón fitoquímico característico.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Universo

#### 7.1.1. Población

Tres especies del género *Piper*.

#### 7.1.2. Muestra

Extractos diclorometánicos, metanólicos y aceites esenciales de tres especies del género *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*.

### 7.2. Recursos

#### 7.2.1. Humanos

- Investigadora: Bachiller Ana Lucrecia Gómez López.
- Asesora: Licenciada Sully Cruz.
- Revisora: Licenciada Beatriz Medinilla.

#### 7.2.2. Institucionales

- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Departamento de Farmacología y Fisiología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Herbario USCG, Centro de Estudios Conservacionistas (CECON).
- Laboratorio de Productos Naturales, FARMAYA S.A.
- Departamento de Entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- Proyecto DIGI: “Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de ocho especies del género *Piper*”.

### 7.2.3. Organismos de experimentación, materiales y equipo

#### 7.2.3.1. Organismos de Experimentación

Larvas de de *A. aegypti* y *A. albimanus*

Nauplios de *A. salina*

*Aspergillus flavus*

CCQQ A75

*Bacillus subtilis*

ATCC 6051

*Candida albicans*

ATCC 10231

*Cryptococcus neoformans*

CCQQ C 13

*Mycobacterium smegmatis*

ATCC 607

*Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853

*Salmonella Typha*

ATCC 14028

*Staphylococcus aureus*

ATCC 25923

#### 7.2.3.2. Estándares

Específicos de cada metabolito.

#### 7.2.3.3. Materiales y equipos

Asa de nicromo

Asperjador

Autoclave

Balanza semianalítica y balanza analítica Denver Instrument

Bomba de vacío Brinkmann

Cajas de Petri descartables simples y cuadriplate

Cámara de Neubauer

Cámaras de revelado

Campana de extracción de gases

Campana de flujo laminar Labconco

Campanillas de Durham de 5 mm de diámetro

Cristalería y material de laboratorio en general

Cromatofolios de Silicagel 60F<sub>254</sub>

Desecadora

Destilador Neoclevenger

Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro

Estereoscopio

Estufa eléctrica

Fuente de luz artificial  
Hisopos estériles  
Incubadoras  
Lámpara de luz UV/VIS  
Liofilizador  
Mantas de calentamiento Electromante  
Microplacas  
Microscopio  
Papel filtro  
Papel parafilm  
Percolador de vidrio  
Pinzas de metal  
Pipetas automáticas Brand  
Pipetas serológicas de vidrio  
Puntas amarillas de 200  $\mu$ L y azules de 1,000  $\mu$ L (Tips)  
Refrigeradora  
Rotavapor  
Tamiz No.5  
Viales de 2 mL  
Vórtex

#### **7.2.3.4. Reactivos**

Agua destilada  
Disolventes: Diclorometano, Metanol y Etanol  
Reactivos para tamizaje fitoquímico  
Sal marina (biocristales de sal marina)

#### **7.2.3.5. Medios de cultivo**

Agar Mueller Hinton  
Caldo Trypticase Soya  
Agar Sabouraud

### **7.3. Procedimiento**

#### **7.3.1. Selección de las especies**

Mediante criterio etnobotánicos, agroecológicos (abundancia relativa de una especie determinada), fitoquímicos y farmacológicos. Se identificaron tres de las especies nativas del género *Piper* con una alta probabilidad de presentar actividad biológica significativa o un aceite esencial interesante.

#### **7.3.2. Revisión bibliográfica**

#### **7.3.3. Obtención y colecta del material vegetal**

La obtención y colecta del material vegetal se llevó a cabo en dos diferentes regiones del país, en Samayac, Suchitepéquez; Cerro San Gil, Izabal y la laguna de Lachuá, Cobán, Alta Verapaz.

El material fue identificado por Br. Luis Álvarez, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Se colectó una muestra representativa por población, de los cuales se llevó a cabo la extracción y pruebas de laboratorio (estudio fitoquímico y ensayos biológicos). Se dejaron muestras herborizadas e identificadas en el herbario USCG, con los números de registro de herbario 21299, 21304, 21300 y 21298 que corresponde a la especie: *P.umbellatum*, *P. jacquemontianum* (procedente de la Laguna Lachuá), *P. jacquemontianum* (procedente del Cerro San Gil) y *P. oradendron* respectivamente.

#### **7.3.4. Secado y Molienda de la planta**

Se secó el material colectado a la sombra. La molienda de la planta seca se realizó utilizando un tamiz No. 5 para disminuir el tamaño de partícula. Se pesaron las plantas molidas y rotular con nombre, fecha y región.

##### **7.3.4.1. Llenado del percolador**

- Se colocó en la punta del percolador un pedazo de algodón adecuado, de manera que sirva de filtro. Se Cortó un pedazo de papel filtro de forma circular y se colocó cubriendo el fondo del percolador.
- Se aseguró que estuviera cerrada la llave del percolador.
- Se agregó al material vegetal seco diclorometano para remojar, después se colocó en el percolador.
- Se agregó al material vegetal diclorometano hasta cubrirlo.

- Se rotuló el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, peso, disolvente utilizado, volumen y fecha. Se dejó reposar por 24 horas para que reaccionara.
- Se abrió la llave del percolador y se dejó gotear hasta que saliera todo el disolvente.
- Se agregó el disolvente recuperado a la materia en extracción en el percolador, se realizó esta operación dos veces antes de comenzar a concentrar en rotavapor.
- Se pasó el disolvente recogido al balón del rotavapor para concentrar.
- Después se dejó secar la planta en el percolador, para después agregar el otro disolvente metanol y se volvió a repetir igual como se hizo con el disolvente diclorometano.

#### **7.3.4.2. Concentración en rotavapor**

- Se encendió el baño de María y se llevó a la temperatura a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Se engrasó todas las bocas esmeriladas y se armó el rotavapor según el instructivo específico.
- Se colocó la muestra (solución obtenida del percolador) en un balón de evaporación con rotación constante.
- Se conectó la bomba de vacío entre 30 y 300 mbar que facilitó la evaporación. Se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a consistencia semisólida.
- Se vertió el extracto concentrado en una caja de petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.
- Se colocó en una desecadora durante 7-15 días.
- Cuando el extracto tuvo una consistencia sólida, se pasó a viales debidamente tarados y rotulados.
- Se calculó el rendimiento del extracto y se guardó en viales herméticos a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **7.3.5. Estudio del rendimiento y caracterización de aceites esenciales**

Para la determinación del porcentaje de rendimiento de aceites esenciales de las tres especies aromáticas del género *Piper*, se realizó la extracción mediante

hidrodestilación, utilizando un equipo Neoclevenger de acuerdo a la Real Farmacopea española (34).

### **7.3.5.1. Extracción de Aceite esencial por Hidrodestilación (11, 34)**

#### **7.3.5.1.1. Preparación de la muestra**

- Se molió 100 g de materia seca vegetal y pesó 50 g de material molido.
- Que fueron transferidos a un balón de destilación de 1,000 mL.
- Se agregó aproximadamente de 400-500 mL de agua destilada hasta cubrir los 50 g del material.

#### **7.3.5.1.2. Uso del equipo**

- Se instaló el destilador de aceites esenciales, se conectó el balón de destilación con el recipiente colector.
- Se conectó la bomba que circula la solución de enfriamiento por el refrigerante.
- Se llenó con agua el tubo N hasta el nivel B del tubo graduado.
- Se agregó 2 mL de un disolvente orgánico (pentano) en el tubo K utilizando una pipeta Pasteur y colocó el tapón al tubo hasta que empiece a destilar el aceite.
- Se destiló a temperatura constante durante 2-3 horas o según lo especifique la literatura para cada especie, se mantuvo un flujo de destilación de 2-3 mL por minuto.
- Se determinó el tiempo de destilación a partir que empieza a obtenerse el aceite.
- Se midió la capa superior de aceite esencial recogido en el recipiente graduado.
- Se esperó 10 minutos después de determinar el calentamiento antes de coleccionar el aceite.
- Se abrió la llave, dejar caerle agua y descartarla. Se recibió la parte orgánica en un balón de 125 mL y se agregó al tubo K aproximadamente 1 mL del disolvente orgánico utilizado anteriormente, para lavar y arrastrar todo el aceite recuperado.
- Se eliminó el disolvente orgánico por rotaevaporación.
- Se pesó el aceite obtenido, se virtió en vial color ámbar y se almacenó a 4°C.
- Se determinó el porcentaje de rendimiento a partir del peso del aceite entre el peso de la materia vegetal por cien.

- Se lavó el destilador con suficiente metanol y agua destilada para dejarlo completamente limpio y evitar cualquier contaminación cruzada en la siguiente corrida.

### **7.3.6. Actividad antimicrobiana *in vitro* (17, 30, 33, 34)**

#### **7.3.6.1. Preparación del Agar**

- Se preparó los tubos con 9.0 mL Mueller Hinton.
- Se esterilizaron, dejando enfriar a 50 °C para luego agregar 1 mL de la solución del extracto disuelto, el cual debe tener una concentración de 10 mg /mL. La concentración final que se obtuvo es de 1 mg / mL.
- Se agitó y vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar e incubar a 36 °C por 24 horas, para comprobar esterilidad. Se guardó en refrigeración hasta el momento de su uso.

#### **7.3.6.2. Preparación del inóculo**

- Se purificó el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Mueller Hinton inclinado, se incubó a 36 °C por 24 horas.
- Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa Soya, incubar a 36 °C por 48 horas.
- Se diluyó 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua destilada estéril (dilución 1: 100). Se utilizó *M. smegmatis* y *C. neoformans* sin dilución.
- Se sembró los microorganismos en cajas de Petri según la planta a utilizar.

#### **7.3.6.3. Demostración de la actividad antibacteriana**

- Se inoculó en las cajas con Agar una asada de cada uno de los microorganismos (ver inciso 6.2.2.) siguiendo el patrón de la plantilla. Se hizo cuatro repeticiones por microorganismo. Se dejó reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36 °C por 24 horas.
- Se utilizó como control negativo 9 mL de Agar Mueller Hinton mezclado con 1 mL de etanol al 50 %.

#### **7.3.6.4. Interpretación de resultados**

- Si hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad negativa.
- Si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad positiva.

- Presencia de microorganismos fuera de la inoculación = contaminación.

#### **7.3.6.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM):**

- Solución del extracto: el extracto se disolvió en etanol al 50% (concentración de 10 mg/mL).
- Se preparó cajas cuadruplica con las siguientes diluciones del extracto:
  - 3.6 mL de Agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg / mL.
  - 3.8 mL de Agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg / mL.
  - 3.9 mL de Agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg / mL.
  - Un cuadrante con 4.0 mL de Agar como control negativo.
- Se inoculó tres estrías en cada uno de los cuadrantes e incubar a 36 °C por 24 horas. Se realizó la lectura para interpretar según el procedimiento descrito en el inciso 6.3.7.4.

#### **7.3.7. Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad citotóxica contra *Artemia salina* (17, 25, 27)**

##### **7.3.7.1. Preparación del agua de mar**

- Se disolvió 35 g de sal de mar en un litro de agua destilada.
- Se marcó en el vaso de precipitar el volumen de agua.
- Se hirvió por 30 minutos y se completó el volumen que se evaporó según la marca.
- Se filtró y refrigeró hasta el momento de su uso, es estable por un mes a temperatura de 6-8 °C.

##### **7.3.7.2. Cultivo de *A. salina***

- Se colocó en un vaso de precipitar de 200 mL del agua de mar y se aireó 30 ó 60 minutos
- Se colocó el agua en la pecera y se agregó 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).
- Se incubó por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).

### 7.3.7.3. Determinación de la citotoxicidad

- Se pesó 0.004 g del extracto metanólico de las tres especies en estudio y se disolvió con 2 mL de agua de mar. Se agregó por triplicado en una microplaca: 100  $\mu$ L del extracto disuelto + 100  $\mu$ L de agua de mar con 10-15 nauplios
- Control negativo: 100  $\mu$ L de agua de mar + 100  $\mu$ L de agua de mar con 10-15 nauplios.
- Se incubó a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
- Se contó en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Se agregó metanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

### 7.3.7.4. Interpretación

7.3.7.4.1. Se calculó el porcentaje 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, multiplicarlos por 100.

7.3.7.4.2. Si el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50 por ciento, repetir la prueba utilizando de 1.0, 0.5 y 0.25 mg / mL. Obtener los valores de X e Y en cada dosis y determinar el valor de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) con el programa de computadora Finney (DOS).

7.3.8.4.3. Si el porcentaje es menor al 50 por ciento la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL.

### 7.3.8. Tamizaje de la actividad larvicida (17, 36, 37, 38)

#### 7.3.8.1. Cultivo de larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*

- Se colocó en un vaso de precipitar 200 mL del agua potable y se dejó reposar por 48 horas.
- Se agregó 40 mg de huevecillos de *A. aegypti*.
- Se incubó por 24 horas a temperatura ambiente.

### **7.3.8.2. Determinación de la toxicidad (17,36, 37, 38)**

- Se pesó 1 mg del extracto a ensayar y se disolvió con 1 mL de agua potable reposada. En la microplaca se agregó por triplicado: 100  $\mu$ L del extracto disuelto + 100  $\mu$ L de agua potable reposada con 10-15 larvas.
- Control negativo: 100  $\mu$ L de agua potable reposada con 10-15 larvas.
- Se incubó a temperatura ambiente (25-28 °C) en un lugar oscuro durante 24 horas.
- Se contó en el estereoscopio el número de larvas muertas para determinar la CL100 (concentración letal al 100 %).

### **7.3.8.3. Interpretación (17, 36, 37, 38)**

La prueba de tamizaje es positiva si todas las larvas están muertas. Si el porcentaje de larvas muertas es del 100 por ciento calcular la CL<sub>100</sub>, para ello repetir la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg / mL.

### **7.3.9. Tamizaje Fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro (35, 36, 38,39)**

Se realizó por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y ensayos macro y semimicro.

En la CCF fueron analizadas con las fases móviles adecuadas y caracterizadas por medio de valores R<sub>f</sub> y coloraciones obtenidas luego de asperjar con reveladores específicos, mientras que los ensayos macro y semimicro se utilizaron para la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de la muestra por medio de la formación de precipitados y complejos coloreados.

### **7.3.10. Investigación de alcaloides**

#### **7.3.10.1. Ensayos macro y semimicro**

Se pesaron 1 g de material vegetal. Se le agregó 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego añadir 25 mL de metanol al 60°C. Se filtro con papel Whatman No. 1 y acidifico el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante se dividió en cuatro tubos y se evaluó de la siguiente manera:

- Tubo 1: Se agregó 5 gotas del reactivo de Mayer's.
- Tubo 2: Se agregó 5 gotas del reactivo de Dragendorff.
- Tubo 3: Se agregó 5 gotas del reactivo de Wagner.

- Tubo 4: Testigo.

Se usó como estándar soluciones al 1 por ciento de atropina y papaverina. Se observó durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

#### **7.3.10.2. Cromatografía en capa fina**

Se pesó 1 g de material vegetal seco y molido, se agregó 1 mL de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v) y se extrajo con 5 mL de metanol. Se colocó en baño María a 60°C durante 5 minutos. Se filtró y concentró. Luego se aplicó en una placa de sílica gel 60F<sub>254</sub>, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10 µL).

- Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1).
- Detección: Reactivo de Dragendorff.
- Identificación: Zonas de color naranja (visible).

### **7.3.11. Investigación de flavonoides y antocianinas**

#### **7.3.11.1. Ensayos macro y semimicro**

Se extrajo 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol o metanol al 80 por ciento, se filtro y concentró. Se enfrió a temperatura ambiente y se trituró el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción fue incolora. Se disolvió el residuo en 30 mL de metanol al 80 por ciento, se filtro y dividió en 5 tubos:

- Tubo 1: Se agregó 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Tubo 2: Se agregó 3-5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).
- Tubo 3: Se agregó 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño María por 5 minutos (Pruebas para leucoantocianinas).
- Tubo 4: Se agregó magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.
- Tubo 5: Testigo.

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

### 7.3.11.2. Cromatografía en capa fina

Se extrajo 1 g de material vegetal seco y pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño María a 60 °C. Se filtro la solución y se aplico en una placa de sílica gel 60F<sub>254</sub>. Como estándar se empleo solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µL).

- Fase móvil: Acetato de etilo – ácido fórmico – ácido acético glacial – agua (100:11:11:27), n-butanol - ácido acético – agua (40:10:50).
- Detección: Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG).
  - Solución 1: Solución metanólica al 1 por ciento de difenilborilxetilamina (NP).
  - Solución 2: Solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).
- Identificación: Fluorescencia intensa en UV a 365 nm.

### 7.3.12. Investigación de antraquinonas

#### 7.3.12.1. Prueba de Börntrager

Se extrajo 3g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80 por ciento, se filtro y concentro en baño María (60°C). Se disolvió el residuo con 30 mL de agua destilada y se filtró. Se extrajo con 10 mL de benceno. A la fase bencénica se añadió 5 mL de solución de test de amonio y se agito. Se observo cambios de color en la fase alcalino (color rojo, rosado: positivo).

#### 7.3.12.2. Prueba de Börntrager modificado

Se calentó 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 por ciento y se calentó 10 minutos en baño María a 60°C. Se añadió 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Se extrajo con 10 mL de benceno. A la capa bencénica se le adicionó 5 mL de solución de prueba de amonio y agitó. Se observo cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

#### 7.3.12.3. Cromatografía en capa fina

Se extrajo 0.5 g de material vegeta seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño María a 60°C durante 5 minutos. Se filtró y aplicó 10 microlitros en la cromatoplaqa de sílica gel 60 F<sub>254</sub>.

- Estándar: solución al 0.1 por ciento en metanol de Antraquinonas (10 microlitros).
- Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).

- Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 ó 10 por ciento.
- Identificación:
  - Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV a 365 nm.
  - Antronas y antralonas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV a 365 nm.

### **7.3.13. Investigación de cumarinas**

#### **7.3.13.1. Ensayos macro y semimicro**

Se midió 5 mL de extracto vegetal metanólico. Se agregó 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar se aplicó 2 manchas en papel filtro. A una mancha se agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5 N. Se observó bajo luz UV a 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

#### **7.3.13.2. Cromatografía en capa fina**

A 1 g de material vegetal se le adicionó 10 mL de metanol y se calentó 30 minutos en baño María. Se filtró y evaporó hasta 1 mL. Se aplicó 20 µL en una cromatoplaqueta de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Se utilizó como estándar canela en metanol al 1 por ciento.

- Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).
- Detección: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 ó 10 por ciento.
- Identificación: Fluorescencia azul o verde a 365 nm UV.

### **7.3.14. Investigación de saponinas**

#### **7.3.14.1. Prueba de espuma**

- Tubo 1: 100 mg de material vegetal pulverizado y seco.
- Tubo 2: 2 mL de control de saponinas (0.5%).
- Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo se le adicionó 10 mL de agua destilada. Se calentó en baño María a 60°C durante 30 minutos. Se dejó enfriar, se taparon los tubos, se agitaron vigorosamente 35 segundos. Se dejó reposar los tubos durante 30 minutos. Se observó la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm. persistente en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas

### 7.3.14.2. Cromatografía en capa fina

2 g de material vegetal seco, se extrajo con 10 mL de etanol al 70 por ciento con reflujo por 10 minutos. Se evaporó a 5 mL y proceder a aplicar 25-40 microlitros en una cromatoplaque de sílica gel 60 F<sub>254</sub>.

- Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 microlitros).
- Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol- ácido acético-agua (50:10:40).
- Detección: reactivo de sangre. Zonas hemolíticas en fondo rojo.
- (Reactivo de Liebermann-Burchard: UV 365 nm o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides).
- Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas.
- Vainillina – ácido sulfúrico y anisaldehído – ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas.

### 7.3.15. Investigación de principios amargos

#### 7.3.15.1. Cromatografía en capa fina

Se calentó 1 g de material vegetal con 10 mL de metanol en baño María a 60 °C por 10 minutos. Se dejó evaporar y se filtró a 2 mL. Se aplicó en la cromatoplaque.

- Estándar: artemisina al 1 por ciento en metanol (20 µL).
- Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo- metanol (95:5).
- Detección: vainillina – ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafés-rojas, azules-verdes (visible).
- Reactivo de Liebermann-Buchard: UV 365 nm: gris, café; VIS: café oscuro, gris.

### 7.3.16. Investigación de taninos

#### 7.3.16.1. Ensayos macro y semimicro

Se extrajo 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 por ciento, se filtró y se dejó evaporar a sequedad. Se añadió 25 mL de agua caliente al residuo y se agitó con varilla y dejó enfriar. Se agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y se filtró. Se adicionó 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: testigo.
- Tubo 2: Se agregó 4 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v). Se observó la formación de precipitado o flocos evidentes.
- Tubo 3: Se agregó 4 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10 por ciento). Se observó la formación de precipitado o flocos evidentes.
- Tubo 4: Se agregó 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v). observar coloración negro-azulado tipo pirogalol, coloración grisácea-negro tipo catecol.

### 7.3.17. Investigación de aceites volátiles

#### 7.3.17.1. Cromatografía en capa fina

- Método A: Se extrajo 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano se agito por 15 minutos. Se filtró y dejó evaporar en baño María (60°C) a sequedad.
- Se disolvió en 1 mL de tolueno y se aplico 45 microlitros en cromatoplaça de sílica gel 60 F254.
- Método B: Se pesó 50 g de material vegetal y se destiló con arrastre de vapor por 1 hora. Se recolectó el aceite esencial en xileno. Se disolvió la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 y se aplicó 5 microlitros (1:10) en cromatoplaça de sílica gel 60 F254.
- Estándar: solución de tolueno 1:30 de metanol, timol, anisaldehído, acetol, 1,8-cineol (3 microlitros).
- Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).
- Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina – ácido sulfúrico.
- Identificación: Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

### 7.4. Diseño de investigación

Se realizó un estudio en el cual se determinó la actividad biocida (antimicrobiana, larvicida y citotóxica) del extracto diclorometano y metanol de las hojas de *P. jacquemontianum*, *P. oradedron* y *P. umbellatum*.

#### **7.4.1 Actividad antimicrobiana (17, 30, 33, 34)**

Utilizando un método de difusión en agar se realizó la actividad bactericida y antifúngica para la evaluación de los resultados con criterio de positividad visual (si presentó crecimiento homogéneo hay actividad negativa, ausencia de crecimiento hay actividad positiva). Se realizó este estudio totalmente al azar con cuatro replicas, se tomaron como tratamientos los extractos de las plantas y posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM).

El orden de las estrías fue al azar, para los organismos seleccionados *A. flavus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *S. aureus*. El análisis de resultados se realizó por medio de la prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia  $\alpha = 0.10$ , para concluir que el extracto tiene efecto debe haber inhibición en las 4 réplicas.

#### **7.4.2. Actividad larvicida (17, 36, 37, 38)**

Se realizó un ensayo en la microplaca agregando por triplicado: 100  $\mu$ L del extracto disuelto de diclorometano y metanol a una concentración de 1 mg/mL de larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*, determinándose el número de larvas muertas (sobre un número inicial conocido).

El análisis se realizó determinando la  $CL_{100}$  (concentración letal al 100 %), por medio de regresión no paramétrica, utilizando transformación probítica de los resultados con el programa Finney. La prueba de tamizaje se tomó como positiva si todas las larvas estaban muertas.

#### **7.4.3. Actividad citotóxica (17, 25, 27)**

Se realizó un ensayo contra *A. salina*. Agregando por triplicado en una microplaca: 100  $\mu$ L del extracto disuelto de diclorometano y metanol a una concentración de 1 mg/mL, determinándose el número de nauplios muertos (sobre un número inicial conocido). Si el porcentaje es menor al 50 por ciento la citotoxicidad es mayor de 1 mg / mL.

#### **7.4.4. Cromatografía (35, 36, 38,39)**

La determinación de alcaloides, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos, taninos y aceites volátiles se realiza por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y ensayos macro y semimicro. En la CCF son caracterizadas por medio de valores  $R_f$  y coloraciones obtenidas, y los ensayos

macro y semimicro la caracterización de los metabolitos secundarios presentes por medio de la formación de precipitados y complejos coloreados. La presentación de resultados se realiza mediante estadística descriptiva.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. De campo

Durante el período comprendido entre febrero y agosto de 2006 se realizaron las colectas del material vegetal y la identificación botánica de las especies, se visitaron tres regiones para el muestreo las cuales se detallan a continuación:

- 1 Ecoparcela “El Cacaotal” en Samayac, Suchitepéquez
- 2 Parque Ecológico Laguna Lachuá en Cobán, Alta Verapaz
- 3 Parque Ecológico Cerro San Gil en Livingston, Izabal

**Cuadro 1. Especies Identificadas**

<b>Especie</b>	<b>procedencia</b>	<b>No. de herbario</b>
<i>P. umbellatum</i>	Suchitepéquez	21299
<i>P. oradendron</i>	Suchitepéquez	21298
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	Laguna Lachuá	21304
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	Cerro San Gil	21300

### 8.2 Porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial

En el cuadro 2 se muestran los aceites esenciales obtenidos y el rendimiento de las especies evaluadas

**Cuadro 2. Rendimiento de aceite esencial**

<b>Especies (hojas)</b>	<b>Rendimiento de Aceite esencial</b>	
	(g)	(%)
<i>P. umbellatum</i>	0.1396	0.3259
<i>P. oradendrum</i>	0.2314	0.5902
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	0.4053	0.7795
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	0.9494	2.240

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Como puede observarse, *P. jacquemontianum* (procedente de Cerro San Gil) presentó mayor rendimiento de aceite y el de menor rendimiento fue *P. umbellatum*.

### 8.3 Porcentaje de Rendimiento de los Extractos

En el cuadro 3 se observan los extractos diclorometánicos y metanólicos de las especies en estudio, donde el extracto metanólico que presentó mayor rendimiento fue *P. jacquemontianum* (cerro San Gil).

**Cuadro 3. Porcentajes de rendimiento de extracto metanólico y diclorometánico y porcentaje de humedad de las tres especies de *Piper***

Especies (hojas)	Rendimiento de extracto diclorometánico		Rendimiento de extracto metanólico		Humedad (%)
	(g)	(%)	(g)	(%)	
<i>P. umbellatum</i>	14.22	7.90	16.53	9.18	11.02
<i>P. oradendrum</i>	8.90	4.94	10.84	6.02	10.30
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	9.85	5.47	12.48	6.93	9.85
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	9.76	8.13	13.22	11.01	Nd

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil. Nd: No determinada

### 8.4. Evaluación de la actividad biológica

Se realizó el tamizaje antibacteriano de las tres especies contra bacterias gram positivo (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), bacterias gram negativo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*) y Micobacterias (*Mycobacterium smegmatis*). Los extractos de *P. umbellatum* (diclorometánico), *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metanólico) inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*. Todas las especies no tienen actividad antimicrobiana contra las bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* (cuadro 4).

**Cuadro 4. Actividad antimicrobiana de las tres especies de *Piper***

Especies	Extracto	A	B	C	D	E	F
<i>P. umbellatum</i>	Metanol	-	-	-	-	-	-
<i>P. umbellatum</i>	Diclorometano	+*	+*	-	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	Metanol	-	-	-	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	Diclorometano	-	-	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	Metanol	+*	+*	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	Diclorometano	+*	+*	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	Metanol	-	-	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	Diclorometano	+*	+*	-	-	-	-

A. *B. subtilis*, B. *M. smegmatis*, C. *E. coli*, D. *S. aureus*, E. *P. aeruginosa*, F. *S. typhi*.

\* Significancia estadística (P < 0.10).

(1) Procedencia Laguna Lachuá.

(2) Procedencia Cerro San Gil

(+) Actividad antimicrobiana positiva.

(-) Ausencia de actividad antimicrobiana.

Se realizó el tamizaje de las especies en estudio, contra bacterias y levaduras los cuales presentaron actividad el extracto diclorometánico y metanólico de *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil contra *B. subtilis*, *M. smegmatis* y *C. neoformans*.

#### 8.4.1 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CIM):

Se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especies que presentaron actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados, los extractos diclorometánico de *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil, presentaron un CIM de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis* (cuadro 5).

**Cuadro 5. Concentración mínima Inhibitoria**

Especies	Extracto	Bacterias	Diluciones (mg/mL)		
			1.0	0.5	0.25
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	Diclorometano	<i>B. subtilis</i>	-	-	+
		<i>M. smegmatis</i>	-	-	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	Metanol	<i>B. subtilis</i>	+	+	+
		<i>M. smegmatis</i>	+	+	+

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.  
(+) Presentó crecimiento. (-) Inhibición del crecimiento.

#### 8.4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Se realizó la determinación de la actividad en aceites esenciales utilizando el método de difusión en disco.

Únicamente se utilizó el aceite de *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil; debido a que el aceite obtenido de la materia vegetal procedente de Laguna Lachuá se utilizó en las pruebas de caracterización fitoquímica y algunas otras pruebas biológicas. El porcentaje de rendimiento de aceite esencial obtenido de la materia vegetal de Laguna Lachuá fue bajo.

Se evaluó la actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivo (*S. aureus*, *B. subtilis*) gram negativo (*S. typhi*, *P. aeruginosa* y *E. coli*), levaduras (*C. neoformans* y *C. albicans*) y micobacterias (*M. smegmatis*) encontrándose únicamente actividad en la fase de tamizaje del aceite *P. jacquemontianum* y *P. umbellatum* contra *E. coli*.

*P. jacquemontianum* (2), presentó actividad significativa ( $P < 0.10$ ) contra *E. coli* al evidenciarse un halo de inhibición de 23 mm para el aceite de y 25 mm para el aceite *P. umbellatum*, lo anterior indica que dichos aceites presenta actividad antimicrobiana para bacterias gram negativa (*E. coli*), el resto de los aceites fueron negativos para las bacterias ensayadas, como se detalla en el cuadro 6.

**Cuadro 6. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales**

Especies	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>P. oradendron</i>	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	6	6	6	6	6	6	6	23
<i>P. umbellatum</i>	6	6	6	6	6	6	6	25

(2) Procedencia Cerro San Gil

A. *Staphylococcus aureus*,

B. *Salmonella typhi*,

C. *Mycobacterium smegmatis*,

D. *Bacillus subtilis*,

E. *Pseudomonas aeruginosa*

F. *Candida albicans*,

G. *Cryptococcus neoformans*,

H. *Escherichia coli*

Halo de inhibición en mm.

Interpretación: < 6 mm es negativo, 6-9 mm es intermedio y > 9 mm es positivo.

### 8.5. Resultados de la Actividad Citotóxica contra *A. salina* en los Extractos

En la fase de tamizaje se evaluaron los extractos (metanólicos y diclorometánicos) y ninguno de los seis de los extractos evaluados se observó muerte total de los nauplios de *A. salina*, por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL como se observa en el cuadro 7.

**Cuadro 7. Actividad citotóxica contra *A. salina* en Extractos**

Especie	Actividad	Concentración
<i>P. oradendron</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. oradendron</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. umbellatum</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. umbellatum</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (Metanol) (1)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (Diclorometano) (1)	(-)	> 1 mg/mL

(1) Procedencia Laguna Lachuá.

### 8.6. Resultados de la Actividad Citotóxica contra *A. salina* en los Aceites Esenciales

Se determinó la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*, donde no se presentó toxicidad alguna para los aceites ensayados, por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL (cuadro 8).

**Cuadro 8. Actividad citotóxica contra *A. salina* en los Aceites esenciales de las especies evaluadas**

Especie	Actividad	Concentración
<i>P. oradendron</i>	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. umbellatum</i>	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	Nd	Nd
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	(-)	> 1 mg/mL

(1) Procedencia Laguna Lachuá.

(2) Procedencia Cerro San Gil

Nd. No determinada, por falta de material.

### 8.7. Resultados de la Actividad Insecticida contra larvas de *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti*:

Se evaluó la actividad insecticida contra larvas de *A. albimanus* y *A. aegypti* en sus cuatro estadios de los extractos metanólicos. Ningún extracto presentó actividad larvicida significativa ( $P > 0.10$ ), por lo que se determinó que la concentración es mayor a 1 mg/mL.

**Cuadro 9. Actividad insecticida contra *A. albimanus* y *A. albimanus***

Especie	1er. Estadio	2do. Estadio	3er. Estadio	4to. Estadio
<i>P. umbellatum</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. oradendron</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (hoja) (2)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (hoja) (1)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

### 8.8. Tamizaje fitoquímico: Se realizaron las pruebas macro y semimicro y cromatografía en capa fina (CCF) para determinar los metabolitos presentes en las especies en los extractos metanólicos.

Las pruebas cualitativas (precipitación, turbidez, coloración, test de espuma, etc.), evidenciaron la presencia de los metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides y antocianinas, cumarinas, saponinas, antraquinonas, principios amargos, taninos), por lo que se realizó la CCF; en los cuadros 10 al 21 se exponen los metabolitos encontrados, así como las fases móviles y métodos de detección empleados.

### Cuadro 10. Pruebas preliminares para alcaloides

Solamente la especie *P. oradendron* no mostró alcaloides, cuando se hizo la prueba con el reactivo de Mayer's, con los otros dos reactivos (Dragendorff y Wagner) dio positivo, y las demás especies en estudio dieron positivo para el ensayo de alcaloides, lo cual se confirmó con la cromatografía en capa fina.

Especie	Reactivo de Mayer's (color blanco a crema)	Reactivo de Dragendorff (color rojo a naranja)	Reactivo de Wagner (color marrón)
<i>P. umbellatum</i>	+	+	+
<i>P. oradendron</i>	-	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	+	+
Estándar de papaverina	+	+	+
Estándar de atropina	+	+	+

(1) Procedencia Laguna Lachuá (2) Procedencia Cerro San Gil.

### Cuadro 11. Investigación de alcaloides mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se muestra el número de bandas y Rf presentes utilizando la fase móvil descrita en la literatura para cada metabolito. Se observa que *P. oradendron* tiene un Rf igual al estándar brucina. *P. oradendron* y *P. jacquemontianum* (procedente de Laguna Lachuá) tiene un Rf cercano a el estándar de reserpina

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	2	0.36, 0.54
<i>P. oradendron</i>	+	4	0.23, 0.43, 0.78, 0.94
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	2	0.34, 0.94
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	4	0.34, 0.43, 0.60.94
Estándar brucina	+	1	0.23
Estándar papaverina	+	1	0.48
Estándar atropina	+	2	0.24, 0.47
Estándar reserpina	+	1	0.46

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (35:10:5).

Detección: Reactivo de Dragendorff.

### Cuadro 12. Pruebas preliminares para flavonoides y antocianinas

En la prueba con cloruro férrico al 10%, solamente la *P. umbellatum* no presentó cambio de color, ni formación de precipitado. Mientras, la *P. jacquemontianum* (procedente del Cerro San Gil), tampoco presentó ningún cambio en la prueba con ácido sulfúrico concentrado. Los especímenes estudiados reaccionaron, con los otros reactivos ya que se observaron los cambios de color característicos para estos metabolitos; indicando la posible presencia de flavonoides y antocianinas lo cual se confirmó con la cromatografía en capa fina.

Especie	Ácido sulfúrico concentrado	Cloruro férrico al 10%	Ácido clorhídrico concentrado	Magnesio metálico y HCl	Álcali KOH
<i>P. umbellatum</i>	+	-	+	+	+
<i>P. oradendron</i>	++	+	+	+	-
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	-	++	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	++	+	+	+

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

### Cuadro 13. Investigación de flavonoides y antocianinas Cromatografía en Capa Fina (CCF)

En el análisis por CCF se demostró la posible presencia de flavonoides y antocianinas ya que se observó la fluorescencia característica a dichos metabolitos, en todas las especies, encontrándose hasta 7 bandas en el extracto *P. jacquemontianum* (procedente del Cerro San Gil).

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	7	0.22,0.27, 0.36, 0.42, 0.61, 0.72,0.88
<i>P. oradendron</i>	+	5	0.23,0.34, 0.42, 0.64, 0.74
<i>P. umbellatum</i>	+	4	0.31, 0.44,0.60, 0.14
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	5	0.26, 0.35, 0.46, 0.72, 0.88
Estándar quercetina	+	1	0.97
Estándar hiperósido	+	1	0.73
Estándar rutina	+	1	0.39
Estándar ácido clorogénico	+	2	0.49, 0.79

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético glacial-agua (33.33:3.6:3.6:9).

Detección: Reactivo de Productos Naturales.

#### Cuadro 14. Prueba preliminar para Cumarinas

En el tamizaje fitoquímico todas las muestras mostraron cumarinas, ya que al agregar el hidróxido de potasio 0.5 N y bajo la luz UV de 365 nm, se observó fluorescencia verde: positivo, posiblemente presencia de cumarinas la cual se confirmó con la cromatografía en capa fina.

Especie	Fluorescencia	Color
<i>P. umbellatum</i>	+	Verde
<i>P. oradendron</i>	+	Verde
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	Verde
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	Verde
Estándar cumarina	+	Verde
Estándar p-cumárico	+	Verde
Estándar umbeliferona	+	Verde

(1) Procedencia Laguna Lachuá.

(2) Procedencia Cerro San Gil.

#### Cuadro 15. Investigación de cumarinas Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Al ser agregado el reactivo revelador, se demuestra la presencia del grupo funcional de las cumarinas, el cual reacciona con éste formando el complejo coloreado que permite establecer su presencia.

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	2	0.23, 0.60
<i>P. oradendron</i>	+	2	0.48, 0.60
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	4	0.09, 0.37, 0.60, 0.72
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	3	0.09, 0.36, 0.59
Estandar cumarina	+	1	0.10
Estandar umbeliferona	+	1	0.15

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (46.5:3.5).

Detección: Hidróxido de potasio 10%

### Cuadro 16. Prueba preliminar para antraquinonas

En el tamizaje fitoquímico solamente la especie *P. jacquemontianum* del cerro San Gil y de Laguna Lachuá mostraron la posible presencia de antraquinonas debido a que se observó la coloración rojo-rosado en la fase alcalina, lo cual se confirmó con la cromatografía en capa fina.

Especie	Reactivo de Bonträger
<i>P. umbellatum</i>	-
<i>P. oradendron</i>	-
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+

(1) Procedencia Laguna Lachuá.

(2) Procedencia Cerro San Gil.

### Cuadro 17. Investigación de antraquinonas Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Como se puede observar en el cuadro todas las especies mostraron la posible presencia de antraquinonas. En las muestras de la especie *P. oradendron*, *P. jacquemontianum* de las dos procedencias, se observó una banda (Rf 0.81) que coincide con el estándar, extracto de Sen (Rf 0.81).

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	3	0.26, 0.34, 0.87
<i>P. oradendron</i>	+	4	0.28, 0.36, 0.81, 0.85
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	2	0.58, 0.81
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	1	0.81
Extracto de Sen	+	6	0.096, 0.19, 0.42, 0.70, 0.75, 0.81

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: acetato de etilo, metanol, agua (50:8.5:6.5).

Detección: Hidróxido de potasio al 10%.

### Cuadro 18. Prueba preliminar e Investigación de saponinas en Cromatografía en Capa Fina

En la prueba de espuma ninguna de las especies presentó saponinas, ya que la capa de espuma no fue mayor de 3 cm. Sin embargo, en la CCF se estableció la presencia de estos metabolitos, ya que las especies en estudio presentaron hasta cuatro bandas, de color característico (azules, violetas-amarillentas) al utilizar el revelador.

Especie	Prueba de espuma	No. de bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	-	3	0.12, 0.19, 0.34
<i>P. oradendron</i>	-	4	0.23, 0.3, 0.35, 0.80
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	-	4	0.12, 0.25, 0.32, 0.70
<i>P. jacquemontianum</i> (1).	-	4	0.13, 0.23, 0.34, 0.70
Estándar de saponinas	+	1	0.86
Estándar de Colesterol		1	0.96

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: Cloroformo, metanol (95:5).

Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico.

### Cuadro 19. Investigación de Principios amargos cromatografía en Capa Fina (CCF)

El tamizaje fitoquímico permite sospechar la presencia de principios amargos, observando hasta 5 bandas en CCF, de color característico (rojas-violetas, cafés-rojas, azules-verdes). La especie *P. umbellatum* tiene una banda con un Rf (0.26) similar al Rf de una banda del estándar (0.28).

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	5	0.12, 0.26, 0.41, 0.51, 0.66
<i>P. oradendron</i>	+	2	0.12, 0.43
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	2	0.75, 0.90
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	1	0.79
Estándar <i>Neurolaena lobata</i>	+	1	0.28, 0.95

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: Acetato de etilo, metanol, agua (77:15:8).

Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico.

### Cuadro 20. Investigación de Taninos

Como se puede observar en el siguiente cuadro solamente la *P. jacquemontianum* procedente de la Laguna Lachuá, dio positivo ya que se observó presencia de precipitado con el reactivo gelatina al 1% y el reactivo gelatina-sal; con el cloruro férrico, se observó cambio de coloración indicando posiblemente la presencia de taninos. Mientras que las demás especies no mostraron presencia de taninos en las pruebas realizadas.

Especie	Gelatina al 1%	Gelatina-NaCl	Cloruro férrico
<i>P. umbellatum</i>	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	+	+ (grisáceo negro)

(1) Procedencia Laguna Lachuá.

(2) Procedencia Cerro San Gil.

### Cuadro No. 21. Investigación de aceites volátiles cromatografía de Capa Fina (CCF)

Se puede observar que las especies en estudio presentaron hasta 4 bandas, lo que permite comprobar la presencia de aceites esenciales. La *P. jacquemontianum* de las dos procedencias en estudio, mostró una banda (Rf 0.26) de similares características con el estándar de terpineol (Rf 0.27).

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	2	0.41, 0.56
<i>P. oradendron</i>	+	2	0.33, 0.55
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	4	0.26, 0.35, 0.42, 0.56
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	4	0.26, 0.38, 0.55, 0.69
Estándar carvacrol	+	1	0.51
Estándar fenchona	+	1	0.32
Estándar isopulegol	+	1	0.36
Estándar linalool	+	1	0.38
Estándar terpineol	+	1	0.27
Mezcla de aceites	+	3	0.25, 0.33, 0.51

(1) Procedencia Laguna Lachuá. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (46.5:3.5).

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se identificaron tres especies de *Piper*, durante el período comprendido entre febrero y agosto de 2006 se realizaron las colectas del material vegetal y la identificación botánica de las especies (Herbario USCG), se visitaron tres regiones para el muestreo: Ecoparcela "El Cacaotal" en Samayac, Suchitepéquez, Parque Ecológico Laguna Lachuá en Cobán, Alta Verapaz y Parque Ecológico Cerro San Gil, en Livingston de Izabal (fig 5).

Se realizó la extracción del aceite esencial de las hojas de las tres especies en estudio, mediante hidrodestilación utilizando un equipo Neocleavenger y se obtuvieron los rendimientos en cada una de ellas, presentando mayor rendimiento *P. jacquemontianum*, de la cual se evaluaron dos procedencias la del Cerro San Gil (2.24%) y la de Laguna Lachuá (0.77%), siguiendo el orden en forma decreciente *P. oradendron* (0.59%) y *P. umbellatum* (0.32%). La presencia de aceites esenciales en las especies investigadas, permite confirmar su carácter aromático y aumenta sus posibilidades de ser útiles para su aplicación popular. Según la literatura consultada, popularmente se le atribuyen propiedades analgésicas, antirreumáticas, diuréticas, carminativas, digestivas, antiulcerosas, dermatológicas, antihelmíticas y bactericidas (7, 8, 9).

Se hicieron extractos por percolación utilizando como disolventes diclorometano y metanol, se observó el mayor rendimiento utilizando metanol para *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (11.01%), siguiendo *P. umbellatum* (9.18%), *P. jacquemontianum* (6.93%) procedente de la laguna Lachuá y *P. oradendron* (6.02%).

En cuanto a los extractos diclorometánicos con mayor rendimiento fueron *P. jacquemontianum* (8.13%) procedente del Cerro San Gil, siguiendo en orden decreciente *P. umbellatum* (7.90%), *P. jacquemontianum* (5.47%) procedente de la laguna Lachuá y *P. oradendron* (4.94%)

Respecto a la actividad biológica ensayada únicamente los de *P. umbellatum* (diclorometánico) y *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metanólico) presentaron actividad significativa ( $P < 0.10$ ) contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*. Estos resultados preliminares en los ensayos biológicos, es decir, fase de pretamizaje es útil para dar una idea preliminar de las potencialidades que constituyen la base para futuras investigaciones al respecto; tanto sobre las mismas especies, como en otras especies del género. A los extractos con actividad positiva se les determinó la concentración

inhibitoria mínima (CIM), obteniéndose una concentración de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*. La CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento.

Los aceites esenciales evaluados no presentaron actividad significativa ( $P > 0.10$ ) contra los microorganismos evaluados (bacterias o levaduras); por lo que puede inferirse que no poseen actividad antimicótica. Los extractos y aceites esenciales no presentaron citotoxicidad, ya que no se observó la muerte total de los nauplios de *A. salina* en las muestras evaluadas, por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL. Este ensayo es útil como prueba de pretamizaje en la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, antimicrobianas y/o plaguicidas, debido a la pequeña cantidad de muestra requerida para su realización, rapidez, bajo costo, simplicidad y facilidad para evaluar gran número de plantas, así también por la sensibilidad demostrada por *A. salina* ante pequeñas cantidades de extractos vegetales. Este resultado experimental, también permite sospechar que los extractos obtenidos de las especies estudiadas no son tóxicos en dosis adecuadas. Su baja toxicidad *in vitro*, aumenta las posibilidades de utilización, en el desarrollo de un producto medicinal, cosmético, etc; que responda a alguna necesidad de la población.

En la evaluación de la actividad insecticida de los extractos no tuvo actividad larvicida significativa ( $P > 0.10$ ) contra *A. albimanus* y *A. aegypti* en sus cuatro estadios, por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL. Se ha encontrado que la efectividad de las plantas para matar a las larvas depende de las dosis aplicadas, la parte utilizada así como la especie de mosquito. Existen aproximadamente 3200 especies de mosquitos, siendo *Anopheles* y *Aedes*, vectores de dos de las más importantes enfermedades en el mundo, paludismo y dengue, respectivamente, por lo que en el pasado han sido probados compuestos naturales puros con actividad larvicida, como una alternativa contra dichas enfermedades (16). En cuanto a los aceites esenciales, la actividad insecticida no se realizó debido a la escasez de las muestras.

El tamizaje fitoquímico realizado permitió identificar los metabolitos secundarios presentes en las especies, los ensayos que se realizaron fueron alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas. En las especies evaluadas solamente la especie *P. jacquemontianum* procedente de la Laguna de Lachuá presentó taninos.

En el cuadro 10 se observan los resultados de la pruebas preliminares para alcaloides, solamente la especie *P. oradendron* no mostró alcaloides, cuando se hizo la

prueba con el reactivo de Mayer's, con los otros dos reactivos (Dragendorff y Wagner) dio positivo, y las demás especies en estudio dieron positivo para el ensayo de alcaloides. Al realizar la cromatografía en capa fina, se muestra el número de bandas y Rf presentes utilizando la fase móvil descrita en la literatura para cada metabolito (35, 36, 38,39). Se observa que *P. oradendron* tiene un Rf igual al estándar brucina. *P. oradendron* y *P. jacquemontianum* (procedente de Laguna Lachuá) tiene un Rf cercano a el estándar de reserpina (fig. 10).

El cuadro 12 muestra los resultados de las pruebas preliminares para la determinación de flavonoides y antocianinas; en la prueba con cloruro férrico al 10%, solamente la *P. umbellatum* no presentó cambio de color, ni formación de precipitado. Mientras, la *P. jacquemontianum* (procedente del Cerro San Gil), tampoco presentó ningún cambio en la prueba con ácido sulfúrico concentrado. Los especímenes estudiados reaccionaron, con los otros reactivos ya que se observaron los cambios de color indicados por la literatura (39); indicando la posible presencia de flavonoides y antocianinas lo cual se confirmó con la cromatografía en capa fina, donde se puede considerar la posibilidad de que las especies contengan este tipo de flavonoides y antocianinas, ya que se observó la fluorescencia característica a dichos metabolitos, que coincidieron con los estándares: quercetina, rutina, ácido clorogénico e hiperósido (fig. 11).

En el cuadro 14 se puede observar que todas las especies mostraron cumarinas, la cual se confirmó con la cromatografía en capa fina. Al ser agregado el reactivo revelador, se demuestra la presencia del grupo funcional de las cumarinas, el cual reacciona con éste formando el complejo coloreado que permite establecer su presencia (39). (fig 12).

Según los resultados observados en el cuadro 16 en la prueba preliminar solamente la especie *P. jacquemontianum* del Cerro San Gil y de Laguna Lachuá demostraron la posible presencia de antraquinonas debido a que se observó la coloración rojo-rosado en la fase alcalina (39), lo cual se confirmó con la cromatografía en capa fina (fig. 13); donde todas las especies mostraron la posible presencia de antraquinonas. En las muestras de la especie *P. oradendron*, *P. jacquemontianum* de las dos procedencias, se observó una banda (Rf 0.81) que coincide con el estándar, extracto de Sen (Rf 0.81).

En el cuadro 18 se puede observar que en la prueba de espuma, ninguna de las especies presentó saponinas; sin embargo, en la CCF se estableció la presencia de estos metabolitos, ya que las especies en estudio presentaron bandas de color característico

(azules, violetas, amarillentas) al utilizar el revelador (fig. 14). Esta prueba se prefiere realizar la CCF para confirmar si hay presencia de este metabolito.

En la figura 15, en donde se observa la investigación de principios amargos, permite sospechar la presencia de dichos metabolitos, observando bandas características en CCF, de color (rojas-violetas, cafés-rojas, azules-verdes). La especie *P. umbellatum* tiene una banda con un Rf (0.26) similar al Rf de una banda del estándar (0.28).

Al realizar el ensayo de precipitación y coloración para la determinación de taninos se puede observar en la figura 9, que la muestra de *P. jacquemontianum* procedente de la Laguna Lachuá, dio positivo ya que se observó presencia de precipitado con el reactivo gelatina al 1% y el reactivo gelatina-sal; y cambio de coloración grisáceo-negro con el cloruro férrico, presentó taninos dentro de su composición, siendo éste posiblemente del tipo catecol. Mientras que las demás especies no mostraron presencia de taninos en las pruebas realizadas (cuadro 20).

En la figura 16, se puede observar que las especies en estudio presentaron bandas características, lo que permite comprobar la presencia de aceites esenciales. La *P. jacquemontianum* de las dos procedencias en estudio, mostró una banda (Rf 0.26) de similares características con el estándar de terpineol (Rf 0.27).

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 El mayor rendimiento del aceite esencial lo presentó *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (2.24%) y Laguna Lachuá (0.77%), siguiendo el orden en forma decreciente *P. oradendron* (0.59%) y *P. umbellatum* (0.32%).
- 10.2 Los extractos diclorometánicos con mayor rendimiento fueron *P. jacquemontianum* (8.13%) procedente del Cerro San Gil, siguiendo en orden decreciente *P. umbellatum* (7.90%), *P. jacquemontianum* (5.47%) procedente de la laguna Lachuá y *P. oradendron* (4.94%) y los extractos metanólicos con mayor rendimiento fue *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (11.01%), siguiendo *P. umbellatum* (9.18%), *P. jacquemontianum* (6.93%) procedente de la laguna Lachuá y *P. oradendron* (6.02%). Los extractos diclorometánicos y metanólicos con mayor rendimiento, se obtuvieron de la especie *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil, siguiéndola en orden decreciente *P. umbellatum*, *P. jacquemontianum*, procedente de la laguna Lachuá y *P. oradendron*.
- 10.3 Los extractos *P. umbellatum* (diclorometánico) y *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metanólico) presentaron actividad significativa ( $P < 0.10$ ) contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*.
- 10.4 Los extractos diclorometánico de *P. jacquemontianum*, presentó un CIM de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*.
- 10.5 Los aceites esenciales evaluados no presentaron actividad antimicótica significativa ( $P > 0.10$ ) contra los microorganismos evaluados.
- 10.6 Ninguno de los extractos presentó citotoxicidad contra *A. salina*, por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL,
- 10.7 Ninguno de los extractos presentó actividad insecticida significativa ( $P > 0.10$ ) contra *A. albimanus* y *A. aegypti* por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL.

- 10.8 Ninguno de los aceites esenciales presentó actividad citotóxica contra *A. salina*, por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL.
- 10.9 Todas las muestras presentaron alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas y en las especies evaluadas solamente la especie *P. jacquemontianum* procedente de la Laguna de Lachuá presentó taninos.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar estudios fitoquímicos y biológicos introduciendo otras variables como: coleccionar en diferentes épocas del año, altitud y diferentes condiciones climáticas para comparar la composición química y actividad biológica presente en las especies.
- 11.2 Evaluar otras partes de la planta para determinar si existe diferencia en cuanto a la composición química como también si presenta actividad biocida (antimicrobiana, citotóxica, larvicida).
- 11.3 Continuar con el estudio químico y biológico de las especies que presentaron actividad, con el fin de llegar a formular un producto que pueda tener un uso medicinal, aromático y/o cosmético.
- 11.4 Proporcionar información científica y accesible a la población del uso apropiado a las plantas de este género.

## 12. REFERENCIAS

1. FARNSWORTH, N.R. 1985. La medicina moderna y las plantas: un encuentro entre la ciencia y el folklore. Foro Mundial Salud. 6: 89-94.
2. AKERELE, O. 1988. Medicinal Plants and Primary Health Care: an agenda for action. Fitoterapia. 59: 355-363.
3. <http://www.interhiper.com/medicina/fitoterapia/inicio-fito.htm>.
4. ARGETA, A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Primera Edición. México. 1994.
5. CÁCERES, A., *et al.* 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1ª. Edición. Guatemala. Editorial Universitaria. Pp. 23, 27-33, 173,211.
6. STANDLEY PC, y STEYERMARK JA (1952) Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 24(3), 275 337 p.
7. CLEAVES, C. (2001). Etnobotánica participativa en siete comunidades de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá, Cobán, Alta Verapaz. Guatemala. 282p. Tesis Licenciada en Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Biología.
8. ORJALA, J. *et al.*, (1993). Aduncamide, a Cytotoxy and antibacterial beta-Phenylethylamine derived amide from *Piper aduncum*. Nat Product Lett 23, 231-236.
9. SÁEZ, J. *et al.*, (1998) Piperlonguminina y estigmasterol, compuesto de raíces y tallos de *Piper auritum*, Actividad insecticida de extractos. Revistas Colombiana de Química 27 (1): 77.
10. CRUZ VELÁSQUEZ, S. M. 2005. Caracterización de Aceites Esenciales y Evaluación de la Actividad Biocida de Cinco Especies Nativas de Piperaceae. Guatemala. 55. Tesis Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales. MUPLAM. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Facultad de Agronomía.
11. SHARAPIN, NIKOLAI (2000), Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos.101-113, 247 p.
12. Stevens, WD. *et.al.*, Flora de Nicaragua. USA. Missouri Botanical Garden Press, 275-337-
13. BARRIOS REYES, R. S. 2001. Fraccionamiento bioquímico y tamizaje fitoquímico del extracto etanólico con actividad antibacteriana de *Vaccinium poasanum* Donn.-Sm. Guatemala. pp. 12-13. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de

- San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
14. CRUZ VELÁSQUEZ, S.M. 2001. Fraccionamiento Bioguiado y Tamizaje Fitoquímico del extracto etanólico con actividad antiartemia de *Ocimum micranthum* Willd (Albahaca de monte). Guatemala. pp. 16-32. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
  15. SOLIS, P. *et al.*, (2005). Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos (OEA/AICD/AEO89/03). 132 p.
  16. ARANA GUERRA, S.M. 2002. Determinación de la Actividad Larvicida de 18 especies de Plantas detectadas por Etnobotánica y Bioprospección en Guatemala. Guatemala. pp. 42-47. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
  17. COX, P. A. y BALICK, M. J. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery. Scientific American, June. pp. 82-87.
  18. CUTTEL, S. 2000. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. USA. Press LLC. pp. 17-23.
  19. FIÓN EVANS, M.A. 2003. Recopilación de Plantas Medicinales Validadas Farmacológicamente por estudiantes asesoradas en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. pp. 19-25. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
  20. HERNÁNDEZ FOLGAR, S.V. 1998. Fraccionamiento Bioguiado de la corteza de *Simarouba glauca*. Guatemala. pp. 19-25. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
  21. PALACIOS GONZÁLEZ, C.L. 2002. Determinación de la Actividad Biocida de Cuatro Plantas Nativas detectadas por Bioprospección en la Reserva de Biosfera Sierra de Las Minas. Guatemala. pp. 10-18, 24-27. Tesis Licenciado en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica.

22. SOLÍS ROSALES, G.G. 2003. Actividad Biocida de Cuatro Plantas de Uso Medicinal en el Parque Nacional Laguna de Lachuá. Guatemala. pp. 4-6, 11-17, 22-27. Tesis Licenciado en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica.
23. VÁSQUEZ REYNA, J.A. 2002. Determinación de la Actividad Biocida de Cuatro Plantas de pertenecientes a la Familia Asteraceae utilizadas etnomédicamente en la comunidad de Mal Paso del municipio de Gualán, Zacapa. Guatemala. pp. 6-13, 20-23. Tesis Licenciado en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica.
24. MICHAEL, A., *et al.* 1956. *Artemia salina* as a test organism bioassay. Science 123: 464.
25. SOLÍS, P.N. *et al.* 1993. A microwell citotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). Planta Médica. 59: 250-252.
26. MEYER, B.N., *et al.* 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. Planta MÉDICA 45: 31-34.
27. WAH SAM T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In. Colgate FM & Molineux RJ. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. Boca Raton, CRC Press. pp. 441-456.
28. ANDERSON J.E., *et al.* 1991. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as ant tumor prescreens. Phytochemical Analysis. 2: 107-111.
29. RÍOS J. L., *et al.* 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. Journal of Ethnofarmacology. 28: 127-149.
30. MITSCHER, L.A., *et al.* 1987. A modern look at folkloric use anti-infective agents. J. Nat. Prod. 5: 1025-1041.
31. <http://www.mobot.org/manualplantas>.
32. PELLECUER, S., *et al.* 1976. Huiles Essentielles Bactericidas et Fongicides. Revue de l'Institute Pasteur de Lyon. 9:135-159.
33. MITSCHER, L.A., *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. Lloydia. 35: 157-166.
34. CYTED (PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO).
35. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA (2002) 2a. ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801.

36. SANTA CRUZ, L. Manual: Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. 92 p.
37. Kagan J et al. 1983. The phototoxicity of some 1,3-butadienes and related thiophenes against larva of the mosquito *Aedes aegypti* and of the fruit fly *Drosophyla melanogaster*. *Insecta. Sci. Appl.* 4:377-381.
38. Zarroug IMA et al. 1988. Evaluation of Sudanese plant extracts as mosquito larvicides. *Int. J Drug Res.* 26:77-80.
39. WARNER, H. et al (1984) Plant Drug Analysis. Berlin, Springer-Verlag, 320 p.
40. BASE DE DATOS NAPRALERT. 2005.
41. ANÓNIMO. 1991. Reunión anual de la Red Iberoamericana de Productos Naturales de uso medicinal. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Sao Paulo, Brasil. pp. 15-19.
42. BANDONI, A. (2000). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. La Plata, Ed. Univ. Nac. De la Plata, 410 p.
43. 1993. Manual de Técnica de Investigación. Bogotá, Proyecto X-1, s/p.
44. DIAS DOS SANTOS, P. et al., (2001). Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry* (58): 547-551.
45. MOLINA GONON, R. Y. 2005. Determinación de la Actividad Biocida del Extracto Etanólico y sus Particiones (Hexánica, Clorofórmica, Acetato de Etilo y Acuosa) de Hojas de *Cornutia pyramidata* L. (JOROBTE). Guatemala. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
46. MOREIRA, D.L et al., (1972) Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction rationale and methodology. *Lloydia* 35:157-166.
47. RODRIGUEZ J. y SUÁREZ, Y. A. (1981). Estudio fitoquímico del aceite esencial de *Piper lenticillosum* C- DC. Segunda parte y determinación de la actividad del aceite sobre la motilidad de la lombriz de tierra (*Andiodrilus bogotensis*).
48. SANDBERG, F. 1987. The Integrated Natural Products Research in the Development of Plant-derived Pharmaceuticals. *Fitoterapia.* 57: 309-313.
49. SANTANA, AL., et al., Composición química de aceites esenciales de *Piper corrugatum* y *Piper darienense* de Panamá. Póster centro de Investigaciones de la flora de panameña.
50. SANTOS, P.R et al., Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochem.* 58: 547-551.
51. STANDLEY, PC & L.O. WILLIAMS. 1931. Flora of the Lancetilla Valley Honduras. USA. Field Museum of Natural History. Parte 24. Volumen 9. pp. 335-336.

## 13. ANEXOS

### Información de las especies

**Nombre Popular:** Santa María, obet, obbel (Cobán, q' eqchí')

**Nombre científico:** *Piper umbellatum* L., *Heckeria umbellata*, *Pothomorphe umbellata*.

**Descripción Botánica:** Plantas erecta, usualmente de 1 a 1.5 metros de altura, escasamente ramificadas, herbáceas, pero algunas veces algo leñosas en la parte inferior, las ramas jóvenes densamente vellosa-pilosas; peciolo de 20 cm. De largo o más cortos, vaginados en parte de su longitud, láminas de las hojas, delgadas y flácidas, verdes cuando secas, ovado-orbiculares, mayormente de 20 a 30 cm. De largo y de igual o más anchura, agudas o abruptamente acuminadas, ápice corto, base cordada, usualmente estrecha, con lóbulos basales grandes, redondeados, verdes en el haz, glabras a densamente villosas, algo más pálidas en el envés, escasa o densamente pubescentes o vellosas; frutos de no más de 0.5 mm. De largo (7).

**Hábitat:** Esta especie se encuentra generalmente en las riberas de los riachuelos, corrientes, orilla del camino, bosque, orilla del río. 1500 msnm o menos (7).

**Distribución:** Sur de México, Belice a El Salvador y Panamá, Indias Occidentales, Sur América. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango y San Marcos (7).

**Usos etnobotánicos:** Diurético, antiabortivo, antidiarreico, antiinflamatorio, dolor de cuerpo (40).

En Tzetoc se usa para aliviar el dolor de cabeza y de oído. Las hojas se calientan y amarran en la cabeza. Se aplica hasta sanar.

En salinas se usa contra alergias. Las hojas se preparan en cocimiento y se toman 2 ó 3 vasos una sola vez.

En Salacuim se usa para la fiebre. Se hace el cocimiento de las hojas y se hacen lavados (7).

**Usos Populares:** Existe una creencia popular en algunas partes de Centro América de que el jugo de las hojas frotado en la piel, previene el ataque de insectos. Se disequen

Jocotán, un preparado de esta planta con jutes o babosas (moluscos) se bebe para incrementar la leche en mujeres que dan de mamar. El jugo de la hoja se usa como emenagogo y diurético y es utilizado como cataplasma en quemaduras y heridas. También se usa como gotas para aliviar el dolor de oído. El cocimiento de las hojas se usa para aliviar las obstrucciones del hígado y para cualquier problema urinario, sífilis y desordenes estomacales. Las hojas cocinadas con un poco de agua son aplicadas a heridas. La raíz es estimulante, diurética y promueve la salida de bilis. El cocimiento de la raíz se usa para obstrucción del hígado, reumatismo, sífilis, epilepsia y retraso menstrual. Es un poderoso digestivo y se usa en el tratamiento contra la dispepsia, constipación y gastralgia. Las hojas son emolientes, el té se usa para combatir los resfríos y el escorbuto. La raíz es sudorífica, estomáquica, diurética y febrífuga (7).

**Otros Usos:** Las hojas son utilizadas para condimentar guisados de carne y otros platillos.

**Composición química (aceites esenciales):** Canineno, sesquiterpeno, cariofileno, ácido cinámico, daucosterol, monoterpeno, flavonoides, daucosterol, alcaloides isoquinolina, beta-sitosterol. (40)

**Composición farmacológica:** Según la revisión en NAPRALERT no se encontró estudios.



Figura 1. *Piper umbellatum* L.



Figura 2. *Piper umbellatum* L.

**Nombre Popular:** Cordoncillo. Poozcuyaax (maya).

**Nombre científico:** *Piper jacquemontianum* Kunth, *Piper aeruginosibaccum* Trelease, *Piper onerosum*, *Piper plumbeicolor*.

**Descripción Botánica:** Arbusto comúnmente de aproximadamente 2 m de altura, las ramas jóvenes densamente hispidulosas o hírtulas, algunas veces glabras con la edad u ocasionalmente casi glabras desde el principio; pecíolos mayormente de 1 cm de largo o menos, algunas veces más largo en las hojas bajas, rígidos, densamente hispidulosos o raramente glabros; láminas de las hojas ovado- oblongas u ovado-elípticas, mayormente de 12 a 20 cm de largo y de 4.5 a 9 cm de ancho, ápice abruptamente acuminado o largamente acuminado, muy desigual en la base y más o menos oblicua, usualmente redondeado o más o menos cordado en un lado y obtuso en el otro, un lado más decurrente que el otro, gruesas y firmes, muy lustrosas en el haz y con frecuencia lustrosas en el envés, un poco más pálidas en el envés, cuando se secan se tornan verde grisácea o algunas veces negruzca, con puntos pelúcidos finos, glabras en el haz, suaves al tacto, hispidulosas en el envés, especialmente en los nervios, con pelos sórdidos subadpresos, ásperos al tacto, penninervadas usualmente 3 nervios en cada lámina, las venas son prominente en el envés, laxamente reticuladas; pedúnculos cortos, gruesos, densamente puberulentos o hispidulosos espigas erectas, mayormente de 5 a 7 cm de largo y de 3 a 4 mm de grosor, obtusas, gruesas; las brácteas con pubescencia densa (7).

**Hábitat:** Bosques o matorrales húmedos o lluviosos, algunas veces en bosque de pino o en pantanos de Mancarí. 900 msnm o menos (7)

**Distribución:** Campeche, Guatemala, Belice. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Petén e Izabal (7).

**Usos etnobotánicos:** En Guatemala se usa para bajar la fiebre, para granos, para la tos y para aliviar el dolor de cabeza y de cuerpo (7).

**Usos Populares:** En San Marcos se usa para los granos, se hacen baños del cocimiento de las hojas y se toma por 3 días.

Se utiliza para la tos, se hace un cocimiento de la raíz y se toman 3 vasos al día.

En Santa Lucía se usa para aliviar el dolor de cabeza y de cuerpo, se aplica la hoja directamente o en baños. También se usa contra el dolor de corazón, por vía oral (7).

**Composición química:** Según la revisión en NAPRALERT no se encontró estudios realizados.

**Composición farmacológica:** Según la revisión en NAPRALERT no se encontró estudios realizados.



**Figura 3. *Piper jacquemontianum* Kunth.**

**Nombre Popular:** Cordoncillo.

**Nombre científico:** *Piper oradendron* Trelease & Standley.

**Descripción Botánica:** Arbusto de entre 1-2.5 m de alto; flores en espigas solitarias, sésiles; espigas erectas; hojas penninervias, pubescentes en ambos lados de la hoja; algo escabroso al tacto; hojas delgadas y lustrosas en el envés; hojas cordadas a muy obtusas en la base, ovadas a ovado-elípticas.

**Hábitat:** esta especie se encuentra generalmente orilla del camino.

**Distribución:** En Guatemala, Suchitepéquez.

**Composición química:** Según la revisión en NAPRALERT no se encontró estudios.

**Composición Farmacológica:** Según la revisión en NAPRALERT no se encontró estudios.



**Figura 4.** *Piper oradendron* Trelease & Standley

### SITIOS DE COLECTA

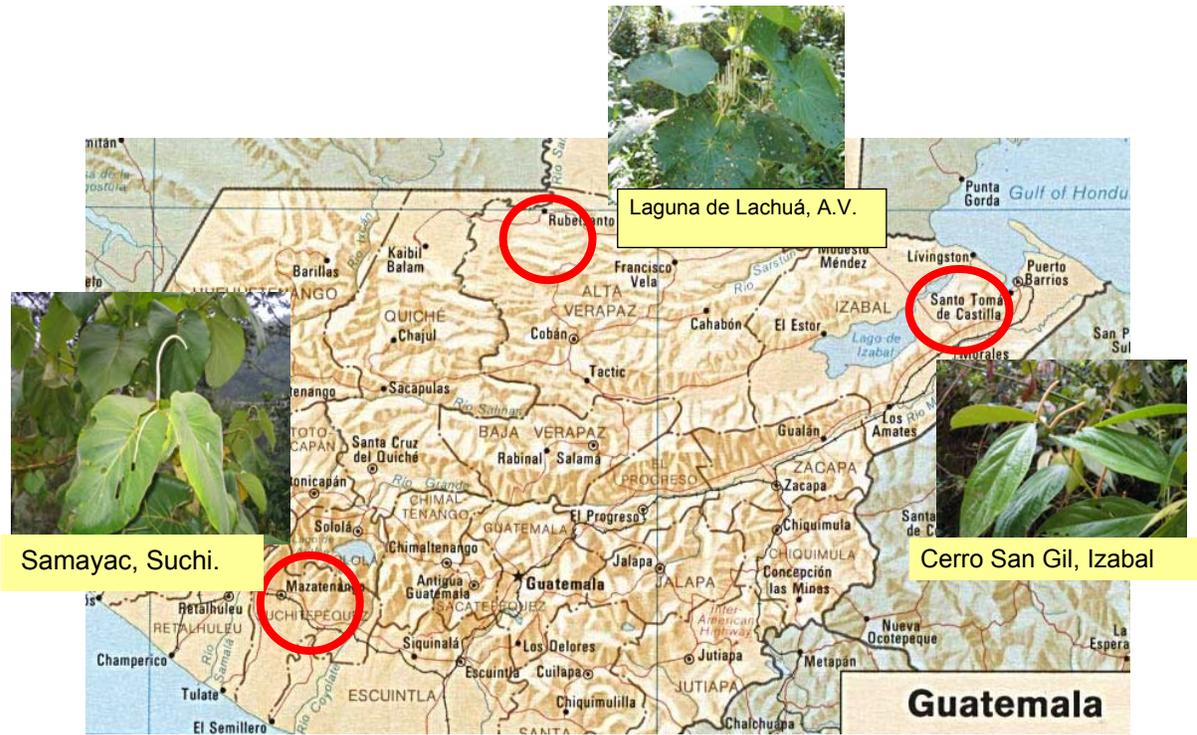


Figura 5. Mapa de sitios de colecta

## TAMIZAJE FITOQUIMICO



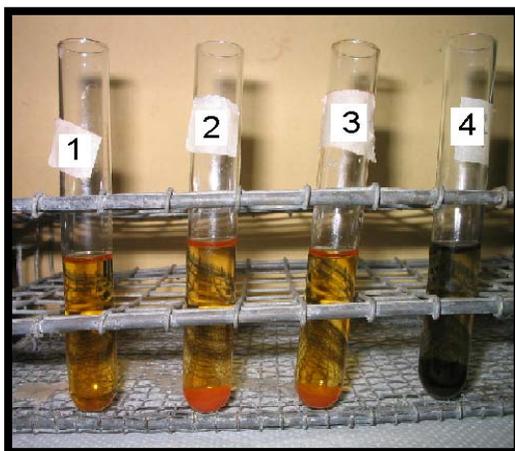
Figura 6. Tamizado de las hojas en estudio.



Figura 7. Extracción por Percolación.



Figura 8. Concentración usando Rotavapor



**Tubo No. 1: testigo**  
**Tubo No. 2: extracto hoja + gelatina al 1%**  
**Tubo No. 3: extracto hoja + gelatina-sal**  
**Tubo No. 4: extracto hoja + solución de cloruro férrico al 10%**

Figura 9. Investigación de taninos en *P. jacquemontianum* (Procedencia Laguna Lachuá).

## CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF)

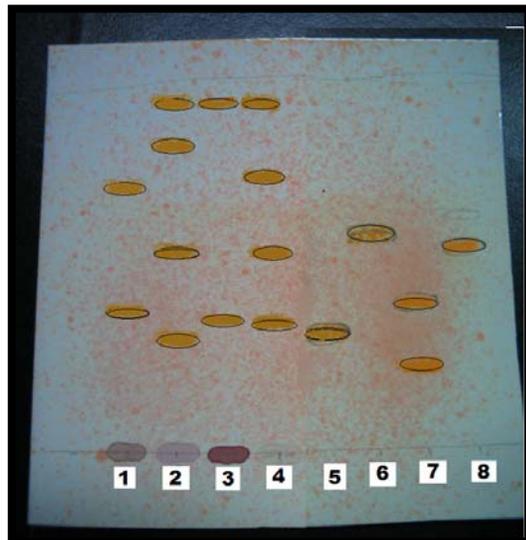
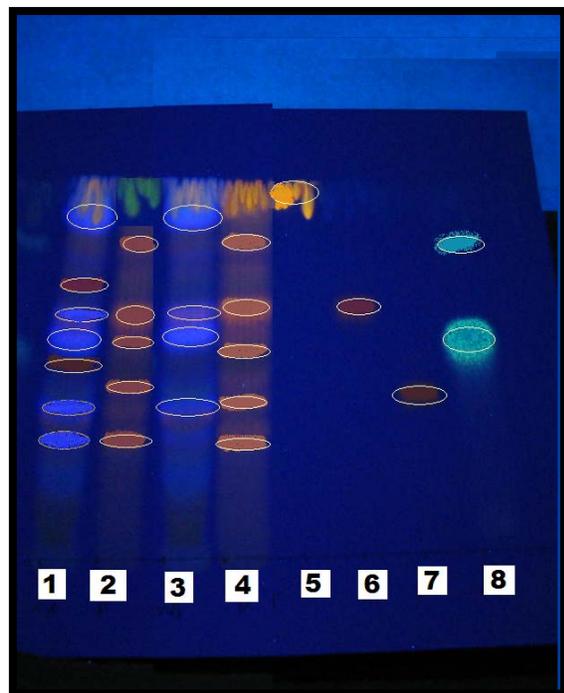


Figura 10: CCF de Alcaloides

(1) Procedencia Laguna Lachuá.  
 (2) Procedencia Cerro San Gil.  
 Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (35:10:5).  
 Detección: Reactivo de Dragendroff.

1. *P. umbellatum*: Rf a: 0.36  
Rf b: 0.54
2. *P. oradendron*: Rf a: 0.23  
Rf b: 0.43  
Rf c: 0.78  
Rf d: 0.94
3. *P. jacquemontianum* (2): Rf a: 0.34  
Rf b: 0.94
4. *P. jacquemontianum* (1): Rf a: 0.34  
Rf b: 0.43  
Rf c: 0.60  
Rf d: 0.94
5. Estándar brucina: Rf: 0.23
6. Estándar papaverina: Rf: 0.48
7. Estándar atropina: Rf a: 0.24  
Rf b: 0.47
8. Estándar Reserpina: Rf : 0.46



8. Estándar ácido clorogénico: Rf a: 0.49

(1) Procedencia Laguna Lachuá.  
 (2) Procedencia Cerro San Gil.  
 Fase móvil: acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético glacial-agua (33.33:3.6:3.6:9).  
 Detección: Reactivo de Productos Naturales.

1. *P. jacquemontianum* (2): Rf a: 0.22  
Rf b: 0.27  
Rf c: 0.36  
Rf d: 0.42  
Rf e: 0.61  
Rf f: 0.72  
Rf g: 0.88
2. *P. oradendron*: Rf a: 0.23  
Rf b: 0.34  
Rf c: 0.42  
Rf d: 0.64  
Rf e: 0.74
3. *P. umbellatum*: Rf a: 0.31  
Rf b: 0.44  
Rf c: 0.60  
Rf d: 0.74
4. *P. jacquemontianum* (1): Rf a: 0.26  
Rf b: 0.35  
Rf c: 0.46  
Rf d: 0.72  
Rf e: 0.88
5. Estándar quercitina: Rf: 0.97
6. Estándar hiperósido: Rf: 0.73
7. Estándar rutina: Rf: 0.3

Figura 11. CCF Flavonoides y Antocianinas

Rf b. 0.79

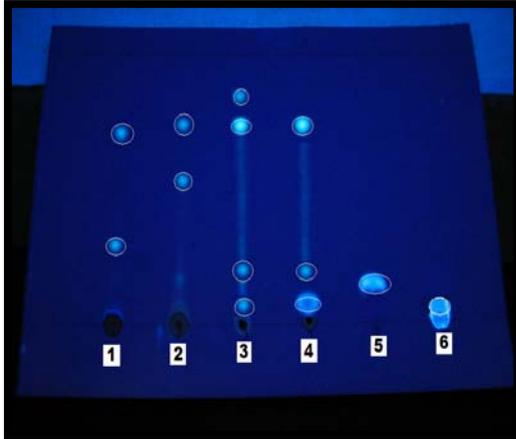


Figura 12. CCF de Cumarinas

- (1) Procedencia Laguna Lachuá.  
 (2) Procedencia Cerro San Gil  
 Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (46.5:3.5).  
 Detección: Hidróxido de potasio 10%

1. *P. umbellatum*: Rf a: 0.23  
 Rf b: 0.60  
 2. *P. oradendron*: Rf a: 0.48  
 Rf b: 0.60  
 3. *P. jacquemontianum* (1): Rf a: 0.09  
 Rf b: 0.37  
 Rf c: 0.60  
 Rf d: 0.72  
 4. *P. jacquemontianum* (2): Rf a: 0.09  
 Rf b: 0.36  
 Rf c: 0.59  
 5. Estándar cumarina: Rf: 0.15  
 6. Estándar umbeliferona: Rf: 0.10

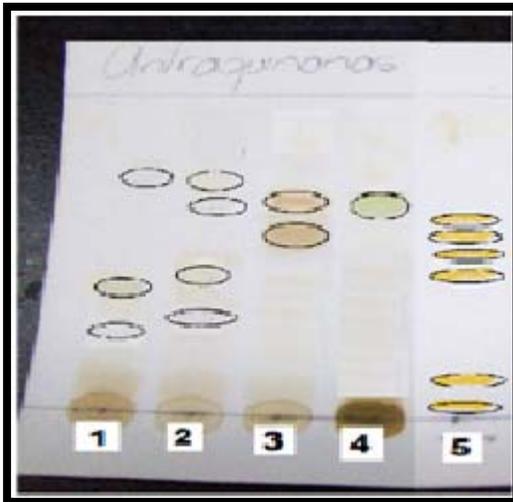
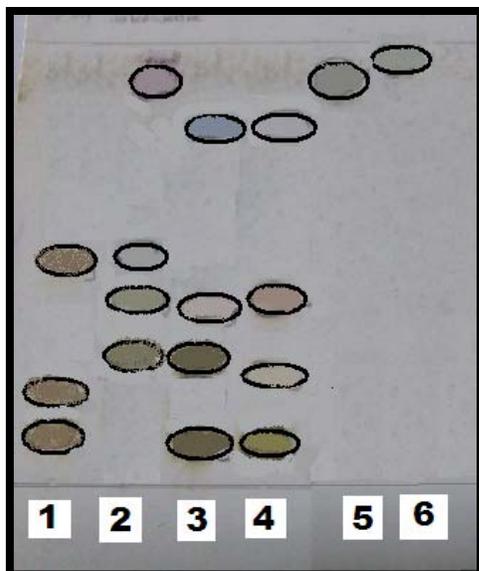


Figura 13. CCF de Antraquinonas

- (1) Procedencia Laguna Lachuá.  
 (2) Procedencia Cerro San Gil.  
 Fase móvil: acetato de etilo, metanol, agua (50:8.5:6.5).  
 Detección: Hidróxido de potasio al 10%.

1. *P. umbellatum*: Rf a: 0.26  
 Rf b: 0.34  
 Rf c: 0.87  
 2. *P. oradendron*: Rf a: 0.28  
 Rf b: 0.36  
 Rf c: 0.81  
 Rf d: 0.85  
 3. *P. jacquemontianum* (2): Rf a: 0.58  
 Rf b: 0.81  
 4. *P. jacquemontianum* (1): Rf a: 0.81  
 5. Estándar extracto de sen: Rf a: 0.096  
 Rf b: 0.19  
 Rf c: 0.42  
 Rf d: 0.70  
 Rf e: 0.75  
 Rf f: 0.81



1. *P. umbellatum*: Rf a: 0.12  
Rf b: 0.19  
Rf c: 0.34
2. *P. oradendron*: Rf a: 0.23  
Rf b: 0.30  
Rf c: 0.35  
Rf d: 0.80
3. *P. jacquemontianum* (2): Rf a: 0.12  
Rf b: 0.25  
Rf c: 0.32  
Rf d: 0.70
4. *P. Jacquemontianum* (1): Rf a: 0.13  
Rf b: 0.23  
Rf c: 0.34  
Rf d: 0.70
5. Estándar de saponinas: Rf: 0.86
6. Estándar de colesterol: Rf: 0.96

**Figura 14. CCF de Saponinas**

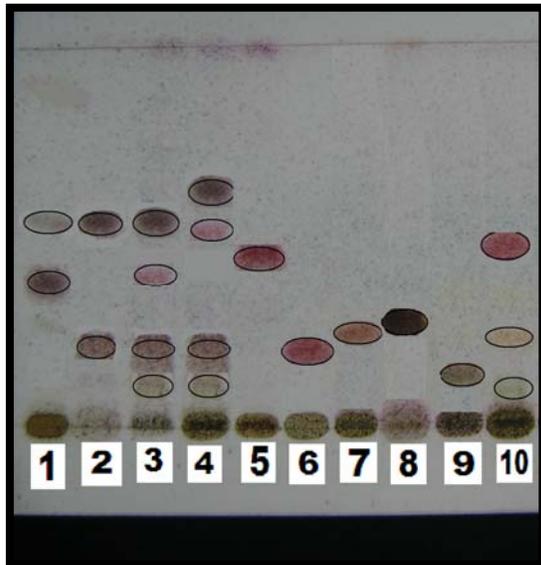
(1) Procedencia Laguna Lachuá.  
 (2) Procedencia Cerro San Gil.  
 Fase móvil: Cloroformo, metanol (95:5).  
 Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico.



1. *P. umbellatum*: Rf a: 0.12  
Rf b: 0.26  
Rf c: 0.41  
Rf d: 0.51  
Rf e: 0.66
2. *P. oradendron*: Rf a: 0.12  
Rf b: 0.43
3. *P. jacquemontiamun* (2): Rf a: 0.75  
Rf b: 0.90
4. *P. jacquemontiamun* (1): Rf: 0.79
5. Estándar *Neurolaena lobata*: Rf a: 0.28  
Rf b: 0.95

**Figura 15. CCF de Principios amargos**

(1) Procedencia Laguna Lachuá.  
 (2) Procedencia Cerro San Gil.  
 Fase móvil: Acetato de etilo, metanol, agua (77:15:8).  
 Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico.



1. *P. umbellatum*: Rf a: 0.41  
Rf b: 0.56
2. *P. oradendron*: Rf a: 0.33  
Rf b: 0.55
3. *P. jacquemontiamun* (2): Rf a: 0.26  
Rf b: 0.35  
Rf c: 0.42  
Rf d: 0.56
4. *P. jacquemontiamun* (1): Rf a: 0.26  
Rf b: 0.38  
Rf c: 0.55  
Rf d: 0.69
5. Estándar carvacrol: Rf: 0.51
6. E estándar fenchona: Rf: 0.32
7. Estándar isopulegol: Rf: 0.36
8. Estándar linalool; Rf: 0.38
9. Estándar terpineol: Rf: 0.27
10. Mezcla de aceites: Rf a: 0.25  
Rf b: 0.33  
Rf c: 0.51

Figura 16. CCF de Aceites Volátiles

- (1) Procedencia Laguna Lachuá.  
 (2) Procedencia Cerro San Gil.  
 Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (46.5:3.5).  
 Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico.

## ACTIVIDAD CITOTOXICA

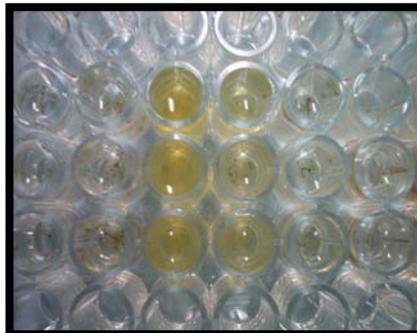


Figura 17. Actividad citotóxica contra *Artemia salina* de extractos y aceites esenciales

## ACTIVIDAD LARVICIDA

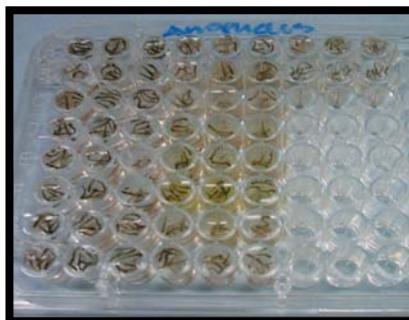


Figura 18. Primero, segundo y tercer estadio de *A. albimanus* de extractos.

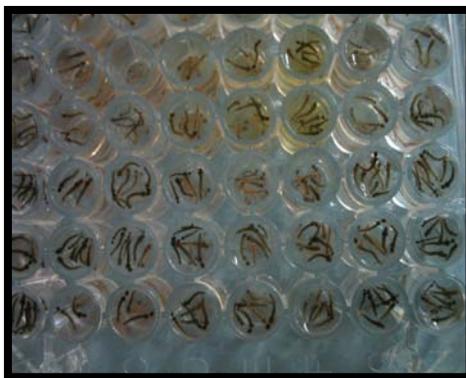


Figura 19. Cuarto estadio de *A. albimanus* y *A. aegypti* de extractos.

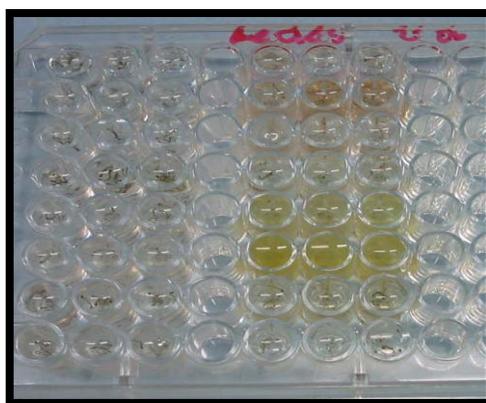


Figura 20. *Aedes aegypti* de primero, segundo, tercer estadio de extractos.

## EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR EQUIPO NEOCLEVENGER

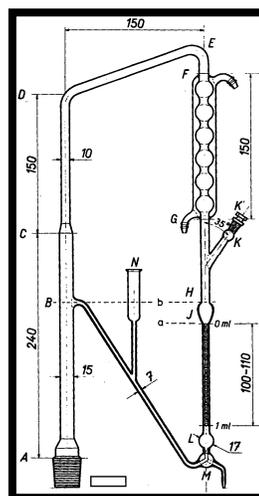
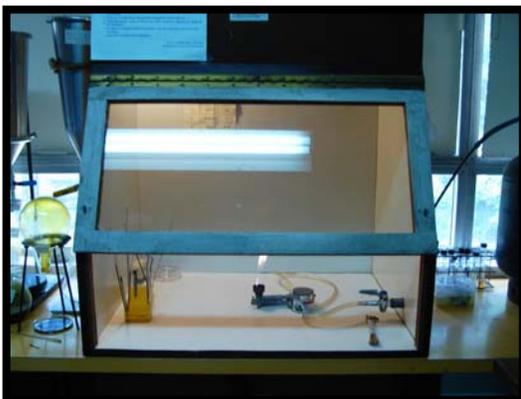
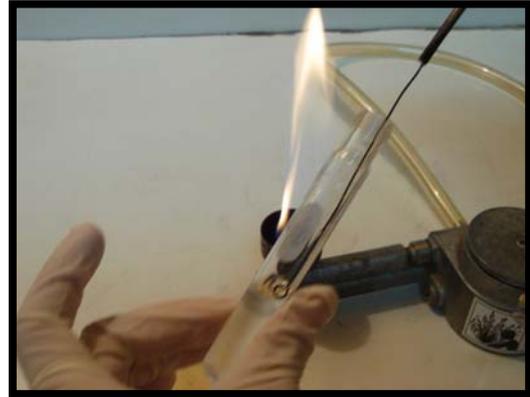
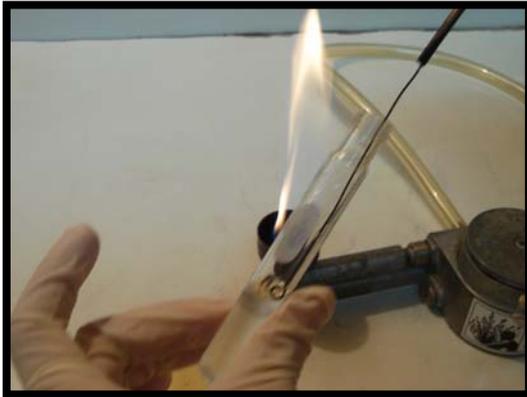
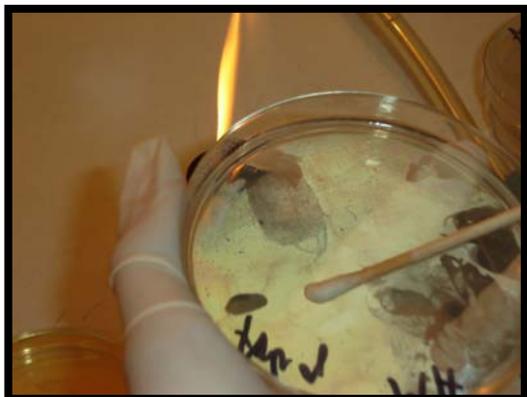


Figura 21. Equipo Neoclevenger

# TAMIZAJE ANTIMICROBIANO





Tamizaje antibacteriano por método de difusión.