

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA DE CUATRO ESPECIES DE
MUERDAGO DE GUATEMALA**

[*Phoradendron robustissimum* Eischler; *Psittacanthus calyculatus* (DC.) G.Don;
Struthanthus marginatus (Desr.) Blume; y *Struthanthus orbicularis* (HBK.) Blume].

Boris Leonel Juárez Ríos

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Guatemala, Noviembre del 2008.

ÍNDICE

	No. Página.
Resumen.....	3
Introducción.....	5
Antecedentes.....	7
Justificación.....	11
Objetivos.....	12
Hipótesis.....	13
Materiales y Métodos.....	14
Resultados.....	31
Discusión de Resultados.....	38
Conclusiones.....	40
Recomendaciones.....	42
Referencias.....	43
Anexos.....	46

JUNTA DIRECTIVA

Ph.D. Oscar Manuel Cóbar Pinto	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón	Vocal I
Licda. Liliana Magaly Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jimenez	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Anibal Rodrigo Sevillanos Cambronero	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A Lic. Armando Cáceres por su asesoría, motivación y apoyo financiero para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio “LIPRONAT” de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por brindar la oportunidad de realizar este estudio.

Al Departamento de Citohistología Humana de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por brindar la oportunidad de realizar este estudio, especialmente a Licda. Isabel Gaitán por asesoría técnica.

Al Laboratorio de “FARMAYA” por brindar acceso a la información bibliográfica.

A Licenciada Sully Margot Cruz por sus consejos y asesoría en la realización de este proyecto de investigación.

Al Licenciado Víctor Manuel Rodríguez Toaspeñ por su ayuda y tiempo para concretar la finalización de este proyecto.

A la Licenciada Ericka Marisol Boror por su ayuda y tiempo dedicado para realizar este proyecto de investigación.

A la Licenciada Claudia María Rodríguez García por la asesoría y tiempo dedicado en este proyecto.

ACTO QUE DEDICO

A Dios Quien es mi Creador

A mis Padres Por sus esfuerzos, sacrificios y cariño brindado en el
curso de mi existir.

A mi Hermano Quien me apoyo con todo su cariño.

A mis Tíos Por su cariño.

A mis amigos y compañeros de Universidad.

A todos muchas gracias por todo el apoyo incondicional.

1. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATERESUMEN

Los productos naturales representan en Guatemala, especialmente en el área rural, casi la única alternativa terapéutica para la población. El presente estudio fue realizado con el objetivo de contribuir al estudio fitoquímico y biológico de las plantas medicinales de uso popular en Guatemala a través de la evaluación de la actividad biocida en los extractos etanólicos de las hojas de cuatro especies de muérdagos (*Phoradendron robustissimum* Eischler; *Psittacanthus calyculatus* (DC.) G.Don; *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume; y *Struthanthus orbicularis* (HBK.) Blume) de Guatemala, conocidas popularmente como matapalo.

Tres de las especies *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus* y *S. orbicularis* fueron colectadas en la Ecoparcela “El Cacaotal”, Cantón Chiguaxté del municipio de Samayac, departamento de Suchitepéquez, ubicado en la costa sur de Guatemala; y la cuarta especie, *S. marginatus*, fue colectada en el centro de la ciudad capital.

Las plantas recolectadas se secaron en horno a temperatura constante que no excediera los 40 °C; se procedió a obtener los extractos etanólicos mediante percolación; y posteriormente, la concentración de los menstros en rotavapor a temperatura controlada y presión reducida.

Empleando un método de dilución en agar se evaluó la actividad biocida de los extractos etanólicos. Los resultados demostraron que los extractos de la especie *S. orbicularis* presentó actividad biocida contra la bacteria Gram positivo *Bacillus subtilis* a una concentración de 1 mg/mL y el hongo levaduriforme *Cryptococcus neoformans* a una concentración 0.5 mg/mL; la especie *P. calyculatus* presentó actividad biocida contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración 1 mg/mL; la especie *S. marginatus* presentó actividad biocida contra las bacterias Gram positivo *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* a una concentración de 0.5 mg/mL, la bacteria Gram negativo *Pseudomonas aeruginosa* y el hongo filamentoso *Microsporium gypseum* a una concentración de 1 mg/mL; y la especie *Ph. robustissimum* presentó actividad biocida a una concentración de 1 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*.

Ninguno de los extractos etanólicos de las especies de múerdago presentaron actividad citotóxica contra *Artemia salina* ni larvicidad contra *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* por lo que se determinó la concentración letal es mayor a 1 mg/mL.

A través de ensayos macro y semimicro y cromatografía en capa fina se realizó la caracterización fitoquímica, en el cual se identificaron los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus*, *S. orbicularis*, que fueron: aceites volátiles, alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides y principios amargos

2. INTRODUCCIÓN

En Guatemala existe una antiquísima tradición de medicina popular, principalmente de origen indígena, aunque con aportes de la tradición europea traída por los conquistadores españoles y por emigrantes de otras culturas, tal el caso del muérdago (*Viscum album* L.). La comprobación científica de ese tipo de creencias y conocimientos, y su consecuente apropiación por la medicina moderna se ha visto entorpecida no sólo por la soberbia de los médicos y farmacéuticos académicos sino también, y en gran parte, por prejuicios culturales que sólo recientemente empiezan a ser superados.

Esa larga tradición de la medicina popular guatemalteca se remonta a las culturas precolombinas, pero también se ha enriquecido con los aportes de otras tradiciones, especialmente la occidental europea. Sin embargo, la fuente de su inagotable riqueza la constituye la igualmente rica biodiversidad que se observa en el país, cuya variedad de suelos y ecosistemas han sido propicios para la adaptación de innumerables familias de plantas de origen foráneo, tal el caso del muérdago, parecido a la especie europea, precisamente por sus propiedades medicinales reconocidas desde la antigüedad. Además de esto, durante la época colonial, en 1722, Fray Francisco Ximénez identificó y describió una especie local de muérdago de la familia de las Loranthaceae, de lo que parece ser un *Psittacanthus rhynchanthus*, y cerca de 1800 José Mariano Mociño enlistó dos especies de Loranthaceae en territorio del antiguo reino de Guatemala. (32)

La vigencia de esta tradición en la actualidad (el uso intensivo de plantas medicinales para las más diversas enfermedades) se explica, en parte, por la inaccesibilidad del sistema de Salud Pública para grandes sectores de la población y, en parte, por la relativa efectividad terapéutica de ciertas plantas en casos específicos y puntuales.

Desde mediados del siglo XX, la etnomedicina no ha dejado de acrecentar sus registros del acervo medicinal tradicional de Guatemala, así como el inventario de las enfermedades sobre las cuales se le atribuye efectividad terapéutica. A esto se suma un cambio de actitud de la farmacología científica que generalmente tendía a desechar toda esa sabiduría popular por el sistema de creencias mágicas y mitológicas (o sencillamente supersticiosas) que prescribía su uso. Actualmente sucede lo contrario: se

trata de validar científicamente ese conocimiento popular mediante la identificación de los agentes activos y las pruebas de laboratorio de sus propiedades medicinales específicas.

Para esta investigación se seleccionaron 4 especies de múerdago de uso común que no cuentan con la validación científica de sus propiedades medicinales atribuidas popularmente, siendo el objeto de la presente investigación: *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus*, y *S. orbicularis*, las cuales se encuentran y localizan en el territorio nacional.

Las muestras fueron evaluadas en función a los siguientes parámetros: demostración de la actividad biocida (bacterias, levaduras, hongos, larvas y citotoxicidad contra nauplios de *A. salina*) de los extractos etanólicos, caracterización fitoquímica macro y semimicro del extracto etanólico

3. ANTECEDENTES

Los muérdagos (“mistletoes”) o ligas, son plantas hemiparásitas con raíces especializadas llamadas haustorios, que extraen el agua y sales minerales de la savia de la planta hospedera, por lo cual en algunas ocasiones producen trastornos como tumores leñosos o las denominadas “flores de palo”. Los muérdagos o ligas pertenecen a tres familias del orden Santalales: Loranthaceae *sensu stricto*, Viscaceae y Eremolepidaceae. Anteriormente estas familias fueron tratadas como subfamilias de Loranthaceae *sensu lato* (Loranthoideae, Viscoideae y Eremolepidoideae). Se pueden diferenciar fácilmente porque las Loranthaceae *s.s.* tienen flores bisexuales, cáliz y corola, mientras que las Viscaceae y Eremolepidoideae no tienen cáliz y las flores son unisexuales. (4, 23, 24)

Las especies escogidas (*P. calyculatus*, *S. marginatus* y *S. orbicularis*) pertenecen a la familia Loranthaceae *s.s.* que son arbustos, arbolitos o hierbas trepadoras hemiparásitas epífitos, con hojas simples alternas u opuestas, raras veces verticiladas e inflorescencias axiales o terminales que pueden ser racimos (*Struthanthus*) o umbelas (algunos *Struthanthus*). Las pequeñas flores verdes o amarillas son actinomorfas (*Struthanthus*) o ligeramente zigomorfas (*Psittacanthus*) con 4, 6 ó 7 pétalos, bisexuales o dioicas. El fruto es una baya y la semilla está rodeada por un tejido viscoso. Son plantas con raíces sin pelos absorbentes o con raíces en forma de ventosa llamadas haustorios, por medio de las cuales se fijan a las ramas de la planta hospedera, a veces provocando el desarrollo de tumores muy grandes. (23,24)

La especie *Ph. robustissimum*; pertenece a la familia Viscaceae, que son pequeños arbustos hemiparásitos sobre ramas de árboles que producen haustorios ramificados que a veces provocan grandes y vistosos tumores leñosos en el hospedero. Tiene hojas opuestas, simples y enteras que pueden ser verdes y bien desarrolladas (*Phoradendron*). Las flores son muy pequeñas, verdosas o amarillentas, actinomorfas, unisexuales (monoicas o dioicas) y están dispuestas en espigas. (23, 24)

Las propiedades mágicas y medicinales del muérdago se hunden en la prehistoria. Plinio, el historiador romano, lo menciona relacionado con los ritos de los druidas. Dioscórides recomendaba su uso oral y tópico para el tratamiento de apostemas, induraciones y tumores. Aparece también en el *Antidotario*, de Reichenau, del siglo IX y desde entonces pertenece al enorme repertorio de la medicina popular con multitud de aplicaciones para las más variadas enfermedades. (4, 32)

El mismo Cáceres en su obra *Plantas de uso medicinal en Guatemala* recoge de la tradición popular el uso de las diferentes partes del muérdago (raíces, hojas, tallo, frutos), preparados en diferentes formas (jugos, extractos, ungüentos, etc.) para 38 enfermedades, lo que de alguna manera y en algunas enfermedades específicas es indicio de alguna actividad biocida. (4, 5)

Estudios químicos demuestran que las hojas de *V. album* contiene alcaloides (viscibina), viscotoxina (I, II, III, IV, A1, A2, A3, B, P_s-1), un glucósido cardiotónico (viscoflavina), lectinas (viscumina), flavonoides (flavonoles, flavanonas, charconas y derivados de la quercitina), mucílago, taninos, aceite fijo, inositol, xantofila, azúcar, almidón, carotenoides (α y β -carotenos, luteolina), β -amirina, lupeol, ácido oleanólico, tiramina, β -fenilalanina, colina, acetilcolina, propionilcolina, alcohol cerílico, manitol, quercetina, inositol, glucosa, arabinosa, rhamnosa, ácidos caféico, sinápico, oleanólico y mirístico, colina, histamina, inositol, viscina, lignanos (eleuterósidos E, mono-O-glucósidos, glucósido de siringenina-4^l-apiosilo, siringina). (1, 4, 24)

Estudios farmacológicos demuestran que el extracto etanólico de *V. album* tiene actividad espasmolítica en ileón aislado y sobre el Sistema Nervioso Central del ratón, actividad inmunológica en estudios realizados en voluntarios sanos y pacientes oncológicos de extractos de múerdago en dosis de 2.5 mg, promueven un aumento migratorio de los linfocitos T y una mayor producción de macrófagos y linfoquinas, así como la actividad cardiovascular producida por las viscotoxinas (se encuentra en frutos y en grandes cantidades produce toxicidad; nauseas, vómitos y diarreas), colina, histamina presentes en la planta.

Existen al menos 16 ensayos clínicos conocidos sobre la administración intravenosa de preparaciones crudas o purificadas (Iscador[®], Plenosol[®], Isorel[®], Eurixor[®]) para tratar diferentes formas de cáncer con resultados alentadores en hiperqueratosis maligna, carcinoma genital, cervical, de vejiga y de pecho, así como metástasis a huesos y pulmones. (1, 4)

Únicamente Ertürk y colaboradores han realizado estudios sobre la actividad antimicrobiana de la especie *V. album*, efectiva contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Entorobacter cloacae* y *Proteus vulgaris*, con extractos de diferentes grados de concentración. (10, 14, 26)

La actividad farmacológica experimental del muérdago (*V. album*) demuestra que la tintura de hojas es activa contra *Candida albicans* y *S. aureus*, pero inactiva contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella flexneri* y *typhi*. Los extractos acuosos y etanólicos no tienen actividad antiherpética. (4)

En Guatemala, el estudio de los muérdagos es relativamente reciente. Actualmente están representados por 54 especies, de las cuales 21 pertenecen a la familia Loranthaceae *sensu strictu*, 32 especies a la familia Viscaceae y una especie a la familia Eremolepidaceae. Se conocen cuatro especies endémicas para Guatemala pertenecientes a la familia Loranthaceae s.s. (22, 23, 27)

Para esta investigación se seleccionaron 4 especies de plantas conocidas popularmente como muérdagos, 3 de estas especies, *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus* y *S. orbicularis* provienen de la Ecoparcela “El Cacaotal”, Cantón Chiguaxté del municipio de Samayac, departamento de Suchitepéquez, ubicado en la costa sur de Guatemala; la cuarta especie, *S. marginatus*, fue colectada en el centro de la ciudad capital.

Estas especies fueron escogidas por su abundancia favorecida por el clima cálido y templado respectivamente; y por otro lado, por los diversos usos medicinales que le da la población.

No se encontró ningún estudio sobre la actividad biocida de las especies del muérdago que se seleccionaron para éste estudio en las diferentes fuentes y bases de datos consultadas.

4. JUSTIFICACIÓN

La población guatemalteca ha utilizado las plantas medicinales desde la antigüedad con el propósito de aliviar diversas afecciones. Actualmente el uso de la medicina natural ha resurgido y tomado auge para tener otras alternativas terapéuticas por lo que resulta de interés evaluar a través de estudios fitoquímicos y biológicos la actividad que se les atribuye a dichas plantas, para ofrecer a la población un tratamiento accesible para las enfermedades infecciosas que la aquejan.

En el caso de las especies de muérdagos que se localizan en Guatemala, al igual que las especies europeas, se ha documentado su uso oral o tópico para una amplia variedad de enfermedades que en algunos casos indican algunas propiedades medicinales tal como el *V. album* que tienen la reputación de reducir la presión sanguínea y su actividad citotóxica.

El estudio sobre las propiedades biocidas de cuatro especies de muérdago se inscribe dentro de la reciente tendencia de la farmacología a validar científicamente las propiedades medicinales de las especies que la medicina popular o tradicional le atribuye a ciertas plantas.

Esa tendencia de la farmacología en general y de este estudio en particular, se justifica, por un lado, por el uso extendido en la población de escasos recursos (que no tiene acceso al sistema oficial de salud) del muérdago, en cualquiera de sus variedades locales, para el tratamiento de ciertas enfermedades y dolencias, y por el otro, porque a la fecha no existe ninguna investigación que compruebe científicamente esas supuestas propiedades medicinales, específicamente la biocidas en las especies de muérdagos seleccionadas para este estudio.

La comprobación en el laboratorio de las propiedades biocidas de las especies seleccionadas para este estudio sería una importante contribución para justificar su uso efectivo para combatir infecciones causadas por microorganismos, ya que por ser un país con una biodiversidad de plantas aun se desconoce el potencial que pueden tener las especies nativas para beneficio de la población.

5. OBJETIVOS

General

Contribuir al estudio de las plantas para dar alternativas terapéuticas en enfermedades infecciosas para fortalecer el acervo de la medicina tradicional guatemalteca con el respaldo de una investigación de laboratorio que valide científicamente las propiedades biocidas del muérdago.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Elaborar extractos etanólicos por percolación, concentración y recuperación del disolvente.
- 5.2.2 Evaluar la actividad biocida del extracto etanólico de cuatro especies de muérdago *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus*, *S. orbicularis*.
- 5.2.3 Caracterizar los extractos etanólicos de cuatro especies de muérdago mediante pruebas macro, semi micro y CCF.

6. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los cuatro extractos etanólicos de las especies de muérdago estudiadas posee actividad biocida.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de trabajo

7.1.1 Población: Cuatro especies de muerdagos conocidas popularmente como Ligas o Matapalos.

7.1.2 Tratamiento: Extractos etanólicos de *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus* *S. orbicularis*

7.2 Recursos

7.2.1 Humanos

7.2.1.1 Investigador

Br. Boris Leonel Juárez Ríos

7.2.1.2. Asesor

Lic. Armando Cáceres

7.2.1.3. Colaboradora

Licda. Isabel Gaitán

7.2.2 Institucionales

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Biblioteca de la Facultad de Agronomía, Herbario BIGUA. Laboratorio de Productos Naturales Farmaya S.A.

7.2.3 Materiales y equipo para ensayos microbiológicos

- Autoclave
- Cajas de Petri descartables
- Cajas de Petri cuadrilate
- Tubos de ensayo con tapón rosca
- Campana de flujo laminar
- Incubadora
- Balanza analítica
- Material de laboratorio en general

7.2.4 Materiales y equipo para tamizaje fitoquímico

- Material vegetal seco perfectamente identificado (< 10% de humedad), molido o picado
- Evaporador rotatorio
- Bomba de vacío
- Percolador
- Vasos de precipitar
- Erlenmeyer
- Desecadora
- Cristalería y material de laboratorio en general
- Balanza analítica

7.2.5 Medios de cultivo

- Agar Mueller Hinton
- Caldo Tripticasa soya
- Agar Sabauraud

7.2.6 Microorganismos

Bacterias

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Salmonella typhi* ATCC 14028
- *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
- *Bacillus subtilis* ATCC 6051
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Levaduras

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264

Hongos

- *Aspergillus niger* ATCC 9029
- *Aspergillus flavus* ATCC 26934
- *Aspergillus fumigatus* A3

- *Trichophyton rubrum* C 11320
- *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972
- *Microsporium gypseum* C1152000

Larvas

- *Aedes aegypti*
- *Anopheles albimanus*

Nauplios

- *Artemia salina*

7. 2. 7 Reactivos

- Ácido acético
- Ácido bórico
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Acetato de etilo
- Etanol
- Éter
- Éter de petróleo
- Benceno
- Diclorometano
- Metanol
- Tolueno
- Anhídrido acético
- Cloruro férrico
- Hidróxido de amonio
- Magnesio metálico
- Nitroprusiato de sodio
- Permanganato de potasio
- Sulfato de sodio anhidro
- Anisaldehído
- Vainillina
- Reactivo de Mayer

- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG)
- Reactivo de Kedde
- Reactivo de Keller-Killiani
- Reactivo de Liebermann-Burchard
- Reactivo de Komarowsky

7.3 Procedimiento

7.3.1 Obtención de los extractos:

7.3.1.1 Preparación de la materia vegetal seca.

Se obtuvo la planta a estudiar, se le identificó debidamente, se secó y molió.

Se rotuló la planta molida con nombre, fecha y parte utilizada.

Se pesó 400 g de hojas de las plantas a estudiar.

7.3.1.2 Extracción por percolación:

- Se colocó en la punta del percolador un pedazo de algodón no muy grande, de manera que sirviera de filtro. Se cortó un pedazo de papel filtro de forma circular y se colocó cubriendo el fondo del percolador.
- Se tapó la punta del percolador con un tapón plástico.
- Se agregó la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y se cubrió con etanol al 70%.
- Se chequeó que no quedaran burbujas
- Se agregó el resto de material vegetal seco y se cubrió nuevamente con etanol al 70%, y se repitió el paso anterior.
- Se rotuló el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha y peso. Se dejó reposar por 24 horas para que reaccionara.
- Se retiró el tapón plástico y se dejó gotear hasta que saliera todo el disolvente.
- Se agregó el disolvente recuperado a la materia en extracción en el percolador; y se repitió esta operación cinco veces antes de comenzar a concentrar en rotavapor.
- Se pasó el disolvente recogido al balón del rotavapor para concentrar.

7.3.1.3 Concentración en rotavapor

- Encendió el baño María y se llevó la temperatura a $40 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Se engrasaron todas las bocas esmeriladas y se armó el rotavapor según el instructivo específico.
- Se succionó la solución obtenida del percolador (tintura).
- Se conectó la bomba de vacío y el rotador y se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevarlo 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 15 días.
- Se pasó a viales debidamente tarados y rotulados cuando el extracto tuvo consistencia sólida.
- Se calculó el rendimiento del extracto y se guardó en viales o recipientes herméticos a 4°C .

7.3.2 Tamizaje de la actividad antimicrobiana *in vitro*

7.3.2.1 Preparación del agar-planta

- Se prepararon tubos con 9.0 mL Mueller Hinton.
- Se esterizaron y dejaron enfriar a 50°C y se agregó 1 mL de la solución del extracto disuelto, concentrado a 10 mg/mL. La concentración final que se obtuvo fue de 1 mg/mL.
- Se agitó y se vertió en cajas de Petri estériles, y se dejó solidificar e incubó a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Se guardó en refrigeración hasta el momento de usar.

7.3.2.2 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 Trypticase Soya, se incubó 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 sembró en cajas de Petri según la planta utilizada.

7.3.2.3 Demostración de la actividad antibacteriana

- Se inoculó en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Se hizo cuatro repeticiones por microorganismo. Se dejó reposar durante 10 minutos y se incubó a 36°C por 24 horas.
- Se utilizaron como control negativo 9 mL de Agar Mueller Hinton mezclado con 1 mL de etanol al 50 %.

7.3.2.4 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.

7.3.2.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

- Se prepararon cajas cuadruplicate 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 inocularon tres estrías en cada uno de los cuadrantes y se incubaron a 36°C por 24 horas.

Realizar la lectura e interpretar:

- 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.

7.3.3 Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

7.3.3.1 Preparación de medio de cultivo para hongos levaduriformes

- Se preparó tubos con 9.0 mL de Agar Mueller Hinton.

- Se esterilizaron, y dejaron enfriar a 50°C se agregó 1.0 mL del extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Se agitó. La concentración final que se obtuvo es de 1 mg/mL.
- Se vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar y se incubó a 36°C durante 24 horas para comprobar su esterilidad.
- Se Guardó en refrigeración hasta el momento de su uso.

7.3.3.2 Inoculación de levaduras en placa

- Se prepararon cajas con agar – planta.
- Se inoculó con asa la suspensión de levaduras en cada sección según la plantilla.
- Se incubó a 36°C durante 48 horas.
- Para el control negativo, se sembró por estrías la levadura en una caja con Agar Sabouraud.

7.3.3.3 Lectura e interpretación de resultados

- Se observó el crecimiento de la levadura en el medio
- Crecimiento positivo = no actividad.
- Crecimiento negativo = inhibición o actividad antilevadura.
- Para evaluar la concentración inhibitoria mínima (CIM), se repitió la prueba con cantidades decrecientes del extracto vegetal (1:10, 1:50 y 1: 100).

7.3.4 Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

7.3.4.1 Preparación de medio de cultivo

- Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud.
- Se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C, y se dejaron enfriar a 50°C y se agregó 1.5 mL del extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Se agitó. La concentración final que se obtuvo es de 1 mg/mL.
- Se vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar y se incubó a 36°C durante 24 horas para verificar esterilidad.
- Se guardó en refrigeradora hasta el momento de su uso.

7.3.4.2 Preparación de inóculo

- Se preparó medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

Dextrosa	0.6 g
NaSO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Peptona	0.3 g
Agar-agar	6.0 g

- Se agregó a 300 mL de agua, se disolvió, y se vertió 6 mL en los tubos con tapón de rosca, esterilizados en autoclave y se dejó solidificar con el mayor declive posible. Se incubaron durante 48 horas a 25°C para descartar contaminación.
- Se sembraron en este medio los hongos a ensayar y se incubaron a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo.
- Se agregó a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y se desprendió el hongo con ayuda de una varilla.
- Se trasvasó el material a viales con tapa rosca. Se agitó 1 minuto en el agitador y se hizo un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- Se llevó la suspensión a 100 esporas/ μL = 1×10^5 esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y se almacenó en viales estériles en refrigeración.

7.3.4.3 Inoculación de hongos filamentosos en placa

- Se abrieron cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Dirham de 5 mm de diámetro en forma equidistante.
- Se tomaron 30 μL de la suspensión de esporas y se depositaron en el agujero. Se incubaron a 27°C por 14 días.
- Se hizo un total de 4 repeticiones en la misma forma, se usó una caja con agar Sabouraud como control negativo.

7.3.4.4 Lectura e interpretación de resultados

- Se midió el crecimiento de la colonia del hongo.
- Se tomaron como positivos los extractos que tuvieron crecimiento de la colonia.

7.3.5 Tamizaje de la actividad larvicida

7.3.5.1 Se cultivaron larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*

- Se colocaron en un vaso de precipitar con 200 mL del agua del chorro y se dejaron reposar por 48 horas.
- Se agregaron 40 mg de huevecillos de *A. aegypti* y *A. albimanus*
- Se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente.

7.3.5.2 Determinación de la actividad larvicida.

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

7.3.5.3 Interpretación:

La prueba de tamizaje es positiva si todas las larvas están muertas. Si el porcentaje de larvas muertas es del 100 % calcular la CL₁₀₀, para ello se repite la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg/mL.

7.3.6 Citotoxicidad con *A. salina*

7.3.6.1 Preparación del agua de mar

- Se disolvieron 35 g de sal de mar en un L 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 usar, es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

7.3.6.2 Cultivo de *A. salina*

- Se colocaron en un vaso de precipitar 200 mL de agua de mar y se aireó por una hora.

- Se colocó el agua en la pecera y se agregaron 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).
- Se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar los nauplios (larvas) se pasaron al área abierta de la pecera (lado con luz).

7.3.6.3 Determinación de la citotoxicidad

- Se pesó 0.004 g del extracto a ensayar y se disolvió con 2 mL de agua de mar. Se agregó por triplicado en una microplaca 100 μ L del extracto disuelto + 100 μ L de agua de mar con 10-15 nauplios.
- El control negativo: 100 μ L de agua de mar con 10-15 nauplios.
- Se incubaron a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.
- Se contaron en el estereoscopio el número de nauplios muertos. Se agregó metanol a los pozos, se esperaron 15 minutos y se contaron de nuevo todos los nauplios. Si se observaron nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

7.3.6.4 Interpretación

- Calcular el porcentaje de camarones muertos:
 - Se sumó el número de camarones muertos en los tres pozos (X)
 - Se sumó el número total de camarones en los tres pozos (Y)
 - Se dividió X dentro de Y y se multiplicaron por 100
- Si el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50 %, repetir la prueba utilizando concentraciones de 1, 0.5 y 0.25 mg/mL. Obtener los valores de X y Y en cada dosis y determinar el valor de DL_{50} con el programa de computadora Finney (DOS).
- Si el porcentaje es menor del 50 % la citotoxicidad es mayor de 1mg/mL.

7.4 Tamizaje fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro:

Se realizaron ensayos macro y semimicro en los que se evaluó la formación de precipitados y complejos coloreados. Se utilizaron técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) convencionales para la caracterización fitoquímica.

7.4.1 Investigación de alcaloides:

7.4.1.1 Ensayos macro y semimicro: Se pesó 1 g de material vegetal. Se agregaron 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 % (p/v), luego se añadieron 25 mL de metanol a 60°C. Se filtró con papel Whatman No. 1 y se acidificó el filtrado con ácido clorhídrico 2N. La solución resultante se dividió en 4 tubos y se evaluó de la siguiente manera:

- Tubo 1: Agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's.
- Tubo 2: Agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff.
- Tubo 3: Agregar 5 gotas del reactivo de Wagner.
- Tubo 4: Testigo.

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

7.4.1.2 Cromatografía en capa fina: se pesó 1 g de material vegetal seco y molido, se agregó 1 mL de hidróxido de amonio al 10 % (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. Se aplicó en una placa de silica gel 60F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 % 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. Zonas cafés o naranjas en vis, los colores no son estables.

7.4.2 Investigación de flavonoides y antocianinas:

7.4.2.1 Ensayos macro y semimicro: Se extrajeron 3 g de material vegetal pulverizado con 10ml de etanol o metanol al 80 %, se filtró y concentró. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se trituró el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción fuese incolora. Se disolvió el residuo en 30 mL de metanol al 80 %, y se filtró y dividió en 5 tubos:

- Tubo 1: Se agregó 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Tubo 2: Se agregó 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 % (p/v).
- Tubo 3: Se agregó 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y se calentó 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 evaluaron reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

7.4.2.2 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 Filtró la solución y se aplico sobre las cromatoplas de silicagel 60F₂₅₄. Como estándar se empleó solución de flavonoides al 0,05 % en metanol (10µl).

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).

Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

Solución 1: Solución metanólica al 1 % de difenilboriloxietilamina (NP).

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

7.4.3 Investigación de antraquinonas:

7.4.3.1 Prueba de Borntrager: Se extrajeron 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80 %, se filtraron y se concentraron en baño María (60°C). Se disolvió el residuo con 30 mL de agua destilada y se filtró. Se extrajeron con 10 mL de benceno. A la fase bencénica se añadió 5 mL de solución de prueba de amonio y se agitó. Se observaron cambios de color en la fase alcalina (color rojo y rosado: positivo).

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

7.4.3.3 Cromatografía en capa fina: Se extrajeron 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño María (60°C) por 5 minutos. Se filtró y se aplicaron 10 µL en la cromatoplasca de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: Solución al 0.1 % en metanol de antraquinonas (10 µL).

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13).

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

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

Antronas y antralonas: Zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365nm.

7.4.4 Investigación de cumarinas:

7.4.4.1 Ensayos macro y semimicro: Se midieron 5 mL de extracto vegetal metanólico. Se agregó 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar se aplicaron 2 manchas en papel filtro. A una mancha se le agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5 N. Se observaron bajo la luz UV a 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

7.4.4.2 Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal se adicionaron 10 mL de metanol y se calentaron 30 minutos en baño María. Se filtró y se evaporó hasta 1 mL. Se aplicaron 20 µL en una cromatoplaqueta de silicagel 60 f_{254} . Se utilizaron como estándar canela en metanol al 1 %. Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

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

7.4.5 Investigación de cardenólidos y bufadienólicos:

7.4.5.1 Presencia de lactonas insaturadas: Se extrajeron 10 g de material vegetal con 30 mL de etanol al 80 % y se filtraron. Se colocaron tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 mL) sobre un papel filtro. Se secaron y se agregaron unas gotas del reactivo de Kedde. Se secó el papel filtro y se observó cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Se usó como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 %.

7.4.5.2 Presencia de azúcares 2-desoxigenadas: Se evaporaron 10 mL del extracto etanólico o metanólico, se eliminaron los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Se secó el residuo y se agregaron 3mL de reactivo de Kéller-Killiani. Se pasó a un tubo, se mezcló y se resbaló de 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. Se observó la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo).

7.4.5.3 Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal se agregaron 20 mL de etanol al 50 % y se mantuvieron en reflujo durante 15 minutos. Se dejaron enfriar y se

filtraron, el filtrado se trató con ácido acético glacial. Se extrajeron en 3 porciones de 15 mL de diclorometano. Los extractos se filtraron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron. Se disolvieron con 1 mL de diclorometano/etanol (1:1) y se aplicaron 30-50 μL en la cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄. Estándar digoxina 5 mg/2mL de metanol (20 μL).

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

7.4.6 Investigación de saponinas:

7.4.6.1 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 (60°C) durante 30 minutos. Se dejaron enfriar y se taparon los tubos, se agitaron vigorosamente por 30 a 40 segundos. Se dejaron reposar los tubos durante 30 minutos. Se observó la formación de una capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

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

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

Detección:

Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

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

Reactivo de Komarowsky: Zonas azules, amarillas y rojas.

Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: Zonas azules, violetas, amarillentas

7.4.7 Investigación de principios amargos:

7.4.7.1 Cromatografía en capa fina: Se calentó 1 g de material vegetal con 10 mL de metanol en baño de María a 60°C por 10 minutos. Se evaporó y se filtró a 2 mL. Se aplicó en la cromatoplaca. Estándar: artemisina al 1 % en metanol (20 µL).

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

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

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

7.4.8 Investigación de taninos:

7.4.8.1 Ensayos macro y semimicro: Se extrajeron 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 %, se filtró y evaporó a sequedad. Se añadió 25 mL de agua caliente al residuo y se agitó con una varilla y se dejó enfriar. Se agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10 % y se filtró. Se adicionaron 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: Testigo.
- Tubo 2: Se agregaron 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 % (p/v).
- Tubo 3: Se agregaron a 5 gotas de gelatina-sal (1 % de gelatina y cloruro de sodio al 10 %).
- Tubo 4: Se agregaron 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 % (p/v).

Se observó la formación de precipitado y/o cambio de coloración.

Con cloruro férrico: Grisáceo-negro: Catecol, negro-azulado: Irogalol.

7.4.9 Investigación de glicósidos cianogénicos:

7.4.9.1 Prueba de Guignard: Se colocó 2 a 5 g de material vegetal pulverizado en un Erlenmeyer de 125 mL y se humedeció con agua, y se adicionó 1 mL de cloroformo. Aparte, se introdujo una tira de papel Whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente se dejó secar: La tira de papel húmedo se insertó en el Erlenmeyer que contenía el material vegetal y se evitó que tocara las paredes y se dejó a una distancia de 1 cm de la muestra. Se dobló el papel y se tapó el Erlenmeyer con un corcho. Se calentó en baño María a 37°C durante 3 horas o más. Se observó cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo- café).

7.4.10 Investigación de aceites volátiles:

7.4.10.1 Cromatografía en capa fina:

Método A: Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano se agitó por 15 minutos. Se filtró y evaporó en baño María (60°C) a sequedad.

Se disolvió en 1 mL de tolueno y se aplicó 20-50 µL en una cromatoplaça de silicagel 60F₂₅₄.

Método B: Se pesó 10-50 g de material vegetal y se destiló con arrastre de vapor por 1 hora. Se recolectó el aceite esencial en xileno. Se diluyó la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y se aplicaron 5 µL (1:10) en la cromatoplaça de silicagel 60F₂₅₄.

Estándar: Solución de tolueno 1:30 de metanol, timol, eugenol y linalool (3 µL).

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

Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina-ácido sulfúrico. Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

7.5 Diseño de la investigación:

7.5.1 Diseño de investigación

Se realizó un estudio para determinar la actividad biocida (antimicrobiana, larvicida y citotóxica) de los extractos etanólicos de las hojas de *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus* y *S. orbicularis*.

7.5.2 Actividad antimicrobiana

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

El análisis de resultados se realizó por medio de la prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia $\alpha = 0.10$, nivel óptimo que será el criterio para concluir que el extracto tuvo efecto inhibitorio en las 4 réplicas.

7.5.3 Actividad larvicida

Se realizó un ensayo en la microplaca y se agregó por triplicado: 100 μ L del extracto disuelto a una concentración de 1 mg/mL de larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*, y se determinó 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 probática de los resultados con programa Finney. La prueba de tamizaje se consideró positiva si todas las larvas están muertas, es decir, si el porcentaje de larvas muertas es del 100 por ciento. Para calcular la CL_{100} , se repitió la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg/mL.

7.5.4 Actividad citotóxica

Se realizó un ensayo contra *A. salina*. Se agregó por triplicado en una microplaca 100 μ L del extracto, se disolvió a una concentración de 1 mg/mL, se determinó el número de nauplios muertos (sobre un número inicial conocido).

Si el porcentaje de nauplios muertos es mayor del 50 por ciento, repetir la prueba utilizando de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL. Para determinar el valor de CL_{50} se utilizó el programa de computadora Finney (DOS). Si el porcentaje es menor al 50 por ciento, se indicó que la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL.

7.5.5 Tamizaje fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro

La determinación de alcaloides, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, cardenolidos, bufadienólidos, principios amargos, taninos, glicósidos cianogénicos y aceites volátiles se realizó por medición de cromatografía en capa fina (CCF) en las cuales se determina el R_f , y ensayos macro y semimicro de reacciones de coloración y precipitación, y se utilizó estadística descriptiva.

8. RESULTADOS

8.1 Descripción y rendimiento de las plantas en estudio

En la tabla No. 1 se observan la descripción de las especies utilizadas en el estudio, familia, parte de la planta utilizada, lugar de procedencia y el porcentaje de rendimiento de cada planta.

Tabla 1. Descripción de las plantas del estudio

Planta	Familia	Parte	Procedencia	% de rendimiento
<i>Struthanthus orbicularis</i>	<i>Loranthaceae</i>	Hojas	Ciudad de Guatemala (Zona 3)	13.11
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	<i>Loranthaceae</i>	Hojas	Ecoparcela “El Cacaotal”, Cantón Chiguaxté, Samayac, Suchitepéquez	8.50
<i>Struthanthus marginatus</i>	<i>Loranthaceae</i>	Hojas	Ecoparcela “El Cacaotal”, Cantón Chiguaxté, Samayac, Suchitepéquez	12.56
<i>Phoradendron robustissimum</i>	<i>Viscaceae</i>	Hojas	Ecoparcela “El Cacaotal”, Cantón Chiguaxté, Samayac, Suchitepéquez	7.72

8.2 Tamizaje de la actividad antimicrobiana

Se realizó la actividad antibacteriana de los extractos del estudio contra bacterias Gram positivo (*S. aureus* y *B. subtilis*), bacteria Gram negativo (*S. typhi*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) y la micobacteria (*M. smegmatis*). Cuando el crecimiento del microorganismo fue inhibido se consideró que el extracto tenía actividad positiva (+) y cuando existió crecimiento se consideró que el extracto tenía actividad negativa (-). (Tabla 2)

Tabla 2. Tamizaje de la actividad antibacteriana a una concentración 1mg/mL de los extractos etanólicos

Extracto etanólico de hojas	Bacterias					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Struthanthus orbicularis</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Struthanthus marginatus</i>	+	-	+	+	+	-
<i>Phoradendron robustissimum</i>	-	-	+	+	-	-

(+) Inhibición del crecimiento bacteriano

(-) Crecimiento bacteriano

8.3 Tamizaje de la actividad antifúngica

En las siguiente tabla se muestra los resultados de la actividad antifúngica de los extractos del estudio contra hongos levaduriformes (*C. albicans* y *C. neoformans*). Cuando se inhibió el crecimiento de un microorganismo, se consideró que el extracto tenía actividad positiva y cuando existió crecimiento se consideró que el extracto tenía actividad negativa. (Tabla 3)

Tabla 3. Tamizaje de la actividad antifúngica a una concentración 1mg/mL de los extractos etanólicos

Extracto etanólico de hojas	Hongos levaduriformes	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Struthanthus orbicularis</i>	-	+
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	-	-
<i>Struthanthus marginatus</i>	-	-
<i>Phoradendron robustissimum</i>	-	-

(+) Inhibición del crecimiento bacteriano

(-) Crecimiento bacteriano

8.4 Tamizaje de la actividad antifúngica

En las siguiente tabla se muestra los resultados de la actividad antifúngica de los extractos en estudio de los hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*). Cuando un microorganismo fue inhibido en su crecimiento, se consideró que el extracto tenía actividad positiva (+) y cuando existió crecimiento se consideró que el extracto tenía actividad negativa (-). (Tabla 4)

Tabla 4. Tamizaje de la actividad antifúngica a una concentración 1 mg/mL de los extractos etanólicos

Extracto etanólico de hojas	Hongos filamentosos					
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Microsporium gypseum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Struthanthus orbicularis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Struthanthus marginatus</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Phoradendron robustissimum</i>	-	-	-	-	-	-

(+) Inhibición del crecimiento bacteriano

(-) Crecimiento bacteriano

8.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Esta determinación se realizó con los extractos que presentaron actividad positiva en la fase de tamizaje. (Tabla 5)

Tabla 5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (mg/mL) de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos etanólicos

Extracto etanólico de hojas	Organismos ensayados					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Microsporium gypseum</i>
<i>Struthanthus orbicularis</i>	> 1mg/mL	> 1mg/mL	1 mg/mL	> 1mg/mL	0.5 mg/mL	> 1mg/mL
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	> 1mg/mL	1 mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL
<i>Struthanthus marginatus</i>	0.5 mg/mL	0.5 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	> 1mg/mL	1 mg/mL
<i>Phoradendron robustissimum</i>	> 1mg/mL	1mg/mL	1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL	> 1mg/mL

8.6 Determinación de la actividad larvicida

Esta prueba se realizó con los extractos etanólicos de las plantas en estudio contra larvas de los mosquitos *A. aegypti* y *A. albimanus* de los 4 estadios de vida, mediante un ensayo en placa y por triplicado. Se considero actividad positiva si el extracto en estudio provocaba la muerte del 100% de las larvas presentes en los pozos de la placa. Se estableció que la Concentración Letal (CL₁₀₀) en todos los extractos es mayor de 1 mg/ml. (Tabla 6)

Tabla 6. Actividad larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus* de los extractos en estudio en 1mg/mL

Extracto / Estadio larva	<i>Aedes aegypti</i>				<i>Anopheles albimanus</i>			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
<i>Struthanthus orbicularis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Struthanthus marginatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phoradendron robustissimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) no se observó muerte en el 100% de las larvas (+) muerte del 100 % de las larvas

8.7 Determinación de la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*

En la tabla 7 se muestra los resultados de la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de las plantas en estudio contra nauplios de *A. salina* de 48 horas de vida. En la fase de tamizaje se consideró que un extracto presentaba actividad positiva si era capaz de matar a más del 50 por ciento de los nauplios contra los que se evaluó. Este procedimiento se realizó por triplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los tres pozos de la prueba, si el porcentaje es menor del 50 % la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL.

Tabla 7. Determinación de la actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina* de los extractos de las plantas en estudio 1 mg/mL

Extracto etanólico de hojas	% de nauplios de <i>A. salina</i>	Actividad	citotoxicidad
<i>Struthanthus orbicularis</i>	42.1 %	-	> de 1 mg/mL
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	0 %	-	> de 1 mg/mL
<i>Struthanthus marginatus</i>	11.4 %	-	> de 1 mg/mL
<i>Phoradendron robustissimum</i>	3 %	-	> de 1 mg/mL

(+) > 50 % de nauplios de *A. salina* muertos.

(-) < 50 % de nauplios de *A. salina* muertos.

8.8 Tamizaje Fitoquímico

A través de los ensayos macro y semimicro y la técnica de cromatografía en capa fina se identificaron los metabolitos secundarios presentes en las hojas de los extractos etanólicos de las plantas en estudio (*Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus*, *S. orbicularis*) así como también las diferentes fases móviles, estándares y métodos de detección que se utilizaron (Tablas 8 a 17).

Tabla 8. Alcaloides

Extracto etanólico de hojas	Mayer		Dragendorff		Wagner		CCF	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Precipitación	+	Turbidez	+	Precipitación	+	Zonas color naranja (VIS)	Ausente
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		+		+		+		Naranja, Rf: 0.59
<i>Struthanthus marginatus</i>		+		+		-		Naranja, Rf: 0.81
<i>Phoradendron robustissimum</i>		+		+		+		Ausente

CCF: Revelador: Dragendorff. Fase móvil: Tolueno - acetato de etilo - dietilamina (14: 4: 2). Estándares: Atropina (Rf: 0.30), papaverina (Rf: 0.51) y reserpina (Rf: 0.37); color naranja en visible.

Tabla 9. Flavonoides y Antocianinas

Extracto etanólico de hojas	H ₂ SO ₄ conc.		FeCl ₃ (10%)	HCl conc.	Mg metálico + HCl conc.	CCF	
	Reacción	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	cambios de color y/o formación de precipitado	+ Precipitado verde	-	+ Precipitado verde claro	+ Cambio de color verde claro	Fluorescencia intensa bajo UV a 365 nm.	Verde, Rf: 0.70 Naranja, Rf: 0.82
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		+ Precipitado verde	+ Cambio de color amarillo claro	+ Precipitado verde cremoso	+ Cambio de color verde claro		Ausente
<i>Struthanthus marginatus</i>		+ Precipitado Café obscuro	+ Cambio de color verde claro	+ Precipitado naranja cremoso	+ Cambio de color verde claro		Azul, Rf: 0.13 Naranja, Rf: 0.70 Amarillo, Rf: 0.74 Naranja, Rf: 0.80 Verde, Rf: 0.88
<i>Phoradendron robustissimum</i>		+ Precipitado verde	-	+ Precipitado verde claro	+ Cambio de color verde claro		Verde, Rf: 0.55

CCF: Revelador: NP/PEG. Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial- agua (20:2.2:2.2:5.4). Estándares: Quercetina, color amarillo (Rf: 0.70); Hiperósido, color naranja (Rf: 0.84); Rutina, color naranja (Rf: 0.80); Ácido clorogénico, verde (Rf: 0.73. 086); todos bajo luz UV a 365 nm.

Tabla 10. Antraquinonas

Extracto etanólico de hojas	Prueba de Börntrager		Prueba de Börntrager modificado	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Coloración rojo, rosado	-	Coloración rojo, rosado	-
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		-		-
<i>Struthanthus marginatus</i>		-		-
<i>Phoradendron robustissimum</i>		-		-

Tabla 11. Cumarinas

Extracto etanólico de hojas	hidróxido de potasio 0.5 N		CCF	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Coloración verde o azul bajo luz UV a 365 nm.	(verde)+	Fluorescencia azul o verde bajo luz UV 365 nm.	Azul Oscuro, Rf: 0.14 (-)
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		(azul)+		Azul oscuro Rf: 0.14 (-) Azul Fluorescente, Rf: 0.31 (+)
<i>Struthanthus marginatus</i>		(Azul)+		Azul Oscuro, Rf: 0.14 (-)
<i>Phoradendron robustissimum</i>		(Verde)+		Ausencia

CCF: Revelador: Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 %. Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7). Estándar: cumarinas; fluorescencia azul (Rf: 0.40)); todos bajo luz UV a 365 nm.

Tabla 12. Cardenólidos y bufadienólicos

Extracto etanólico de hojas	Presencia de lactonas insaturadas		Presencia de azúcares 2-desoxigenados	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	mancha o anillo púrpura: positivo	-	anillo púrpura: positivo	-
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		-		-
<i>Struthanthus marginatus</i>		-		-
<i>Phoradendron robustissimum</i>		-		-

Tabla 13. Saponinas

Extracto etanólico de hojas	Tes de espuma		CCF	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Formación de espuma	+	Zonas azules, violetas, amarillentas UV 365 nm.	Verde, Rf: 0.30 (-) Azul, Rf: 0.45 Violeta, Rf: 0.78
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		+		Amarillo, Rf: 0.16 Amarillo, Rf: 0.78
<i>Struthanthus marginatus</i>		+		Azul, Rf: 0.35 Azul, Rf: 0.46 Verde, Rf: 0.52 (-) Azul, Rf: 0.64
<i>Phoradendron robustissimum</i>		+		Azul, Rf: 0.20 Verde, Rf: 0.38 (-) Verde, Rf: 0.40 (-) Amarillo, Rf: 0.59

CCF: Revelador: Vainillina- ácido sulfúrico Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40). Estándares: Solución de saponinas al 0.1 %, color amarillo (Rf: 0.40)

Tabla 14. Principios amargos

Extracto etanólico de hojas	CCF	
	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Zonas rojas – violetas, Cafés – rojas, azules- verdes en visible.	Azul-verde, Rf: 0.34 Café, Rf: 0.66 Azul, Rf: 0.78
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		Rojo-violeta, Rf: 0.78
<i>Struthanthus marginatus</i>		Café, Rf: 0.18 Verde, Rf: 0.40 Café- rojo, Rf: 0.50 Verde, Rf: 0.60 Café, Rf: 0.66 Rojo-violeta, Rf: 0.78
<i>Phoradendron robustissimum</i>		Café, Rf: 0.66 Rojo-violeta, Rf: 0.78

Revelador: Vainillina / ácido sulfúrico al 5 %. Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) Estándares: *Neurolena lobata*, color café (Rf: 0.18), Rojo-violeta (Rf: 0.78)

Tabla 15. Taninos

Extracto etanólico de hojas	Gelatina al 1 % p/v		Gelatina-sal		Cloruro férrico al 10%	
	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Presencia de precipitados o flóculos.	-	Presencia de precipitados o flóculos.	-	Pirogalol: Coloración negro azulado. Catecol: Coloración negro grisáceo.	Negro- azulado +
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		-		-		-
<i>Struthanthus marginatus</i>		-		-		Negro- azulado +
<i>Phoradendron robustissimum</i>		-		-		-

Tabla 16. Glicósidos cianogénicos

Extracto etanólico de hojas	Prueba de Guignard	
	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	color amarillo a rojo o rojo- café	-
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		-
<i>Struthanthus marginatus</i>		-
<i>Phoradendron robustissimum</i>		-

Tabla 17. Aceites volátiles

Extracto etanólico de hojas	CCF	
	Reacción	Resultado
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Zonas rojas, cafés, azules y verdes en visible.	Café Rf: 0.14
<i>Psittacanthus calyculatus</i>		Café Rf 0.14 Verde Rf: 0.21
<i>Struthanthus marginatus</i>		Café Rf 0.14 Rojo Rf 0.19
<i>Phoradendron robustissimum</i>		Rojo Rf 0.19

Revelador: Vainillina / ácido sulfúrico Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7). Estándares: Eugenol, color naranja (Rf: 0.23); linalool (Rf: 0.34), color azul; timol (Rf: 0.50), rojo; carvacol (Rf: 0.78), color azul-violeta.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La obtención de los extractos etanólicos de hojas de las especies de múerdago en estudio se realizó por medio del método de percolación, presentándose un rendimiento mayor de extracto de 13.11 % para *S. orbicularis*, un 12.56 % para *S. marginatus*, 8.50 % para *P. calyculatus*, 7.72 % para *Ph. robustissimum*, este resultado depende de factores tales como: la época de corte, el árbol o arbusto hospedero al cual parasitan, grado de humedad del material vegetal, proceso de secado, el sistema de cultivo y el método de extracción. Todos estos factores influyen en los porcentajes de rendimiento de la obtención de extractos de las especies en estudio.

El ensayo *in vitro* para evaluar la actividad biocida contra bacterias, hongos levaduriformes y hongos filamentosos en la fase de tamizaje utilizó microorganismos que representaran los principales géneros y especies de microorganismos patógenos al hombre. El ensayo determinó que las especies *S. orbicularis* presenta actividad positiva contra los microorganismos *B. subtilis* y *C. neoformans*, la especie *P. calyculatus* presenta actividad positiva contra el microorganismo *M. smegmatis*, la especie *S. marginatus* presenta actividad positiva contra los microorganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* y contra *M. gypseum* y la especie *Ph. Robustissimum* presenta actividad positiva contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*. Estas determinaciones tienen significancia estadística, ya que su valor P fue de 0.062.

A los extractos que presentaron actividad significativa en la fase de tamizaje se les determinó la (CIM) utilizando diferentes concentraciones de los extractos y enfrentándolos a los microorganismos en los que presentaron actividad positiva. Se determinó que la especie *S. orbicularis* tiene actividad contra *B. subtilis* a una concentración de 1mg/mL y *C. neoformans* a una concentración 0.5 mg/mL; *P. calyculatus* tiene una actividad biocida contra *M. smegmatis* a una concentración 1 mg/mL; *S. marginatus* tiene una actividad biocida contra *S. aureus*, *M. smegmatis*, *B. subtilis* a una concentración de 0.5 mg/mL *P. aeruginosa* y *M. gypseum* a una concentración de 1mg/mL; y la especie *Ph. robustissimum* tiene actividad a una concentración de 1mg/mL contra los microorganismos *B. subtilis* y *M. smegmatis*, por lo que se evidenció que los resultados antes presentados señalan y demuestran que estas

especies de muerdago posee efectividad para inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias Gram positivas, Gram negativas, micobacterias, hongos levaduriformes y hongos filamentosos, aunque a concentraciones relativamente altas.

Al evaluar la actividad citotóxica contra *A. salina* se determinó que los extractos de las plantas estudiadas no presentaban citotoxicidad, ya que el porcentaje de camarones muertos no fue mayor al 50 %, por lo que se considera que su DL_{50} es mayor de 1 mg/mL.

Los resultados de la evaluación larvicida de los extractos de las plantas estudiadas contra larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* mostraron que ninguno de los extractos evaluados posee actividad larvicida contra las dos especies de los mosquitos ensayados y sus diferentes estadios.

Los resultados se pueden comparar con los pocos estudios realizados en el muerdago europeo (*V. album*) el cual demuestra que las hojas de *V. album* es activa contra *S. aureus*, pero inactivo contra *E. coli* y *S. typhi*. (4, 9).

En el tamizaje fitoquímico se determinó que los extractos de la especie vegetal que demostraron bioactividad positiva presentaron metabolitos secundarios tales como: aceites volátiles, alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos y principios amargos. Estos metabolitos secundarios caracterizados por medio de CCF pueden ser los responsables de la actividad biológica, actividad biocida contra los microorganismos así como las propiedades farmacológicas atribuidas, como en el caso de los flavonoides que a menudo son antiinflamatorios, antiespasmódicos, citostáticos y antibacterianos, las cumarinas que presentan actividad antiinflamatoria, antiespasmódica, vasodilatador, ligero efecto hipnótico, sedante, anticoagulante (dicumarol). Los alcaloides son reconocidos por su actividad sobre el sistema nervioso central y su actividad citotóxica y anticancerígena.

A diferencia del muerdago Europeo (*V. album*), del cual se han documentado efectos cardiovasculares por presentar viscoflavina un glucósido cardiotónico, las especies locales objeto de esta investigación arrojaron resultados negativos, en el ensayo de glicósidos cianogénicos. (1, 4).

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El mayor porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos pertenece a la especie *S. orbicularis* (13.11 %), seguido en orden decreciente por *S. marginatus* (12.56 %), *P. calyculatus* (8.50 %) y *Ph. robustissimum* (7.72 %).
- 10.2 Los extractos etanólicos de las especies *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus* y *S. orbicularis* presentaron actividad biocida en la fase de tamizaje a una concentración de 1 mg/mL.
- 10.3 La CIM del extracto etanólico de la especie *S. orbicularis* fue para *B. subtilis* de 1mg/mL y 0.5 mg/mL para *C. neoformans*.
- 10.4 El extracto etanólico de *P. calyculatus* tiene actividad positiva contra *M. smegmatis* a una concentración 1 mg/mL.
- 10.5 EL extracto etanólico de la especie *S. marginatus* tiene actividad positiva contra los microorganismos *S. aureus*, *M. smegmatis* y *B. subtilis* a una concentración de 0.5 mg/mL y para *P. aeruginosa* y *M. gypseum* a una concentración de 1 mg/mL.
- 10.6 El extracto etanólico de la especie *Ph. robustissimum* tiene una CIM 1mg/ml contra los microorganismos *B. subtilis* y *M. smegmatis*.
- 10.7 Los extractos etanólicos de las especies *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus* y *S. orbicularis* no presentaron actividad citotóxica contra los nauplios de *A. salina*.
- 10.8 Los extractos etanólicos de las especies *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus* y *S. orbicularis* presentaron un DL₅₀ mayor a 1 mg/mL contra los nauplios de *A. salina*.

- 10.9 Los extractos etanólicos de las especies *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus* y *S. orbicularis* no presentaron actividad larvicida contra las larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*, a las dosis ensayadas.
- 10.10 Los metabolitos secundarios identificados en el extracto etanólico de la especie en estudio son: aceites volátiles, alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides y principios amargos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Hacer estudios con las diferentes especies de muérdagos de Guatemala ya que existen 54 especies, que incluyen 21 especies de la familia Loranthaceae, 32 especies de la familia Viscaceae y se conocen solo 4 especies endémicas.
- 11.2 Realizar estudios en las diferentes especies de muérdagos según el árbol o arbusto hospedero al que parasiten.
- 11.3 Evaluar la actividad farmacológica de los extractos etanólicos de las especies *Ph. robustissimum*, *P. calyculatus*, *S. marginatus* y *S. orbicularis* con el objetivo de validar las propiedades medicinales (inmunológica, antitumoral, cardiovascular, espasmolítica) que se le atribuyen popularmente.
- 11.4 Realizar estudios de actividad biológica con extractos obtenidos de otros órganos o partes de las plantas en estudio.
- 11.5 Continuar con estudios fitoquímicos para determinar los compuestos responsables de la actividad.

12. REFERENCIAS

- 1 Alonso, J. 2004. Tratado de fitofármacos y Nutracéuticos, 1° edición. Rosario, Argentina. Editorial Corpus libros. p.789-794
- 2 Anderson, JE, Gotees, CM & McLaughlin. 1991. A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2: 107-111.
- 3 Brancato, FP & Goldings NS. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Journal Mycol.* 45: 848-863.
- 4 Cáceres, A 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala p. 276-279
- 5 Cáceres, A. *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal Ethnopharmacol* 40: 207-213.
- 6 Cáceres, A. *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoan infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacol.* 62: 195-202.
- 7 CYTED. 1993. Manual de Técnica de Investigación. Bogotá, Proyecto X-1, s/p.
- 8 Chariandy, MC. *et al.* 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacol.* 64: 265-270.
- 9 Ertürk, Ö., Kati, H., Yayli, N. Demirbag. 2003. Antimicrobial Activity of *Viscum album* L. Subsp. *abietis*(Wiesb). *Turk Journal Biology.* 27(203): 255-258
- 10 Jaki, B. *et al.* 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine, shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology.* 37: 138-143.
- 11 Jiménez Navas, M. 2005. Determinación de la actividad biocida de cinco plantas del género *Acalypha*. Guatemala 19 P Tesis de Graduación. Universidad de San Carlos, Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química y Farmacia.
- 12 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 Science Application.* 4:377-381.

- 13 Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural Barcelona: Omega p.515
- 14 Mapenna, E., Ramírez, G., Díaz, L., Aguillón, K., Marín, H. 2003. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. 34(1): 25-27
- 15 Maradufu, A., Lubega R & Dorn, F. 1978. Isolation of (5-E)-ocinonea mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. Lloydia 41: 181-183.
- 16 Meyer BN, Ferrigni NR & Putnam JI. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. Planta medica 45: 31-34.
- 17 Michael A, Thompson CG & Abramovitz M. 1956. *Artemia salina* as a test organism bioassay. Science 123: 464.
- 18 Mishra, SK. *et al.* 1987. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. Journal Industry Microbial. 2: 267-276.
- 19 Mitscher L, *et al.* Antimicrobial agents higher plants. Introduction, rationale and methodology. Lloydia. 35. p. 157-166.
- 20 Mitscher, L.A., Darker, S. & Gollapudla, A. 1987. A modern look at folkloric use anti-infective agents. Journal National Production. 5: 1025-1041.
- 21 Mitscher *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. Lloydia 35: 157-166.
- 22 Pöll, E. 1984. Contribución al estudio de las Loranthaceae de Guatemala, Revista Científica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala 2(I): 22-32
- 23 Poll, E. Los muérdagos de Guatemala (Loranthaceae, Vicaceae u Eremolepidaceae): diversidad, distribución e importancia económica **in** Cano, E. 2006, Biodiversidad de Guatemala. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Vol. 1. 211-218
- 24 Sánchez, E., Maiti, RK. y Trujillo, B. 2004. Morpho-anatomical characters and secondary metabolites from *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae). ΦYTON Revista Internacional de Botánica Experimental. 2004: 119-121
- 25 Santa Cruz, L. Manual: Selección Fotoquímica, Guía práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. p. 92
- 26 Soberón, J.R. *et al.* 2006. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. Journal of Applied Microbiology. 2006(7): 1-12
- 27 Solis, P. N. *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). Planta Médica 59: 250-252.

- 28 Standley P, Steyermark J. Flora of Guatemala. Chicago, USA: Field Museum of Natural History, 1958. 4(4): 62
- 29 Thangam T & Kathiresan K. 1997. Mosquito larvicidal activity of mangrove plant extracts and synergistic activity of *Rhizophora apiculata* with pyrethrum against *Culex quinquefasciatus*. International Journal Pharmacology. 35: 69-71.
- 30 Wah Sam T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In. Colígate FM & Molineux RJ. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. Boca Raton, CRC Press
- 31 Wagner, H. *et al.* 1984. Plant Drug Analysis. Berlin- Heidelberg. Springer-Verlag. p. 269-270, 320
- 32 Ximénez, F. 1967. Historia natural del Reino de Guatemala. Compuesta por el Reverendo Padre Predicador General Fray Francisco Ximénez, de la Orden de Predicadores escrita en el pueblo de Sacapulas en el año 1722. Editorial José de Pineda Ibarra, Guatemala.

13. ANEXOS

Struthanthus orbicularis (HBK.) Blume



Clasificación Botánica

Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Santalales
Familia:	Loranthaceae
Genero:	<i>Struthanthus</i>
Especie:	<i>orbicularis</i>

Nombres comunes: Liga; Matapalo; Bejuco sacapalo; Liga de cortina; Liga cazadora.

Descripción botánica

Forma grandes masas colgantes, a veces cubriendo completamente el huésped.

Los tallos cilíndricos son delgados y emiten muchas raíces aéreas gruesas; con entrenudos de 4.5–5.5. cm de largo.

Las hojas gruesas, opuestas o casi opuestas, de color verde-amarillento, tienen forma orbicular u obovadas, de 4-7 cm de largo, con el ápice anchamente redondeado o mucronato; la base también es redondeada u obtusa; el nervio central muy marcado en el envés de la hoja.

Las inflorescencias racimosas son cortas de 3-7 cm de largo, con colores verdes-amarillento, de 4-6 mm de largo.

Los frutos ovalados, de 0.8-1.0 cm de largo. (22).

***Psittacanthus calyculatus* (DC.) G.Don**



Clasificación Botánica

Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Santalales
Familia:	Loranthaceae
Genero:	<i>Psittacanthus</i>
Especie:	<i>calyculatus</i>

Nombre común: Liga, Matapalo, Liga de jocote.

Descripción botánica

Arbusto rígido, erecto, con ramificaciones que nacen de una base común en forma de un disco el cual se fija en el huésped por medio de haustorios, causándole abultamiento en la rama atacada.

Las ramas son cilíndricas, pero las ramas jóvenes son aplanadas, provistas de 4 costillas, 2 de estas muy prominentes.

Las hojas de verde oscuro, coriáceas, con pecíolo muy corto y nervios basales; tienen forma oblonga o lanceolada-ovada, 4-0 cm de largo y de 2.3-4.5 cm d ancho, con ápice obtuso y base aguda o redondeada.

Las inflorescencias son espigas de 3-5 cm de largo, flores diminutas de color verde amarillento.

Los frutos de verde claro, suaves; globosos miden de 2-3 mm de diámetro. (22).

***Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume**



Clasificación Botánica

Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Santalales
Familia:	Loranthaceae
Genero:	<i>Struthanthus</i>
Especie:	<i>marginatus</i>

Nombre común: Liga; Antejos.

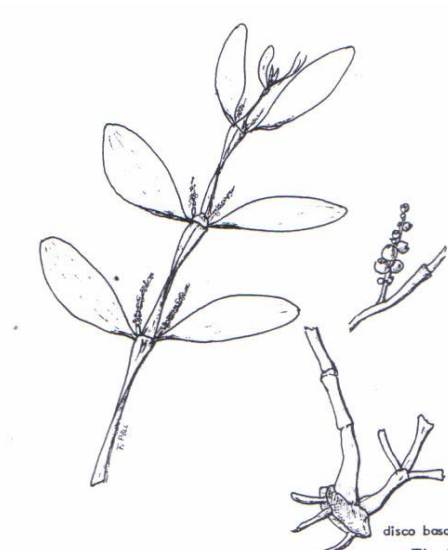
Descripción botánica

Forma masas colgantes con ramas flexibles, de varios metros de largo; a veces cubre toda la planta, hospedera, frecuentemente emite numerosas raíces aéreas, muy notables y haustorios.

Las hojas blandas son de color verde-grisáceo, con peciolo delgado, de anchamente ovadas hasta lanceoladas, de 5-9 cm de largo, a veces más, y de 2.0-3.5 cm de ancho, con el ápice agudo o acuminado y la base redondeada, los bordes ligeramente ondulados; el nervio central muy marcado, las ramificaciones penninervias. Las inflorescencias solitarias o fasciculadas, son cortas, de 2-3 cm de largo, con flores amarillentas o verdosas.

Los frutos son esféricos a ovales, de 4-5 mm de diámetro, de color naranja o casi negros. (22).

Phoradendron robustissimum Eischler



Clasificación Botánica

Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Santalales
Familia:	Viscaceae
Genero:	<i>Phoradendrum</i>
Especie:	<i>robustissimum</i>

Nombre común: Matapalo

Descripción Botánica

Arbusto rígido, erecto, con ramificaciones que nacen de una base común en forma de un disco el cual se fija en el huésped por medio de haustorios, causándole abultamiento en la rama atacada.

Las ramas son cilíndricas, pero las ramas jóvenes son aplanadas, provistas de 4 costillas, 2 de estas muy prominentes.

Las hojas de verde oscuro, coriáceas, con peciolo muy corto, y nervios basales; tiene forma oblarga o lanceolado-ovada, de 4-10cm de largo y de 2.3-4.5 cm de ancho, con ápice obtuso y base aguda o redondeada.

Las inflorescencias son espigas de 3-5 cm de largo flores diminutas de color verde amarillento.

Los frutos de verde claro, suaves, globosos miden de 2-3 mm de diámetro. (22).

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



Bacterias Gran positivo (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), bacteria Gran negativo (*Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y micobacteria (*Mycobacterium smegmatis*).

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTILEVADURA



Hongos levaduriformes (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*)

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA



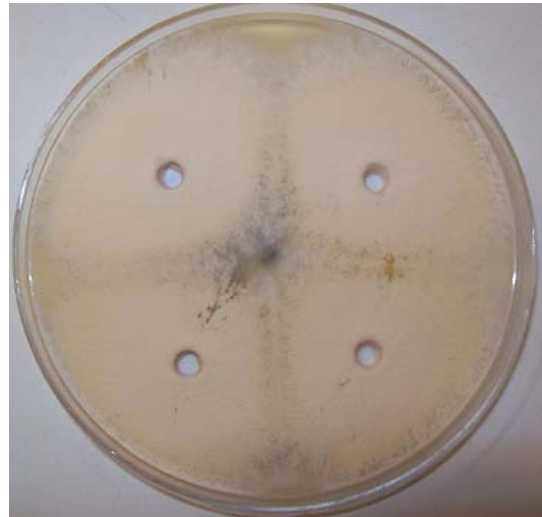
Aspergillus flavus



Aspergillus niger



Trichophyton rubrum



Microsporum gypseum



Aspergillus fumigatus



Trichophyton mentagrophytes

EJEMPLOS DE INHIBICIÓN (+)



Inhibición en el tamizaje antibacteriano

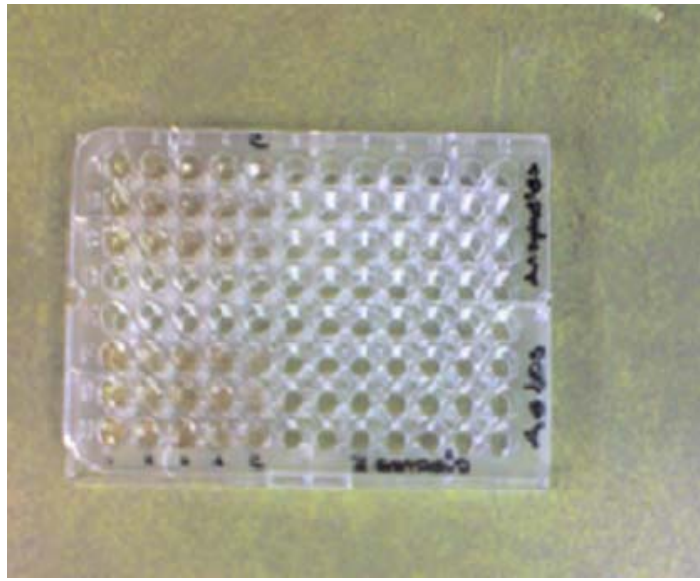


Inhibición en el tamizaje contra hongos levaduriformes



Inhibición en el tamizaje contra hongos filamentosos

TAMIZAJE CONTRA LA ACTIVIDAD LARVICIDA



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

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA



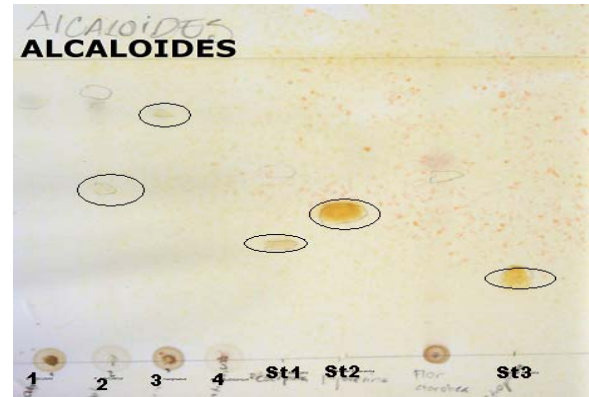
Nauplios de *Artemia salina* de 48 horas de vida

TAMIZAJE FITOQUIMICO

Alcaloides



Prueba en tubos



1. *Struthanthus orbicularis* 2. *Psittacanthus calyculatus*
3. *Struthanthus marginatus* 4. *Phoradendron robustissimum*
St1: reserpina, St2: papaverina, St3: atropina

Cromatografía en capa fina

Flavonoides y Antocianinas



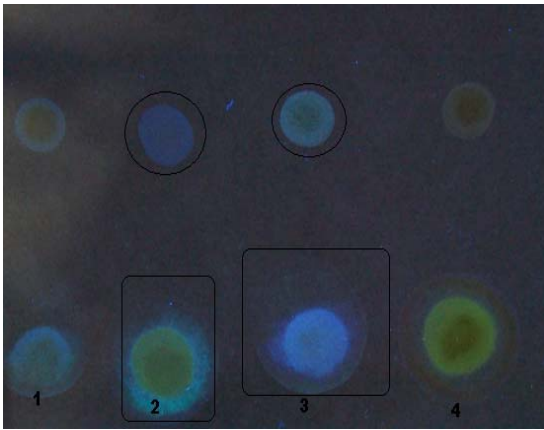
Prueba en tubos



1. *Struthanthus orbicularis* 2. *Psittacanthus calyculatus*
3. *Struthanthus marginatus* 4. *Phoradendron robustissimum*
St1: Quercetina, St2: Hiperósido, color naranja,
St3: Rutina, color naranja St4: Ácido clorogénico, verde.

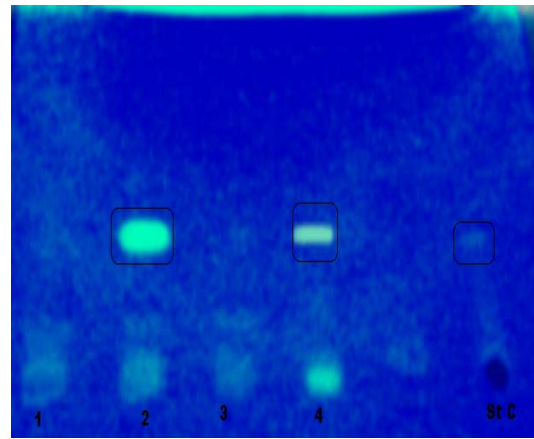
Cromatografía en capa fina

Cumarinas



1. *Struthanthus orbicularis* 2. *Psittacanthus calyculatus*
3. *Struthanthus marginatus* 4. *Phoradendron robustissimum*

Prueba con hidróxido de potasio 0.5 N



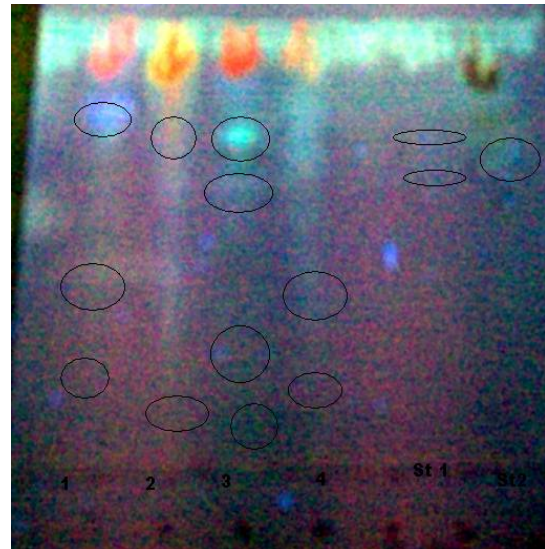
1. *Struthanthus orbicularis* 2. *Psittacanthus calyculatus*
3. *Struthanthus marginatus* 4. *Phoradendron robustissimum*
Estándar: cumarinas

Cromatografía en capa fina

Saponinas



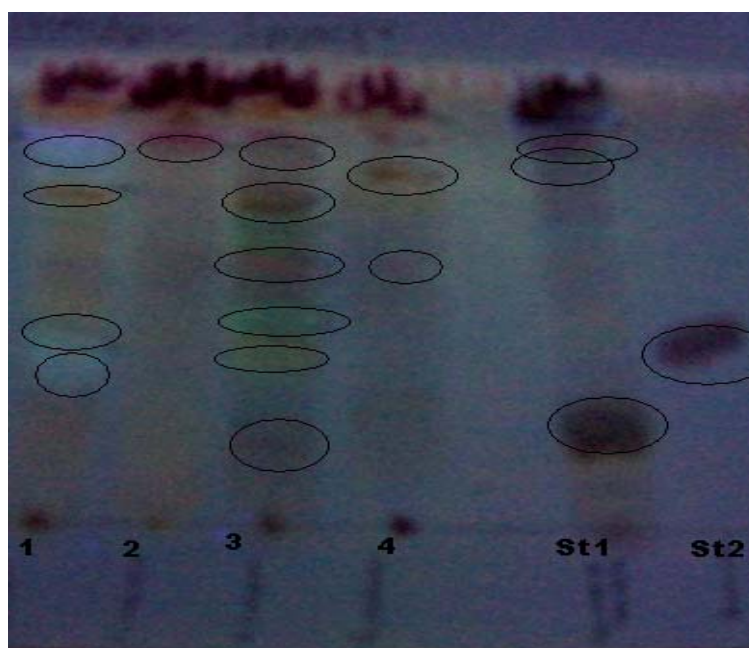
Prueba de espuma



1. *Struthanthus orbicularis* 2. *Psittacanthus calyculatus*
3. *Struthanthus marginatus* 4. *Phoradendron robustissimum*
Estándares: Solución de saponinas al 0.1 %, color amarillo

Cromatografía en capa fina

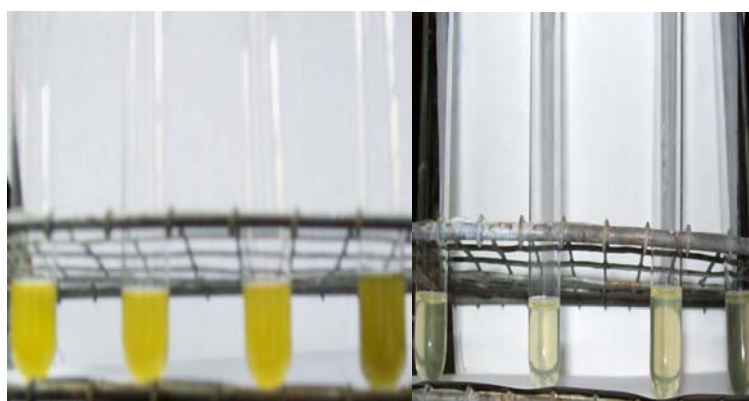
Principios Amargos



1. *Struthanthus orbicularis* 2. *Psittacanthus calyculatus*, 3. *Struthanthus marginatus*
4. *Phoradendron robustissimum*, St1, St2; *Neurolena lobata*, color café, Rojo-violeta

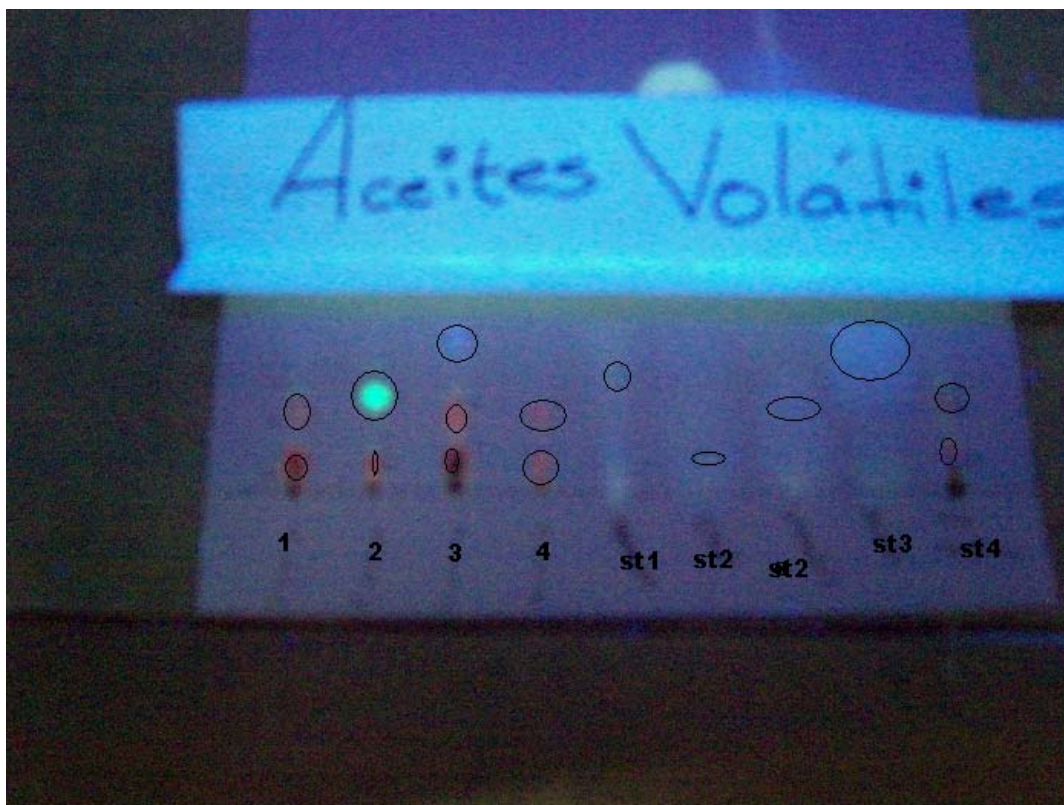
Cromatografía en capa fina

Taninos



Prueba en tubos

Aceites Volátiles



1. *Struthanthus orbicularis* 2. *Psittacanthus calyculatus*, 3. *Struthanthus marginatus* 4. *Phoradendron robustissimum*
St1: Eugenol, color azul, St2 linalool color azul; St3: timol rojo; St4: carvacol, color azul-violeta.

Cromatografía en capa fina

Boris Leonel Juárez Ríos
Autor

Vo.Bo. _____
Lic. Armando Cáceres
Asesor

Vo.Bo. _____
Licda. Sully Margot Cruz
Revisora

Vo.Bo. _____
Lic. Francisco Estuardo Serrano Vives
Director de Escuela

Vo.Bo. _____
Dr. Oscar Cobar Pinto

Vo.Bo. _____
Licda. Sully Margot Cruz
Revisora

Vo.Bo. _____
Lic. Francisco Estuardo Serrano Vives
Director de Escuela

Vo.Bo. _____
Dr. Oscar Cobar Pinto

