

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

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
***Solamun hartwegii* (Nombre común lavaplatos)**

CLAUDIA DIONEÉ MORALES MENDIZÁBAL

QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, AGOSTO DEL 2011

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

**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
Solamun hartwegii (Nombre común lavaplatos)**

Informe de Tesis

Presentado por

Claudia Dioneé Morales Mendizábal

Para optar al título de

Química Farmacéutica

GUATEMALA, AGOSTO DEL 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. José Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska de León	Vocal V

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	4
4. Justificación	17
5. Objetivos	18
6. Hipótesis	19
7. Materiales y Métodos	20
8. Resultados	45
9. Discusión	56

10. Conclusiones.....	58
11. Recomendaciones.....	59
12. Referencias.....	60
13. Anexos.....	63

1. RESUMEN

La presente investigación partió del interés de evaluar la actividad biológica *In Vitro* (antimicrobiana, antifúngica, larvicida, citotóxica) de las hojas de *Solanum hartwegii* conocido comúnmente como lavaplatos y así contribuir al estudio de los productos naturales en Guatemala, ya que *S. hartwegii* tiene reportado varios usos medicinales como tripanostático, diurético y antiinflamatorio, además se ha publicado poca literatura sobre su composición fitoquímica. Esto permitió caracterizar los metabolitos secundarios presentes en la planta.

El material vegetal se recolectó en Patzún, municipio de Chimaltenango, Departamento de Chimaltenango. Se realizaron las pruebas físicas a las hojas determinando la humedad no mayor del 10 por ciento. Posteriormente se obtuvo el extracto etanólico mediante percolación y concentración con rotavapor, se le realizaron pruebas de pH levemente ácido, con una densidad de 0.9296 g/ml. Al extracto se le realizaron pruebas *in vitro* para determinar su actividad biológica y tamizaje fitoquímica a través de ensayos macro, semimicro y cromatografía en capa fina. Se caracterizaron los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, antocianinas, cumarinas, saponinas, principios amargos y aceites volátiles, se cuantificó los flavonoides presentes mediante espectrofotometría a 394nm, obteniendo un promedio de 1.54%.

El aceite esencial se extrajo mediante destilador tipo Neocleavenger. Se calculó su rendimiento obteniéndose un porcentaje mínimo de (0.02013%), El aceite recolectado fue caracterizado por medio de cromatografía de gases acoplada a masas. Se encontraron 51 compuestos los cuales fueron identificados por medio de un software integrado en el cromatógrafo.

Empleando un método de dilución en agar se evaluó la actividad biológica *in vitro* del extracto etanólico. Los resultados mostraron que este no presentó actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivo *S. aureus* y *B. subtilis*, bacteria Gram negativo *S. typhi*, *P. aeruginosa* y *E. coli* y la micobacteria (*M. smegmatis*) a una concentración de 1mg/mL, no presentó actividad antifúngica con hongos levaduriformes (*C. albicans* y *C. neoformans*), hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*) a una concentración 1mg/ml. El extracto etanólico no presentó actividad larvicida contra *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* por lo que se determinó que la concentración letal es mayor a 1 mg/mL. Se evaluó la actividad citotóxica del extracto etanólico contra *Artemia salina* a diferentes concentraciones de 0.5, 0.25, 1.0, 1.25mg/ml, en el cual se determinó una concentración letal media (CL50) de

0.227mg/ml, mediante el programa de finney. No se encontró actividad antibacteriana, antifúngica, ni antilevadura en el extracto etanólico de las hojas de *S. harwegii*, pues no se alcanzó significancia estadística ($p>0.1$). Por ello se concluyó que dicha especie carece de actividad biológica.

1. INTRODUCCION

Guatemala es un país rico en diversidad de especies vegetales los cuales pueden ser aprovechados por su valor farmacológico.

El interés mundial por las plantas como fuente principal para el descubrimiento de nuevos medicamentos es por los metabolitos secundarios presentes en ellas, ya que la ciencia ha demostrado que cada especie vegetal es un verdadero laboratorio viviente y la selva tropical una farmacia, donde se producen no una, si no múltiples y complejas biomoléculas.

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos extraordinariamente diversos y pueden tener actividad biológica importantes como antibacterianos, antifúngicas, antiinflamatorios, entre otras. (Albornoz A 1980, 976)

Los estudios sobre diversidad biológica para el descubrimiento de nuevos fármacos consisten en detectar una planta no estudiada previamente, evaluar su actividad mediante un bioensayo determinado e identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica.

Solanum hatwegii es una planta que se utiliza popularmente para disminuir el edema posterior a golpes, el cual es comprobado farmacológicamente. (Hernandez I, 2008,26)

En la presente investigación se determinará la actividad antibacteriana, antifúngica, insecticida y citotóxica del extracto etanólico de *Solanum. hartwegii* Benth (lavaplatos), por lo que es necesario realizar un fraccionamiento bioguiado para identificar la fracción responsable de la bioactividad y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en ella. (Vila, R y Reing M, 2003. 39)

2. ANTECEDENTES

3.1 Plantas Medicinales: Las plantas son una fuente casi ilimitada de metabolitos, algunos de los cuales son considerados como secundarios (metabolitos secundarios). Más aún, la vasta diversidad de estructuras químicas de dichos compuestos, su empleo rutinario aunque selectivo desde tiempos lejanos y el enorme potencial de utilización en prácticamente todas las actividades de los seres humanos hacen que el metabolismo secundario sea un área de enorme importancia para adquirir conocimiento a través de su estudio y para desarrollar oportunidades de negocios sostenibles mediante su explotación económica racional. Desde hace miles de años, las sociedades han empleado las plantas medicinales y aromáticas con múltiples fines, que van desde tratamientos de belleza, terapéuticos y medicinales hasta fuente de venenos y materia prima para industrias de colores, aromas y sabores. En la actualidad, los metabolitos secundarios son de gran importancia comercial y son usados como aromas, sabores y colores en industrias de alimentos, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico y medicinal. (Cáceres A, 1993,202-213)

3.1.1 Metabolitos secundarios:

Definición: Son sustancias producidas por rutas metabólicas secundarias del vegetal, normalmente se considera que no son esenciales para el funcionamiento de la célula vegetal. (Medinilla A. 1988, 3)

Frecuentemente los metabolitos secundarios son responsables de efectos específicos que un vegetal ejerce sobre otros organismos, por lo que con frecuencia el término principio activo se utiliza como un sinónimo de metabolitos secundario.

Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme en la planta, turas específicas como en flores, hojas o raíces, frutos o en la corteza. (Pahlow. M, 1979, 7-19)

3.1.2 Tipos de Metabolitos Secundarios:

- **Alcaloides:** Son sustancias básicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno, usualmente forman parte de un sistema heterocíclico. Siendo su clasificación amplia y variada. Se encuentran en las plantas casi siempre en forma de sales, combinados con los ácidos más simples de los vegetales. Se menciona como ejemplos, la atropina, que es el alcaloide de la belladona, la morfina de la dormidera, o de la colchicina del cólquico.
- **Principios Amargos:** Son las sustancias químicas caracterizados por el sabor amargo y su estructura terpenoide. La mayor parte derivan de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos, todos ellos, tienen en común unidades de isopreno.
- **Flavonoides:** Sustancias que tienen una misma composición química base, todos contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico denominado flavona, y están arreglados bajo un sistema $C_6C_3C_6$. Entre sus funciones fisiológicas se encuentran la inhibición de sistemas eszimáticos y contribuyen a la polinización.
- **Taninos:** Se refieren a un grupo de sustancias químicas que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos que se encuentran formado glicósidos. Son componentes vegetales que están en condiciones de ligar las proteínas de la piel y mucosa, para transformarlas en sustancias insolubles resistentes. También se clasifican como polímeros fenólicos, de elevado peso molecular que forman colides con agua.
- **Saponinas:** Son glicósidos derivados de triterpenos o de esteroides. Se conocen 2 grupos: tipo esteroidal y triterpenoidal. Las saponinas son glicósidos vegetales que juntos con el agua forman una espuma permanente, que emulsionan el aceite en el agua y que poseen un efecto hemolítico importante.

- **Antraquinonas:** Constituyen el grupo más grande de sustancias del tipo quinona presentes en la naturaleza, suelen ser compuestos de color rojo-anaranjado.
- **Cumarinas:** Son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas. Se caracterizan por el sistema benzo alfa pirona y su carácter, lactónico hace que sean solubilizadas por soluciones alcalinas con la aparición de un color amarillo. Su configuración química es C_6C_3 .
- **Aceites Esenciales:** Son componentes vegetales que debido a su consistencia son muy volátiles; su olor es intenso. En algunos casos se llaman esencias. Generalmente constituyen los principios saponídicos y aromáticos de las plantas. Derivan del isopreno, están formados en su mayoría por monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos. (Sandberg F, 1990, 87).

3.1.3 **Efectos Biológicos de los Metabolitos Secundarios:**

Desde el punto de vista químico la mayor parte del vegetal está constituido por agua, así como metabolitos primarios, tales como carbohidratos, proteínas, grasas y celulosa ⁽¹³⁾. Además contienen, en menor proporción, metabolitos secundarios. Estos desempeñan una amplia gama de efectos biológicos. Dentro de ellos, por ejemplo, muchos alcaloides poseen acción antibacteriana, antiespasmódica, sedante, anestésica, laxante y anticancerígena. (Porrás CP, 1996, 2).

Muchos terpenos han demostrado actividad antitumoral, citotóxica y antifúngica. Los taninos se caracterizan por su acción antibacteriana, anticancerígena y en la curtiembre de cueros. (Calderón PJ, 1968, 479).

Las saponinas producen espumas más o menos estables, ya que son poderosos agentes tensoactivos. Cuentan con propiedades detergente, edulcorantes, expectorantes, diurética, antiinflamatoria y se ha reportado que sirve como materia prima para la síntesis de

hormonas esteroidales (éstrógenos, anticonceptivos orales, andrógenos y otros) (Claus MP, 1996, 2).

Los principios amargos estimulan la secreción de jugos gástricos y desarrollan además una acción tónica. También tiene propiedades citotóxicas, antitumorales, analgésicas, antimaláricas, antibacterianas y amebicidas. (Sharapin N, 2000, 25).

Los flavonoides tienen la propiedad de actuar como conservadores de grasas o jugos de frutas debido a sus efectos antioxidantes. Presentan acción antibacteriana, anticancerígena, antifúngica y también como insecticida.

Otro importante grupo de metabolitos secundarios son las que presentan actividades antivirales por la inhibición del anión superóxido que producen los neutrófilos humanos por la antraquinona, además de su acción catártica, antifúngica, antibacterial, antiprotozoaria.

Por último, se menciona a las Cumarinas, que presentan actividad estrogénica, insecticidas, antiviral, antiinflamatoria y anticancerígena. (Claus MP, 1996, 15).

3.2 Cromatografía en capa fina

3.2.1 Historia:

La idea y los fundamentos de la utilización de un adsorbente cromatográfico dispuesto como una delgada capa sobre un soporte inerte rígido, son atribuidos a Izmailov y a Shaiber (1938). Estos investigadores analizaron tinturas farmacéuticas por cromatografía en capa fina utilizando albúmina como adsorbente en una placa de vidrio, con el objetivo de obtener cromatogramas circulares. En el año de 1949, Meinhard y May utilizaron una goma para unir una mezcla de celita y albúmina en laminas de microscopio, obteniendo una capa homogénea y más fina. Kirchner y sus colaboradores usaron por primera vez un desarrollo ascendente, como ya era usado en la cromatografía en papel. Sin embargo, fueron el trabajo de Stahl y el consecuente desarrollo de adsorbentes estandarizados

comercialmente, los responsables por el auge vertiginoso del uso de la cromatografía en capa fina. Stahl publicó un excelente libro sobre este tema. Desde entonces, la cromatografía en capa fina fue aceptada como una técnica analítica reproducible. Wagner y sus colaboradores elaboraron un libro en el cual describen las técnicas de separación cromatografía en capa fina para el análisis de drogas vegetales (Cytel, 1993, 40).

3.2.2 Descripción de la técnica

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuido uniformemente sobre una placa de vidrio o de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separado por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

El gran desarrollo de esta técnica se debe a las múltiples ventajas que ella ofrece, entre las cuales podemos citar: su fácil comprensión y rápida ejecución, la versatilidad, su reproducibilidad y el bajo costo. El proceso de separación está fundamentado principalmente en una serie de etapas o equilibrios de absorción-desorción. Otros tipos de cromatografía, como la de reparto o la de intercambio iónico, pueden tener lugar cuando se utilizan fases estacionarias apropiadas. En el mercado se pueden encontrar diferentes tipos de adsorbentes entre los cuales se pueden citar: la sílica gel (SiO_2), la celita (tierra de diatomeas), la alúmina (Al_2O_3), la celulosa (para cromatografía de reparto) y la poliamida. También ha sido

bastante utilizada la incorporación de reactivos a los adsorbentes, con lo cual se busca la separación de las sustancias muy relacionadas. Ejemplo de esto es la adición de nitrato de plata a la sílica, en la proporción de 3 a 30% para separar sustancias insaturadas, debido a la formación de complejos entre el ion Ag. y los dobles enlaces. La sílica también puede ser modificada dando como resultado la cromatografía en fase reversa. Esto ocurre cuando mediante procedimientos químicos se enlaza la sílica a grupos tales como C18, C8, C2, CH y NH₂. cuando utilizamos la cromatografía de fase móvil polar, mientras que en la cromatografía en fase normal, se utiliza un adsorbente polar y una fase móvil apolar. De esta forma, el número de sustancias diferentes que pueden ser analizadas utilizando la cromatografía de capa fina aumenta considerablemente.

En el mercado podemos encontrar las placas cromatográficas prefabricadas a un precio relativamente elevado, las cuales no necesitan de la fase preparatoria y son más homogéneas y uniformes, facilitando de esta manera una mejor separación y haciendo más reproducibles los valores de R_f (factor de retención). El factor de retención es la medida de migración de una sustancia determinada en un solvente dado.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Los siguientes factores causan variaciones en el valor del R_f no permitiendo que sea un valor absoluto: las variaciones de temperatura del medio ambiente, el grado de pureza de los disolventes utilizados y las variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina. Debido a estos factores el uso de una sustancia de referencia para garantizar la identificación, es muy importante, principalmente cuando se trata de extractos de plantas.

Las placas cromatográficas pueden ser preparadas en el propio laboratorio de análisis para disminuir los costos. F.J. de Abreau Matos describe con lujo de detalles la forma de preparar estas placas. Así como la técnica de aplicación de la muestra, la elusión, el revelado y la observación de los resultados. Escoger el eluyente apropiado, es de gran importancia para la buena separación de las sustancias. Este debe ser

seleccionado en función de la fase estacionaria empleada y en función de la naturaleza de las sustancias que van a ser separadas.

Las ventajas del uso de la cromatografía en capa fina puede ser resumida de la siguiente manera:

- Se necesita equipo simple y bajo costo.
- Es fácil su comprensión y ejecución.
- Rapidez, reproducibilidad y versatilidad en el análisis.
- Utilización de una pequeña cantidad de disolvente y de la muestra a ser analizada
- Posibilidad de analizar varias muestras en una sola placa cromatográfica.
- Posibilidad de revelar las placas con reactivos cromogénicas, lo cual hace posible detectar sustancias que no absorben en la región UV/visible.
- Posibilidad de efectuar superaciones en escala semi-preparativa

3.2.3 Análisis cuantitativo en cromatografía en capa fina:

Hasta 1987, la principal utilización de la cromatografía en capa fina esta básicamente cualitativa o semi-preparativa. El desarrollo de los densitómetros modernos permitió la utilización de esta técnica para los análisis cuantitativos.

El densitometro mide el área y la intensidad de las manchas de un cromatograma en capa fina presentado registros en forma de picos. La lectura de una placa puede ser llevada a cabo por transmitancia o reflectancia en la región ultravioleta y visible o por fluorescencia. Para cuantificar una sustancia utilizando esta técnica es necesario primero construir una curva de calibración con concentraciones conocidas de un patrón de la sustancia que va a ser analizada. Sustancias incoloras pueden ser cuantificadas, siempre y cuando se utilicen reactivos cromogénicos, los cuales van a permitir la lectura en el densitómetro. En este caso deben tenerse precauciones pues puede presentarse una distribución desigual de la coloración, dependiendo de la cantidad y de la

forma de aplicación del revelador utilizado, de la temperatura utilizada durante el calentamiento que puede volatilizar la muestra y del tiempo empleado entre el revelado y la lectura de la placa. La presencia de manchas difusas e irregulares puede presentarse cuando se aplican sustancias en baja concentración que necesitan de la aplicación de la muestra y con variaciones de las condiciones cromatográficas.

Entre estos factores podemos citar: la homogeneidad del absorbente empleado o la migración del disolvente de forma irregular. Petrovic y sus colaboradores en un intento por reducir los posibles errores en el análisis de los resultados introdujeron un proceso de cuantificación basado en la utilización de un instrumento de alta precisión, llamado analizador de colores, bastante utilizado en la industria textil, el cual muestra mayor precisión, comparado con los densitómetros usuales. (Wagner H, 1984, 320-323)

3.2.4 Utilización de la cromatografía en capa fina para el análisis de productos fitoterapéuticos

Para obtener un producto fitoterapéutico estandarizado y de calidad debe asegurarse la uniformidad de todos los lotes de su producción. Para lograr este objetivo es indispensable que cada etapa del proceso de producción sea rígidamente realizada. Factores como el origen del material vegetal, la época en que fue realizada la recolección, el proceso de secado y almacenamiento son de una importancia crucial para garantizar un producto final de buena calidad. La cromatografía en capa fina es una técnica importante en todo el proceso ya que permite proporcionar informaciones sobre la homogeneidad de los componentes químicos del producto y así garantizar que las sustancias responsables de la actividad farmacológica estén presentes en los niveles adecuados

El primer paso a seguir en el control de calidad de un producto fitoterapéutico es definir cuáles grupos de sustancias pueden estar presentes, para de esta manera lograr la identificación de la planta (marcadores) y de aquellas sustancias capaces de ejercer las actividades farmacológicas (principios activos). La legislación vigente en el Brasil da las siguientes definiciones:

- Principio activo: sustancia o grupo de sustancias químicamente caracterizadas, cuya acción farmacológica es conocida, siendo la responsable total o parcialmente de los efectos terapéuticos de los productos fitoterapéuticos.
- Marcadores: Constituyentes químicos definidos que están presentes en la materia prima vegetal, de preferencia los propios principios activos, destinados al control de calidad de la materia prima vegetal, de las preparaciones fitoterapéuticas intermedias de los productos fitoterapéuticos.

Siendo así, el primer paso para realizar el análisis de un determinado producto fitoterapéutico, es definir las sustancias químicas que van a ser investigadas, lo que permitirá identificar cuál será el mejor disolvente para extraer estas sustancias, así como, determinar el mejor sistema de eluentes para la migración en la cromatoplaça e incluso identificar los reveladores más adecuados que serán utilizados para detectar las sustancias presentes. Estas sustancias son las llamadas marcadores y los marcadores ideales son los propios principios activos. No siempre en el análisis se hace posible la utilización de los principios activos debido a los siguientes factores:

- Desconocimiento de las sustancias responsables de la actividad de la planta.
- Los principios activos son difíciles de detectar o están presentes en pequeñas cantidades en la planta.

En estos casos es imposible utilizar los principios activos como marcadores, siendo necesario seleccionar otras sustancias que caracterizan sin duda alguna a la droga. El análisis será llevado a cabo comparando determinado producto fitoterapéutico con una sustancia estandarizada definida de antemano como marcadora.

En algunos casos la sola comparación con el patrón no es suficiente, por esta razón es necesario que además de ser comparada con la sustancia marcadora sea comparada también con un extracto patrón de

procedencia conocida. La comparación con el producto auténtico revela no solamente la presencia de los principios activos sino también la proporción entre estos y otras sustancias presentes en el extracto.

No siempre se conoce la constitución química de la planta; cuando esto sucede es indispensable realizar su perfil cromatográfico; el extracto, en condiciones definidas de análisis, formará un diseño característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes, llamado huella digital (finger print) de la planta.

Por consiguiente las plantas de las cuales no se posea ninguna información sobre su composición química, pueden ser controladas, realizando simplemente cromatografías de un extracto patrón botánicamente identificado. La migración de las manchas presentes en la muestra y en el patrón aunque no estén identificadas pueden ser comparadas a partir del R_f , del tamaño y coloración.

Los análisis cuantitativos del material de origen vegetal pueden ser realizados a través de la lectura de las placas en capa fina en densitómetros. Papel y colaboradores, por ejemplo, utilizaron la cromatografía en capa fina con posterior lectura en un densitómetro para cuantificar la pinocembrina, una isoflavanona a la cual se le atribuyen, en gran parte, las actividades antibacterianas del propóleo. Houston y sus colaboradores cuantificaron igualmente la pinocembrina a través de la cromatografía en capa fina seguida por la lectura con un densitómetro, utilizando como patrón interno la 1,4 dihidroxiantraquinona, obteniendo resultados comparables a los análisis realizados con la ayuda de un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, comprobando así, la eficiencia de esta técnica.

La Cromatografía en capa fina es un método simple, eficiente y que no necesita de un equipo sofisticado para su ejecución. Este método sirve para identificar las drogas vegetales, sus extractos y tinturas e igualmente para que una formulación farmacéutica sea posible identificar la presencia de una droga o de sus extractos.

Cuando los principios activos de una droga no son conocidos la identificación de la droga puede ser realizada a través de la determinación de sustancias características de la planta en cuestión, aunque no tenga actividad farmacológica.

Estas sustancias denominadas marcadores (o marcadores positivos), son seleccionadas entre los compuestos característicos de la planta. El uso de ellas debe limitarse solamente a la identificación del material vegetal, de los extractos y de las tinturas. Los marcadores pueden servir, igualmente, para identificar la presencia de la droga en una formulación farmacéutica. Cuando los marcadores no son las sustancias responsables de la acción farmacológica de las drogas, no deben ser utilizados para las determinaciones cuantitativas. La presencia de manchas o bandas coloreadas con el mismo Rf de las sustancias de referencia en el cromatograma de la muestra, no es suficiente para identificar la droga.

La existencia de otras manchas o bandas coloreadas deben ser anotadas, así como su posición de relación a la posición de las sustancias de referencia utilizadas. El uso de sustancias de referencia que no son constituyentes de la planta es de utilidad para determinar la ocurrencia de falsificaciones. Estas sustancias reciben la denominación de marcadores negativos. Así los extractos son analizados de comparación con soluciones de rutina, sustancias que no está presente en esta planta. El hecho de aparecer manchas con el mismo Rf y coloración de la rutina en el cromatograma del extracto indica la posible falsificación (Lot A y Chieng F, 1986, 93-100)

3.3 Descripción Botánica:

***Solanum hartwegii* Benth. (Lavaplatos)**

3.3.1 Nombre común: Lavaplatos

3.3.2 Nombre científico: *Solanum hartwegii* Benth.

3.3.3 Clasificación:

División	Magnoliophita
-----------------	---------------

Clase	<i>Magnoliopsida</i>
SubClase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Solanum

3.3.4 Familia

Las **solanáceas** son una familia de plantas leñosas con las hojas alternas simples sin estípulas, flores generalmente regulares, actinomorfas o ligeramente cigomorfas, pero con el gineceo situado en posición oblicua respecto al plano mediano de la flor, hermafroditas, solitarias en las axilas de las hojas o en inflorescencias cimosas.

3.3.5 Distribución Geográfica: Común desde México a Costa Rica. Se presenta de 1200-3200 metros de altura. En Guatemala se distribuye en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Zacapa, Chiquimula, Jalapa, El Progreso, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá Quiché, Totonicapán, Quetzaltenango, Huehuetenango, Jutiapa, San Marcos. (Kuklinki C, 2000, 515)

3.3.6 Descripción botánica: Arbusto de 0.5-3.5 m de alto, las ramas densamente cubiertas con tomento estelar blancuzco a grisáceo, los pelos débiles alargado estelado estipitado, esparcidamente con espinas pequeñas rectas o a veces ausente.

Hojas solitarias subenteras levemente lobadas, ovada a ovada elíptica o ovada lanceolada 12-25 cm, 8-15 cm de ancho, el ápice estrechamente agudo, la base redonda acordada desigual o igual esparcidamente a densamente pubescente estelado estipitado o algunas veces glabro especialmente en la madurez, raramente con espinas en el envés, densamente tomentoso estelado, los pelos blancuscos a negruscos y estelados estipitados, también con unas pequeñas espinas en la vena

media; pecíolos 2-3 (-5 cm) de largo densamente pubescente tomentoso estelado, los pelos blancuscos negruscos y estelado estipitado; inflorescencias laterales e internodales, simos-corimboso, muy floreadas densamente pubescente estelado tomentoso los pelos largo estelados estipitados blancuscos negruscos a grisáceos; pedúnculos cortos, 5-20 mm de largo, pedicelos cortos y rígidos 5-10 mm de largo; cáliz (4.5-) 6-8 mm de largo césiles y pubescente estelado estipitado. Lóbulos (1.5-) 4-5 mm de largo lineares; corola brillante a púrpura pálido.

El limbo (25-) 30-35 mm de ancho lobados cerca de la mitad a mas de la mitad desde la base, los lóbulos (7-) 10-12 mm de largo, ovados, ápice acuminado, densamente césil o pubescente estelado estipitado, los pelos estelados césiles sobre la vena media interna; filamentos 2-25 mm de largo; anteras (5-) 6-7.5 mm de largo; estilo 9.5-10.5 mm largo, la base cubierta con glándulas estipitadas estelado césil y pelos glandulares estipitados. Ovario cubierto de glándulas estipitadas o estelado césil y pelos glandulares estipitados; fruto globoso 1-1.5 cm de diámetro; semillas de 2-3 mm de ancho (Departamento de Fitoqímica, 1995, 1).

3.3.7 Farmacología: En el año 2008, Hernández I. en su tesis titulada “Validación farmacológico del efecto antiinflamatorio, de hojas de *Solanum hartwegii* Beth (Lavaplatos), Hojas de *Litsea guatemalensis* Mez.(Laurel), y de hojas de *Piper jacquemontianum* Kunth (Cordoncillo)” se ha publicado su significativa actividad antiinflamatoria en ratas albinas, para el cual se utilizaron infusiones de las hojas de *S. hartwegii* (lavaplatos) a dosis de 1000 mg/kg de peso. También se evaluó la actividad diurética a dosis de 750 y 1000 mg/kg de peso en ratas pero carece de actividad (Hernández I, 2008, 26)

En el año 2005, Pajares D. en su tesis titulada “Efecto tripanostático de *Solanum hartwegii* sobre dos capas de tripanosoma cruzi de alta y baja parasitemia”. Utilizando las flores de *S. hartwegii* mostró cierto efecto tripanostático sobre el parásito *Tripanosoma cruzi* aunque no fue estadísticamente significativo. (Pajares D, 2005, 28)

3. JUSTIFICACION

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 *Solamun hartwegii* Benth. (lavaplatos) que se localiza en Guatemala, se ha documentado su uso tópico para una amplia variedad de enfermedades antiinflamatorias.⁽³⁾ dicha propiedad ha sido evaluada y confirmada mediante estudios científicos, por lo que resulta de interés continuar con estudios fitoquímicos y biológicos que permitan evaluar el potencial de dicha especie, como alternativa para el tratamiento de infecciones por microorganismos patógenos que son de gran incidencia en la población guatemalteca.

Estudios como el presente pretenden valorar, investigar, conservar y desarrollar los recursos naturales de Guatemala como fuente de nuevos fármacos y productos fitoterapéuticos, ya que por ser un país con una de las mayores biodiversidades del planeta aún se desconoce el potencial que pueden tener especies que benefician a la población.

4. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar fitoquímicamente los extractos etanólicos de las hojas de *S. hartwegii* y evaluar su actividad biológica.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Caracterizar mediante ensayos macro, semimicro y un perfil cromatográfico en capa fina la presencia de metabolitos secundarios en las hojas de *S. hartwegii*.
- 5.2.2 Evaluar la actividad antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, larvicida de las hojas *S. hartwegii* mediante bioensayos *in vitro*.
- 5.2.3 Cuantificar flavonoides totales presente en las hojas de *S. hartwegii*, mediante espectrofotometría ultravioleta-visibles.
- 5.2.4 Identificar los constituyentes presentes en el aceite esencial de *S. hartwegii* por medio de cromatografía de gases.

5. HIPOTESIS

El extracto de *S. hartwegii* posee actividad biológica demostrable *in vitro* (antimicrobiana, antifúngica, larvicida, citotóxica) y un patrón fitoquímico característico

6. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo: Hojas de *S. hartwegii*

7.2 Muestra: Extracto etanólico de las hojas de *S. hartwegii*

7.3 Materiales

7.3.1 Recursos Humanos:

7.3.1.1 Investigadora:

Br. Claudia Dioneé Morales Mendizábal.

7.3.1.2 Asesora:

Licda. Sully Margot Cruz, M.A.

7.3.1.3 Revisora:

Licda. Beatriz Eugenia Medinilla Aldana.

7.3.1.4 Colaboradora:

Licda. Isabel Gaitán

7.3.2 Institucionales:

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales
(LIPRONAT)

Departamento de Cito-histología de la Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacia.

Laboratorio de Toxicología del Centro de Información y
Asesoría Toxicológica (CIAT)

7.3.3 Material y Equipo para tamizaje fitoquímico:

- Evaporador rotatorio.
- Espectrofotómetro CARY-50
- Bomba de vacío.

- Ampolla de decantación.
- Cristalería y material de laboratorio en general
- Balanza analítica.
- Papel filtro.
- Baño de maría
- Micropipetas de 5 μ L o capilares.
- Asperjador de vidrio.
- Estufa.
- Agitador magnético.
- Estándares según el ensayo.
- Lámpara de luz UV.
- Regla.
- Campana de extracción de gases.
- Cromatoplasmas de sílica gel 60 F254.
- Cámaras cromatográficas.

7.3.4 Materiales y equipo para ensayos Biológicos: (Antimicrobiano, Antifúngico, Larvicida y citotóxica).

- Autoclave
- Cajas de Petri descartables.
- Cajas de Petri “cuadriplate”.
- Tubos de ensayo con tapón de rosca.
- Campana de flujo laminar.
- Balanza analítica.
- Esteriósopo.
- Bomba de oxígeno para pecera.
- Pecera de cultivo
- Cámara de Neubauer.
- Campanilla de Durham

- Incubadora
- Material de laboratorio en general.
- Refrigeradora

7.3.4.1 Medios de Cultivo:

- Agar Muller Hinton.
- Agar Desmineralizada.
- Agar Saboraud.
- Agar – Agar.

7.3.4.2 Microorganismos:

- | | |
|--|------|
| • <i>Staphylococcus aureus</i>
25923 | ATCC |
| • <i>Salmonella typhi</i>
14028 | ATCC |
| • <i>Escherichia coli</i> .
25922 | ATCC |
| • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
27853 | ATCC |
| • <i>Mycobacterium smegmatis</i>
607 | ATCC |
| • <i>Aedes aegypti</i> | |
| • <i>Anopheles albimanus</i> | |
| • <i>Artemia salina</i> . | |

7.3.5 Reactivos:

- Reactivos químicos para tamizaje fitoquímico.
- Disolventes para extracciones y para cromatografía en capa fina.

7.4 Procedimiento:

Las técnicas utilizadas se basaron en el Manual de Operaciones de Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

7.4.1 Recolectar, secar, preparar extractos y realizar pruebas físicas:

- **Recolección:**

Se colectó muestras de hojas de *S. harwegii* al azar provenientes de patzún, Chimaltenango, estuvo exenta de enmohecimiento, de insectos y de otras contaminaciones de origen animal. El nivel de elementos extraños no fue superior al 2%. (m/m). Se pesó de 100 a 500 g de la muestra, y se colocó en una capa delgada sobre un papel filtro. Los elementos extraños se detectaron por inspección a simple vista y con ayuda de una lupa (x 6). Se separó los elementos extraños, se pesaron y calculó el porcentaje que representan.

Secado artificial:

Se colocó la planta en un horno de convección de aire forzada a 40°C por varias semanas lo necesario para que la planta obtenga un porcentaje de humedad no mayor del 10 por ciento. Luego se molió la muestra agregando poco a poco en un tamiz número 5 para obtener un polvo semi-fino, se guardó en bolsa plástica.

Preparación del extracto:

- PERCOLACIÓN: En un percolador de acero inoxidable se colocó algodón y papel filtro, luego se transfirió el material vegetal al percolador y se agregó alcohol al 70% hasta cubrir toda la droga, se dejó reposar por 24 horas y se recogió el líquido en un erlenmeyer, esta solución se utilizó para producir el extracto.

- PREPARACIÓN DEL EXTRACTO: Se concentró en rotavapor hasta obtener el extracto seco. (Santa Cruz, L, 1897, 92-96)

- **Pruebas Físicas:**

Se determinó la humedad residual de la droga: se lavó, se secó y se colocó una cápsula de porcelana en el horno a 105°C por 15 minutos, luego en la desecadora por 20 minutos. Se pesó 1 gramo del material vegetal y se agregó en la cápsula previamente tarada. Se colocó en el horno a 105°C por 30 minutos. Se introdujo la cápsula en una desecadora

para luego ser pesada. Se calculó el porcentaje de humedad. Para utilizar una balanza de humedad se trituro el material vegetal en trozos pequeños y se agregó 1g de la droga vegetal al platillo con homogeneidad, se cerró la tapadera de la balanza y se presionó tara y el botón enter, luego se leyó el resultado de la humedad de la muestra la cual no fue mayor del 10 por ciento.

- Se determinó el pH: Se sumergió el electrodo y el probador de temperatura dentro de la muestra (extractos obtenidos de las hojas de *S. harwegii*), se mantuvo dentro de la solución el tiempo necesario para estabilizar el electrodo, durante un tiempo mínimo de 30 segundos. Inmediatamente apareció un pH levemente ácido
- Densidad: Se utilizó un picnómetro limpio y seco, se determinó la densidad del extracto, primero se pesó el picnómetro vacío a 20°C, luego se pesó el picnómetro con agua a 20°C, se agregó la muestra al picnómetro y se pesó de nuevo. Se calculó el peso específico para determinar la densidad

Pruebas fisicoquímicas

- Sólidos totales: Se pesó 1g de hojas de la droga vegetal, se agregó a cada frasco etanol al 50%, 70% y 95% y se dejó reposar por un día, luego se colocó 3 cápsulas al horno a 105°C por una hora, se desecó y se pesó las cápsulas. Al siguiente día, después de 24 horas de extracción, se colocó en cada cápsula el extracto obtenido de cada frasco al 50%, 70% y 95%, se llevó a sequedad con una estufa, se introdujo en el horno a 105°C por una hora, se desecó y se pesó las cápsulas. Se calculó el porcentaje de extracción o eficiencia del solvente. (WHO, 1998, 115-118)

7.4.1 Tamizaje fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro

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

7.4.1.1 Investigación de alcaloides:

- *Ensayos macro y semi-micro:*

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregó 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego se añadió 25 mL de metanol a 60°C. Se Filtró con papel filtro Whatman 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: se agregó 5 gotas de reactivo de Mayer,s.

Tubo 2: se agregó 5 gotas de reactivo de Dragendoff.

Tubo 3: se agregó 5 gotas de reactivo de Wagner.

Tubo 4: Testigo.

Se utilizó 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.

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaca.

Solución estándar: solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10µL).

Fase móvil: acetato de etilo, metanol, agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilodietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético –agua (4:1:1).

Fase estacionaria: placa de silica gel 60 F254,

Detección: sin tratamiento químico en UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos

fluorescen azul o amarillo. Con Reactivo Dragendorff en Visible se ven zonas cafés o

naranjas, los colores no son estables.

7.4.1.2 Determinación de Flavonoides y Antocianinas:

Ensayo macro y semi-micro:

Se disolvió 3g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregó 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción se tornó incolora. Se disolvió el residuo en 30 ml de metanol al 80 por ciento, se filtró y se 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 por ciento (p/v).

Tubo 3: Se agregó 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se calentó en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: Se agregó magnesio metálico y 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: Se agregó un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: Testigo.

Se evaluó las reacciones: Cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

• *Ensayo en cromatografía de capa fina:* Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaca.

Solución estándar: se preparó una solución 0.05 por ciento en metanol y cerca de 10 µL son utilizados para cromatografía. El límite de detección para flavonoides es de 5 a 10 µg.

Fase móvil: n-butanol: ácido acético glacial: agua (40:10:50 ó 20:5:25)

Fase Estacionaria: Silica gel cromatofolios de aluminio de 60 F264

Detección: revelador: Reactivo de productos naturales (NP/PEG). Un típico color fluorescente intenso en UV-365 nm es producido

inmediatamente al agregar el revelador, ó después de 15 minutos. La adición de propilenglicol disminuye el límite de detección de 10 µg a 0.5 µg. (NP: Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina. PEG; Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000).

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

7.4.1.3 Investigación de Antraquinonas:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%, se concentro en baño de maría a una temperatura cerca de 60 grados centígrados, Se disolvió el residuo con 30 ml de agua destilada y se filtró. Se extrajo con 10 ml de benceno. A la fase bencénica añadir 5 ml de solución de test de amonio y se agitó. Se observó cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 10 µL que son utilizados para la cromatografía.

Solución estándar: solución 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas 10 µL

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), acetato de etilo-metanol-agua (100-13.5-10).

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F264

Detección: Sin tratamiento químico fluorescente en UV 254, fluorescente color amarilla o rojo-café en 365 nm, spray revelador; solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento, para antraquinonas: zona rojas en visible y fluorescencia roja en UV- 365 nm, para antronas y antranolas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365nm.

7.4.1.4 Investigación de Cumarinas:

Ensayo macro y semi-micro:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregó 1 ml de aguadestilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha se agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N. Se observó bajo luz ultravioleta de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

• *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 20 µL en la cromatoplaça.

Solución estándar: Preparar una solución de canela en metanol al 1 por ciento, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina).

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7), tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 ml de tolueno y 50 ml de éter son mezclados durante 5 minutos con 50 mL de ácido acético al 10%, se filtra y se descarta la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter es usada)

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F264

Detección: Sin tratamiento químico; UV 245nm fluorescencia, todas las cumarinas muestran una intensa fluorescencia azul o verde-azul a UV 365 nm. Spray revelador: Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento, a UV 365 nm fluorescencia azul o verde-azul.

7.4.1.5 Investigación de Cardenólicos y bufadienólicos:

Presencia de lactonas insaturadas: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se colocó tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 ml) sobre un papel filtro. Se secó y se agregó unas gotas del reactivo Kedde. Se secó el papel filtro y se observó cambios de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Se usó como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 por ciento. Presencia de azúcares 2-desoxigendas: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se eliminó los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Se secó el residuo y se agregó 3 ml del reactivo Keller-Killiani. Se pasó a un tubo, se

mezcló y se resbaló 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).

• *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaca.

Solución estándar: digoxina 5 mg / 2 ml de metanol (20 μ L), lanatóside, A, B, C; oleandrin, K-strophantin.

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

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F264

Detección: Sin tratamiento químico; fluorescencia por cardenólicos en UV-265 nm, la mayor fluorescencia es debida a los bufadienólidos. Spray revelador reactivo de Kedde; Detección del anillo lactónico de los cardenólidos, zonas rosas o azul violeta en vis, los bufadienólidos no reaccionan. (Reactivo de Kedde: 5 ml de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 3% en etanol, mezclado con 5ml de NaOH 2M.)

7.4.1.6 Investigación de esteroides o triterpenoides:

Ensayos macro: Reacciones de color

1. Liebermann Burchard:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se aplicó unas gotas de ácido acético y 3 ml de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en las que las saponinas triterpenoidales dieron color rosado ó púrpura.

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

2. Acido tricloroacético:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se añadió unos cristales de ácido tricloroacético.

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

3. Carr- Price:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con cloroformo, se agregó 2 ml de tricloruro de antimonio al 30% en cloroformo.

Resultados: Color azul, posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillo A y B

6.7.1.7 Investigación de Saponinas:

Ensayos macro y semimicro

Prueba de espuma:

Tubo 1: 100 mg de extracto seco vegetal.

Tubo 2: 2 ml de control de saponinas (0.50%).

Tubo 3: 2 ml de agua.

A cada tubo se adicionó 10 mL de agua destilada. Se calentó en baño María a 60°C durante 30 minutos. Se enfrió, tapar los tubos, se agitó vigorosamente 30-40 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.

• Ensayo en cromatografía de capa fina:

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 25 - 40µL de esta solución en la cromatoplaca.

Solución estándar: una solución al 0.1 por ciento en metanol (10µL).

Fase móvil: Cloroformo-metano/agua (64:50:10), n-butanol-acético-agua (50:10:40)

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F254

Detección: Spray revelador: Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo. (Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o Vis zonas azules y verdes de saponinas esteroideas, rojas y violetas de triterpenoides). (Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas). (Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas)

7.4.1.8 Investigación de Principios Amargos:

Ensayo en cromatografía de capa fina:

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaça.

Solución estándar: Artemisina al 1 por ciento en metanol 20µL. Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo-metanol (95:5). Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F264.

Detección: revelador: vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafés-rojas. Azul-verdes. (Reactivo de Liebermann-Buchard: UV-365 nm: gris, café; VIS:café oscuro, gris)

7.4.1.9 Investigación de Taninos:

Ensayos macro:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50% y se evaporó a sequedad. Se añadió 25 ml de agua caliente al residuo y se agitó con varilla y se 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 a 5 gotas de gelatina al 1 por ciento (p/v).

Tubo 3: Se agregó 4-5 gotas de gelatina –sal (1% de gelatina y cloruro de sodio al 10 por ciento).

Tubo 4: Se agregó 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Se observó la formación de precipitado y/o cambio de coloración. Cloruro férrico: grisáceo negro; catecol; negro-azulado: pirogalo.

7.4.1.10 Investigación de Glicósidos Cianogénicos:

Ensayo macro:

Prueba de Guignard: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%, se adicionó 1 ml de cloroformo. Por aparte, se introdujo una tira de papel whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente se secó. La tira de papel húmedo se insertó en el erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque 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 de maría a 37°C durante 3 horas o más. Se observó cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo ó rojo-café).

7.4.1.11 Investigación de Aceites Volátiles:

Ensayo semimicro:

Método A: Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 20-50 µL en la cromatoplaca.

Solución estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3µL) Fase Móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7) Fase Estacionaria: Silica gel

cromatofolios de aluminio de 60 F254

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

7.4.1.12 Investigación de Esteroles insaturados:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50% y se concentró a sequedad. Se removió pigmentos vegetales con porciones de 10 ml de éter de petróleo hasta que el éter salga incoloro. Se adicionó 10

ml de benceno y se agitó durante unos minutos. Se descartó en un tubo y se secó con sulfato de sódio anhidro. Se filtró y se dividió en 3 tubos:

Tubo 1: Se agregó 3 gotas de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (Liebermann-Buchard)

Tubo 2: Ensayo de anillo Se agregó ácido sulfúrico concentrado (prueba de Salkowski).

Tubo 3: Testigo.

Se usó como estándar una solución de colesterol en cloroformo 0.1 por ciento. Se observó cambios de coloración inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un período de una hora. Prueba de anillo: En presencia de esteroides insaturados, formación de un anillo rojo cereza en la interfase.

7.4.1.13 Investigación de Sesquiterpenlactonas

Ensayos macro y semimicro:

Prueba de Legal: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%,

agregar 1 ml de solución fresca de nitroprusiato de sodio 0.5% en agua y 1-4 gotas de KOH 2N. Se presentaron colores característicos rojo oscuro, para lactonas α y β insaturada.

Prueba de Baljet: a) 1 g de ácido pícrico en etanol al 95%, b) 10 g de NaOH en 100 ml de agua. Se mezcló a) y b) y se añadió a la muestra (Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%.) unas gotas del reactivo, se presenta un color rojo claro a oscuro.

7.4.1.14 Procedimiento para la cuantificación de flavonoides expresados como rutina

- *Solución Madre*: Se preparó en un balón de 10ml el extracto seco a una concentración de 1/10 en solución etanólica al 50 % (el mejor disolvente).
- *Preparación de referencia*: Se pesó 10mg de la sustancia de referencia de rutina y se disolvió en metanol absoluto, se llevó al aforo de 10ml
- *Solución 1*: Se colocó 2ml de solución madre y 2ml de $AlCl_3$ al 2% m/v en un matraz aforado de 25ml y se llevó al aforo con metanol absoluto.
- *Solución 2*: Se colocó 2ml de solución madre en un matraz aforado de 25ml y se llevó al aforo con metanol absoluto.
- *Solución 3*: Se colocó 2ml de la preparación de referencia y 2ml de cloruro de

aluminio al 2% m/v en un matraz aforado de 25ml. Se llevó al aforo con metanol absoluto.

- *Solución 4*: Se colocó 2ml de la preparación de referencia en un matraz aforado de 25ml y se llevó al aforo con metanol absoluto.
- *Procedimiento*: Se midió la absorbancia de la solución 1, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 2. se midió la absorbancia de la solución 3, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 4.
- *Cálculos*: % de flavonoides totales expresados como rutina donde

$(A_1 = \text{Absorbancia de la muestra} * P_2 = \text{peso del estándar de referencia} *$

$V_2 = \text{Volumen del aforo de referencia}(10ml)) / (A_2 = \text{Abs de la preparación de referencia} * P_1 = \text{Peso de la muestra} * V_1 = \text{Volumen de aforo de la muestra}(250ml))^{(23)}$.

7.4.1.15 Uso del destilador Neocleavenger

- Se instaló el destilador de aceites esenciales (ver anexo No.), se conectó el balón de destilación con el recipiente colector.
- Se conectó la bomba que circula la solución de enfriamiento poner el refrigerante.
- Se llena con agua el tubo N hasta el nivel B del tubo graduado.
- Se agrega 2ml de un disolvente orgánico (pentano) en el tubo K utilizando una pipeta pasteur y se coloca el tapón al tubo hasta que empiece a destilar el aceite.
- Se destilo a temperatura constante durante 2-3 horas o según lo especifique la literatura para cada especie, mantener el flujo de destilación de 2-3ml por minuto.
- Se determina 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.
- Esperar 10 minutos después de terminar el calentamiento antes de coleccionar el aceite.
- Se abre la llave, dejar caer el agua y descartarla. Se recibió la parte orgánica en un balón de 125ml y se agregó al tubo K aproximadamente 1ml de disolvente orgánico utilizado anteriormente, se lava y se arrastra todo el aceite recuperado.
- Se eliminó el disolvente orgánico utilizando rotavapor.
- Se pesó el aceite obtenido, se vertió en el vial de color ámbar y se almaceno 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.

7.4.1.16 Determinación de los componentes del aceite esencial por medio de cromatografía de gases.

La muestra se preparó con 2µL del aceite y se diluyó a 1ml con metanol. El extracto obtenido se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas para su identificación.

El cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas tiene una columna HP5 de 30 metros de largo y 0.5 µm de espesor de la fase líquida con un diámetro interno de 0.64 pulgadas de columna capilar.

La rampa que se utilizó para la separación es la siguiente:

- Temperatura del puerto de inyección fue de 250°C.
- Temperatura del detector fue de 280°C.
- Temperatura de la columna inicial fue de 50°C con un tiempo de espera de 3 minutos y luego un incremento de 20°C por minuto hasta llegar a 250°C.

El cromatógrafo de gases tiene para la identificación de sustancias presentes en la muestra una librería (Chem Statium) en la cual contiene la mayor parte de sustancias químicas identificadas por su número de CAS lo que le permite sin necesidad de inyectar patrones, la identificación inequívoca por comparación de iones de los aceites presentes en la muestra. (Cáceres, A, 1998, 195-202)

7.4.2 Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

Las bacterias son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 24 – 48 horas en medios artificiales específicamente diseñados. El tamizaje de la actividad antibacteriana consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de una bacteria determinada en condiciones estándar

con una concentración previamente determinada como punto de corte (500-1000 mg/ml) de un extracto, fracción o compuesto obtenidos de una droga vegetal. Se realizó 4 replicas de cada bacteria.

7.4.2.1 Preparación de Agar-Planta:

- Se prepararon tubos con 9.0 mL Mueller Hinton.
- Se esterilizaron 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.

7.4.2.2 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 Tripticasa 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.

7.4.2.3 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 %.

7.4.2.4 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.

7.4.2.5 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.

Se Realizó la lectura y se interpretó:

- 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. (Mitscher LA, 1987, 1025-1041)

7.4.3 Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

7.4.3.1 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.

7.4.3.2 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.

7.4.3.3 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).

7.4.4 Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

7.4.4.1 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.

7.4.4.2 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.

7.4.4.3 Inoculación de hongos filamentosos en placa

- Se abrieron cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham 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.

7.4.4.4 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. (Cáceres A. 1993, 207-213)

7.4.5 Tamizaje de la actividad larvicida

7.4.5.1 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.

7.4.5.2 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 %).

7.4.5.3 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. (Brancato FP y Golding NS, 1983, 848-863)

7.4.6 Citotoxicidad con *A. salina*

7.4.6.1 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.

7.4.6.2 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).

7.4.6.3 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.

7.4.6.4 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. (Thompson CG y Abramovitz M, 1956, 123-125)

7.5 Diseño de la investigación:

Se realizó un estudio para determinar la actividad biológica *in vitro* (antimicrobiana, larvicida y citotóxica) del extracto etanólico de las hojas de *S. harwegii*.

7.5.1 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 tratamiento el extracto de la planta.

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.

7.5.2 Actividad larvicida

Se realizó un ensayo en la microplaca y se agregó por triplicado: 100 μL 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 la 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.

7.5.3 Actividad citotóxica

Se realizó un ensayo contra *A. salina*. Se agregó por triplicado en una microplaca 100 μL 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.

7.5.4 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.

7. RESULTADOS

8.1 Caracterización Fisicoquímica

El porcentaje de humedad de las hojas no fue mayor del 10% (ver cuadro No. 1), se realizó la prueba de sólidos totales obteniendo como mejor solvente etanol al 70% (ver cuadro No.2), el pH del extracto etanólico fue levemente ácido, densidad 0.9296 g/ml y porcentaje de rendimiento fue de 1.34% como se puede observar en los cuadro (No. 3, No. 4)

Cuadro No. 1

Determinación de Humedad en Hojas

No. De lecturas	Porcentaje de Humedad
1	7.05
2	7.07
3	7.04
4	7.06

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

Cuadro No 2.

Prueba de Sólidos Totales

Sólidos Totales (g)		
50%	70%	95%
6.9349	12.8771	2.4378

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente

Cuadro No.3

Parámetro Fisicoquímicos

Muestra	PH	Densidad
<i>S. hartwegii</i>	6.55	0.9296 g/ml

Cuadro No. 4

Rendimiento de Extracto.

	Gramos de muestra	Gramos de extracto	Porcentaje de rendimiento
Hojas	299.20	4.00	1.34

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente.

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

8.2 TAMIZAJE FITOQUIMICO

Las pruebas cualitativas preliminares y la cromatografía en capa fina evidenciaron la presencia de metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides y antocianinas, cumarinas, saponinas, principios amargos, Aceites volátiles. (ver cuadro No. 5 y No.6)

Cuadro No.5

Prueba	Reacción			Resultado
Alcaloides	Prueba de Dragendoff: color crema	Prueba de Mayer's Color naranja	Prueba de Wagner: Color marrón	+
Flavonoides y antocianinas	Los 5 tubos examinados mostraron coloración amarilla, lo que se sospecha la presencia de isoflavonas			+
Antraquinonas	No se presentó ninguna reacción			-
Saponinas	Presentó 5cms de espuma			+
Taninos	No se presentó ninguna reacción			-
Cumarinas	coloración verde. Fluorescencia intensa a la luz UV			+

Cuadro No.6

Prueba	Reacción	Resultados	Estándares	RF	Revelador
Alcaloides	Zonas color naranja (VIS)	Rf=0.58 Color naranja	Atropina Papaverina Reserpina	Rf=0.20 Rf=0.25 Rf= 0.15 Todos Color naranja VIS	Dragendorff
Saponinas	Zonas Azules, Violetas, amarillentas UV 365 nm.	Rf1=0.22 Color amarillo Rf2=0.54 Color amarillo	Solución de Saponinas al 0.1% (Color amarillo)	Rf2=0.40	Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico
Flavonoides y Antocianinas	Fluorescencia intensa bajo UV a 365 nm.	Rf1=0.15 Color amarillo Rf2= 0.13 Color naranja Rf3= 0.11 Color azul Rf4= 0.18 Color verde	Quercitina (Color amarillo) Hiperósido (color naranja) Rutina (Color naranja) Ácido Clorogénico (Color Verde)	Rf= 0.15 Rf=0.13 Rf= 0.12 Rf= 0.10 Rf= 0.14 Todos bajo la luz UV	Reactivo de productos naturales NP/PEG
Aceites Volátiles	Zonas rojas, cafés, azules y verdes en visible.	Rf1=0.12 Color café Rf2=0.19 Color Rojo	Eugenol (Color azul) Linalool (Color Azul) Timol (Color Rojo) Carvacol (Color azul-violeta)	Rf=0.23 Rf=0.34 Rf=0.50 Rf=0.78	Vainillina / ácido sulfúrico
Principios amargos	Zonas rojas – violetas, Cafés – rojas, azules- verdes en visible.	Rf1=0.91 Rojo-violeta Rf2= 0.76 Café	Neurolena lobata (Color Café) (Color Rojo-	Rf=0.89	Vainillina / ácido sulfúrico al 5 %.

Cumarinas	Fluorescencia azul o verde bajo la luz UV 365 nm.	RF= 0.31 Color azul fluorescente	Violeta) Cumarinas (Color fluorescencia azul)	Rf= 0.20 Rf= 0.40 (Bajo la luz UV)	Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5%
-----------	---	-------------------------------------	--	---	--

Cuadro No. 7

Cuantificación de Flavonoides en el extracto etanólico de las hojas de *S. hartwegii* mediante espectrofotometría.

No. De Replicas	Absorbancias	Peso en gramos	Volumen de aforo de referencia	% Flavonoides Expresados como rutina
1	0.070454	0.2	10ml	1.54
2	0.092975	0.2	10ml	2.11
3	0.073770	0.2	10ml	1.34
4	0.068574	0.2	10ml	1.20
Promedio				1.54
Desviación Estándar				0.400
Rutina 10%				
1	0.22925	0.01	10ml	
2	0.22069	0.01	10ml	
3	0.27441	0.01	10ml	
4	0.28565	0.01	10ml	

% de flavonoides = $\frac{\text{Abs de la Muestra} \times \text{peso de rutina} \times \text{volumen aforo rutina}}{\text{Abs de Rutina} \times \text{peso de la muestra} \times \text{volumen aforo muestra}}$

8.4 Constituyentes identificados por Cromatografía de Gases con detector selectivo de masas

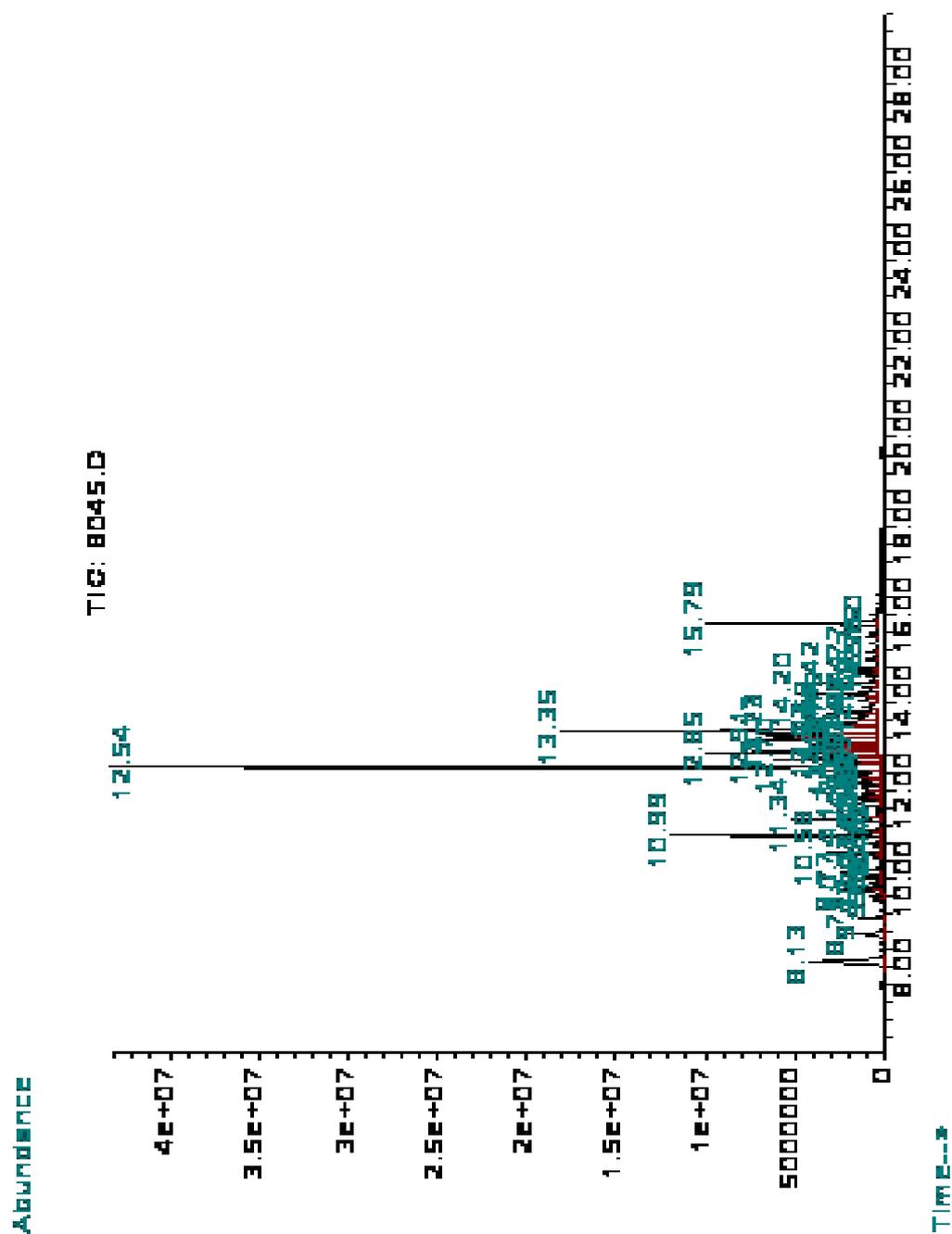
Cuadro No. 8

Se identificaron 51 compuestos de aceites esenciales presentes en la muestra y el de mayor porcentaje de área fue el Nerolidol

Tiempo de Retención (Minutos)	Compuesto	% de Área
8.13	Limoneno	3.40
8.75	Linalool	1.18
9.60	Terpinen-4-OL Acido tiosulfurico	0.26
9.71	No identificado	0.40
9.77	Trans-Dihidrocarvona	0.93
9.91	Isodihidrocarveol	0.36
10.03	Cis-dihidrocarveol	0.44
10.14	Geraniol	0.95
10.47	Timol	0.20
10.57	Fenol-2-metil-5-(1-metiletil)	1.33
10.70	Teaspiran B	0.30
10.82	Teaspiren A	0.20
10.99	acetato α – terpinenil	3.89
11.06	Eugenol	0.69
11.34	Metileugenol	1.61
11.39	Ciclohexano-1,2,3-trimetil	0.46
11.70	Trans-beta-farnese	1.05
11.83	Ciclododecanol	0.63
11.88	Tetradecametilcicloheptasiloxano	0.38
11.97	2-metiltridecano	0.59
12.07	1,2,3,6,10-Dodecatetrafasen	0.71
12.17	B-Bisaboleno	1.24
12.38	Cis- α - bisabolen	1.16

12.54	Nerolidol	26.74
12.63	No identificado	1.05
12.71	No Identificado	2.06
12.78	No identificado	1.15
12.85	Ciclopropano Espatuleno	3.88
12.92	Oxido cariofileno	2.76
12.97	Gama-Gurjuneno	1.39
13.04	No identificado	1.65
13.07	Isocamfano	0.94
13.17	Delta-Selineno	3.77
13.23	α -chamigren	3.28
13.35	2-Naftaleno-eudesmol	12.42
13.46	2,4-diidopropenil-1-metil.1.vinil	1.08
13.53	1.metil-2-(3metil-2-butano)	2.16
13.65	No identificado	1.19
13.76	Beta-oplopeno	1.26
14.06	7-azulmetileno	0.57
14.14	2,6,10-trimetilneofitadieno	0.62
14.20	No identificado	1.54
14.42	Acido 1,2-Benzenedicarboxilico	1.69
14.67	No identificado	0.48
14.77	No identificado	0.60
14.96	Acido 1,2-benzenedicarboxilico	0.27
15.16	Ácido haxadecanoico	0.27
15.50	No identificado	0.34
15.79	Fitol	3.60

GRAFICA No. 1
Compuestos de Aceites Esenciales
Tiempo de retención (minutos) Vrs. Porcentaje de área



8.5 Tamizaje de la actividad antimicrobiana

Se realizó la actividad antibacteriana del extracto etanólico 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 no fue inhibido se consideró que el extracto tenía actividad negativa (-). (Cuadro No. 9)

Cuadro No.9

Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro* a concentración 1mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *S. hartwegii*.

Bacterias	Resultado	Actividad Biológica
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Negativo
<i>Salmonella typhi</i>	-	Negativo
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-	Negativo
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	-	Negativo

Fuente: Experimental. (+). Actividad positiva sin crecimiento microbiano, (-) Actividad negativa con crecimiento microbiano.

Nota: $p > 0.10$

8.5 Tamizaje de la actividad antifúngica

En las siguiente tabla se muestra el resultado de la actividad antifúngica del extracto etanólico contra hongos levaduriformes (*C. albicans* y *C. neoformans*). Cuando el crecimiento del microorganismo no fue inhibido se consideró que el extracto tenía actividad negativa (-). (Cuadro No.10)

Cuadro No.10

Tamizaje de la actividad antifúngica *in vitro* a una concentración 1mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *S. hartwegii*

Hongo levaduriforme	Resultado	Actividad Biológica
<i>Candida albicans</i>	-	Negativo
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	Negativo

Fuente: Experimental. (+). Actividad positiva sin crecimiento microbiano, (-) Actividad negativa con crecimiento microbiano.

Nota: $p > 0.10$

8.6 Tamizaje de la actividad antifúngica

En las siguiente tabla se muestra los resultados de la actividad antifúngica del extracto etanólico de los hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*). Cuando el crecimiento del microorganismo no fue inhibido se consideró que el extracto tenía actividad negativa (-). (Cuadro No.11)

Cuadro No.11

Tamizaje de la actividad antifúngica *in vitro* a una concentración 1 mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *S. hartwegii* de los extractos etanólicos

Hongo filamentosos	Resultado	Actividad Biológica
<i>Aspergillus niger</i>	-	Negativo
<i>Aspergillus flavus</i>	-	Negativo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Negativo
<i>Microsporum gypseum</i>	-	Negativo
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	Negativo

Fuente: Experimental. (+). Actividad positiva sin crecimiento microbiano, (-) Actividad negativa con crecimiento microbiano.

Nota: $p > 0.10$

8.7 Determinación de la actividad larvicida

Esta prueba se realizó con el extracto etanólico de la planta 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 consideró 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 el extracto es mayor de 1 mg/ml. (Cuadro No.12)

Cuadro No.12

Actividad larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus* a una concentración de 1mg/mL

Extracto	<i>Aedes aegypti</i>				<i>Anopheles albimanus</i>			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
<i>Solanum harwegii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

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

las larva

8.8 Actividad Citotóxica:

Se evaluó el extracto etanólico a una concentración de 1.0mg/ml y se observó muerte total de los nauplios de *Artemia salina*, por lo que se realizó de nuevo la prueba con diferentes concentraciones, las cuales fueron: 0.5, 0.25, 1.25mg/ml y se observaron los siguientes resultados.

Cuadro No. 13

Concentración mg/ml	Nauplios vivos al inicio de la prueba			Nauplios vivos al final de la prueba		
1.0	12	13	12	0	1	0
0.5	10	14	11	3	8	6
0.25	12	12	10	6	5	6
1.25	10	12	13	6	7	6

Concentración letal media (CL₅₀) del extracto etanólico de las hojas de *S. hartwegii*. = 0.227

9. DISCUSIÓN

Se recolecto las hojas de *S. hartwegii* (lavaplatos) en Patzún, Chimaltenango y se realizó la identificación botánica de la especie al herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia BIGU.

La determinación de las pruebas físicas y fisicoquímicas de la droga vegetal es de suma importancia para su identidad y pureza. El porcentaje de humedad reportado en el cuadro No.1 determina el contenido de agua residual en la materia vegetal desecada, así como también, toda materia volátil (agua, aceites, alcoholes, etc) que se elimina por el proceso de calentamiento y el cual no debe exceder del 10%, ya que podría darse hidrólisis de los constituyentes y crecimiento de microorganismos. El porcentaje de humedad de hoja fue 7.05%, se determinó que el mejor solvente en el cual se extrajo la mayor cantidad de sólidos totales presentes en la hoja de *S. hartwegii* fue el etanol al 70 por ciento. (Ver cuadro No. 2).

La obtención del extracto etanólico de las hojas de *S. hartwegii* se realizó por medio del método de percolación, concentrando en el evaporador rotatorio. presentándose un porcentaje de rendimiento de 1.34%, este resultado depende de factores tales como: época de corte, grado de humedad del material vegetal, proceso de secado, sistema de cultivo y el método de extracción. Todos estos factores influyen en el porcentaje de rendimiento de la obtención del extracto de la especie en estudio. Como se muestra en el cuadro No. 3 y No. 4 se muestra los resultados de pH 6.55 levemente ácido y densidad relativa de 0.9296. Se realizó el tamizaje fitoquímico con pruebas cualitativas (macro y semi-micro en cromatografía en capa fina) para caracterizar los posibles metabolitos secundarios. Se determinó que los extractos de la planta presentaron: aceites volátiles, alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos y principios amargos. (ver anexo No.4) Estos metabolitos secundarios 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. Los alcaloides son reconocidos por su actividad sobre el sistema nervioso central y su actividad citotóxica y anticancerígena.

El Cuadro No.7 muestra los resultados de cuantificación de flavonoides totales. El promedio obtenido fue de 1.54 por ciento. En el cuadro No. 8 presenta los resultados de la identificación de los aceites esenciales utilizando el cromatógrafo de gases acoplado a masas se identificaron 51 compuestos el más abundante fue Nerolidol con un porcentaje de área de 26.74% (Ver grafica No.1)

El ensayo *in vitro* para evaluar la actividad biológica 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 extracto etanólico de *S. harwegii* no presentó actividad antimicrobiana contra Gram positivo *S. aureus* y *B. subtilis*, bacterias Gram negativo *S. typhi*, *P. aeruginosa* y *E. coli* y la micobacteria (*M. smegmatis*) a una concentración de 1mg/mL, y tampoco presentó actividad antifúngica con hongos levaduriformes (*C. albicans* y *C. neoformans*), hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* a una concentración 1mg/ml. (Cuadro No.9, No. 10, No.11)

El extracto de la planta estudiada no mostraron actividad larvicida contra las dos especies de mosquitos *A. aegypti* y *A. albimanus* ensayados y sus diferentes estadios. (Cuadro No. 12)

La actividad citotóxica del extracto etanólico contra *Artemia salina* a diferentes concentraciones 0.5, 0.25, 1.0, 1.25mg/ml, mostró una CL50 (concentración letal media) de 0.227mg/ml. mediante el programa de finney (cuadro No.13)

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El mejor disolvente para las hojas de *S. hartwegii* (lavaplatos) según la cantidad de sólidos totales extraíbles es etanol al 70%.
- 10.2 En el extracto seco de las hojas de *S. hartwegii* (lavaplatos) obtuvo 1.34 % de Rendimiento.
- 10.3 Los metabolitos secundarios presente en el extracto seco fueron aceites volátiles, alcaloides, cumarinas, antocianinas, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, principios amargos.
- 10.4 El extracto seco de la hojas presentan un porcentaje de flavonoides de 1.54
- 10.5 El extracto se evaluó el cromatógrafo de gases acoplado a masas obteniendo 51 compuestos el mayor porcentaje de área es el nerolidol 26.74%
- 10.6 La especie *S. hartwegii* no presentaron actividad contra los microorganismos *B. subtilis* y *C. neoformans*, *M. smegmatis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* , *M. gypseum* *B. subtilis* y *M. smegmatis*
- 10.7 El extracto etanólico de la especie *S. hartwegii*, no presentó actividad larvicida contra las larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*, a dosis ensayadas.
- 10.8 El extracto etanólico de la especie *S. hartwegii* presentó actividad citotóxica contra los nauplios de *A. salina* de 0.227 mg/ml

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar otros estudios de diferentes regiones de Guatemala de la especie de *S. hartwegii*
- 11.2 Evaluar la especie en diferentes épocas de colecta, lugares de procedencia y disolventes de extracción para determinar si presenta variabilidad la actividad biológica y componentes fitoquímicos.
- 11.3 Realizar otro tipo de estudios como la determinación de actividad antioxidante contra otros microorganismos debido a los metabolitos encontrados y las propiedades que presenta la hoja.

12. REFERENCIAS

1. Albornoz A. (1980) Productos Naturales: estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas. 2 ed. Limusa, Venezuela.
2. Anderson JE, Goetz CM & Mc Laughlin JL. (1991). A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical analysis*.
3. Brancato FP & Golding NS. (1983). The diameter of the mould as a reliable measure of growth. *J. Mycol.*
4. Brulingame EM & Reddish GP. (1973). Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *J. Lab. Clin. Med.*
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. *J. Ethnopharmacol.*
6. Cáceres, A. et al. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American tripanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62:195-202.
7. Calderón PJ, et al. (1968). "Factors Influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hidrolizable tannins". USA: *J. Arg. Food chem.*
8. Claus MP. (1996) "Chemistry and Biological Activities of Plants of the Genus *Neurolaena*". 2 ed. Limusa. Costa Rica:
9. CYTED. (1993). Manual de Técnica de Investigación. Proyecto X-1. Bogotá.

10. Hernández I. (2008) Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio, de hojas de *Solanum harwegii* Benth (Huiz), Hojas de *Litsea guatemalensis* Mez. (Laurel), y de Hojas de Piper jacquemontianum Kunth (Cordoncillo). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala
11. Kuklinki, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona.
12. Medinilla A. BE. (1988) Manual de Laboratorio de Fotoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: universidad de San Carlos.
13. Thompson CG & Abramovitz M. (1956). Artemia salina as a test organism for bioassay. Science.
14. Mitscher LA. Et. Al (1972). Antimicrobial agent from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. Lloydia.
15. Pahlow. M. (1979) El Gra Libro de las Plantas Medicinales. 2 ed. Everest, España:
16. Pajares D. (2005) Efecto Tripanostático de *Solanum hartwegii* sobre dos capas de tripanosoma cruzi de alta y baja parasitemia. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
17. Porras CP. (1996) Alcaloides de Hippeastrum Solandriiflorum. Universidad de Barcelona, España.
18. Santa Cruz, L. (1987) Manual. Selección fitoquímica. Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímicas. Universidad de San Carlos de Guatemala.(
19. Sandberg F, et al, (1990) Manual práctico de investigación farmacológica de plantas medicinales. Antanarivo Madagascar (INUDI) Mexico.
20. Vila, R & Reing, M. (2003). Métodos de control de Calidad. UB Virtual, Imicromat.

21. Wagner, H. et. al. (1984). Plan Drug Analysis. Springer-Verlag Berlin.
22. WHO (1998) Quality control methods for medicinal plant materials. WHO. Geneva.

13. ANEXOS

Anexo No1. Cálculos para determinar el porcentaje de rendimiento del extracto.

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{g de extracto}}{\text{g de Muestra}} \times 100$$

Anexo No.2 : Propiedades Físicas y Fisicoquímicas del extracto etanólico



Fig.1 pH



Fig.2 Densidad



Fig.3 Sólidos Totales

Anexo No.3: Preparación del extracto de las hojas de *S. hartwegii*



Fig. 4 Extracción por percolación
Rotavapor



Fig. 5 Concentración utilizando
Rotavapor

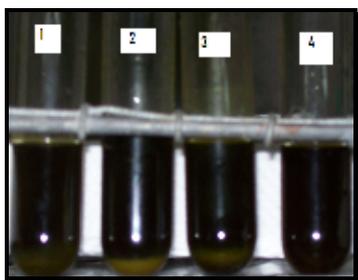
Anexo No.4

TAMIZAJE FITOQUIMICO

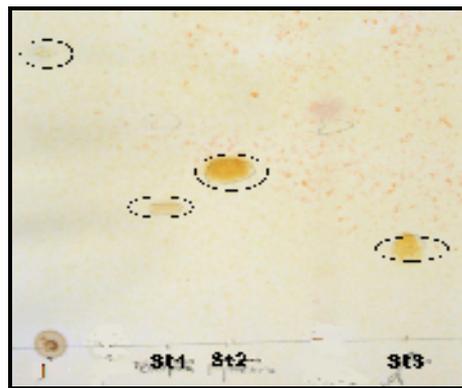
Alcaloides

Prueba en tubos de ensayo
fina

Cromatografía en capa



Tubo 1: Reactivo de Mayer's, Tubo 2 Reactivo de reserpina, St2: Dragendorff, Tubo 3 Reactivo de Wagner, Tubo 4 Testigo (Rf=0.20)



1. *S. hartwegii*, (Rf= 0.58) St1:
Papaverina (Rf=0.25), St3: atropina

FLAVONOIDES Y ANTOCIANINAS

Prueba en tubos
fina.

Cromatografía en capa

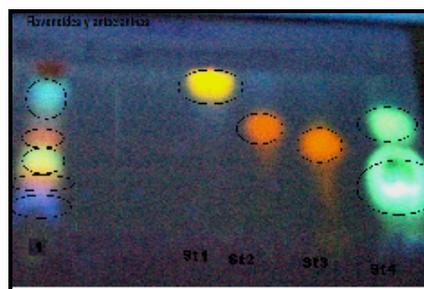


Tubo 1: extracto + ácido sulfúrico conc.

Tubo 2: extracto + Cloruro Ferrico.
naranja)

Tubo 3: extracto + ácido sulfúrico conc. + calor
Rf=0.14 color verde)

Tubo 4: extracto + magnesio metálico + ácido clorhídrico conc.
Tubo 5: NaOH



1. *S. hartwegii*(Rf1= 0.15, Rf2= 0.13,
Rf3=0.11, Rf4=0.18 St1. Quercetina
(Rf= 0.15 color amarillo)

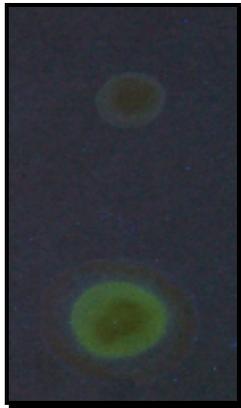
St2: Hiperósido (RF=0.13, color
St3:Rutina color naranja (Rf=0.12 color
naranja)

St4:Acido Clorogénico (Rf= 0.10,

Todos bajo la luz UV

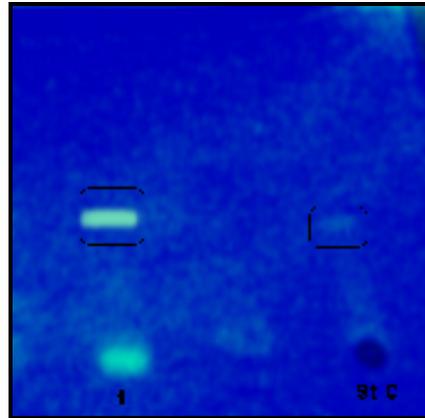
CUMARINAS

Prueba con hidróxido de potasio 0.5 N



1. *S. hartwegii*

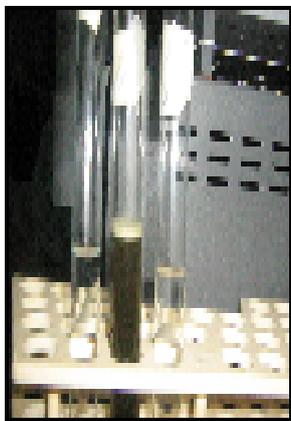
Cromatografía en capa fina



1. *S. hartwegii* ($R_f=0.31$ color azul)
St: Cumarinas ($R_f=0.40$ color azul)

Saponinas

Prueba de Espuma
capa fina



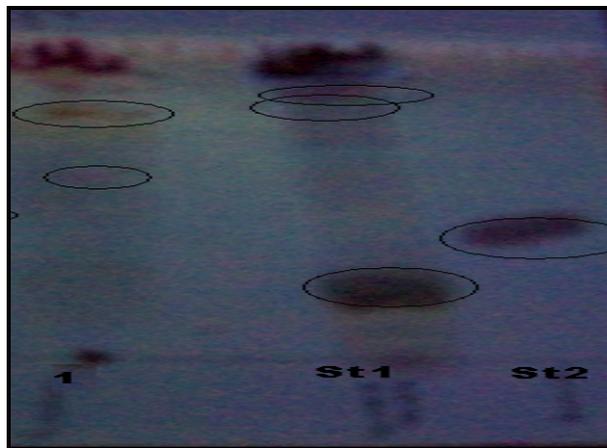
Cromatografía de



1. *S. hartwegii* ($R_{f1}=0.22$, $R_{f2}=0.54$ color amarillo) St: Solución de saponinas al 0.1 % ($R_f=0.40$)

Principios Amargos

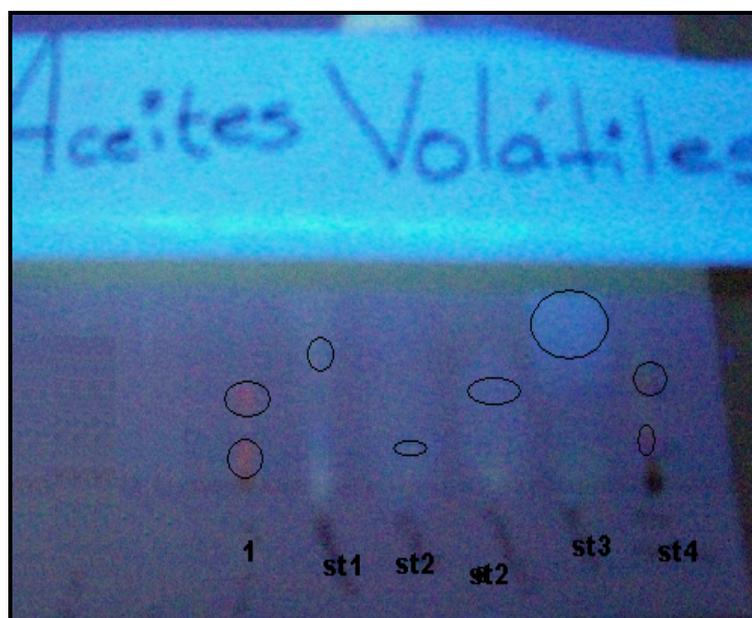
Cromatografía de capa fina



1, *S. hartwegii* ($Rf_1=0.91$ color rojo-violeta, $Rf_2= 0.76$ color café) St1, St2; *Neurolena lobata*, ($Rf =0.89$, $Rf= 0.20$ color café, Rojo-violeta)

Aceites Volátiles

Cromatografía en capa fina



1 *S. hartwegii* ($RF= 0.12$ color café, $RF_2=0.19$ color rojo) St1: Eugenol ($Rf=0.23$ color azul) St2 linalool ($Rf=0.34$ color azul) St3: timol ($Rf=0.50$ color rojo), St4: carvacol ($Rf=0.78$ color azul-violeta)

Anexo No. 5 Tamizaje Biológico

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



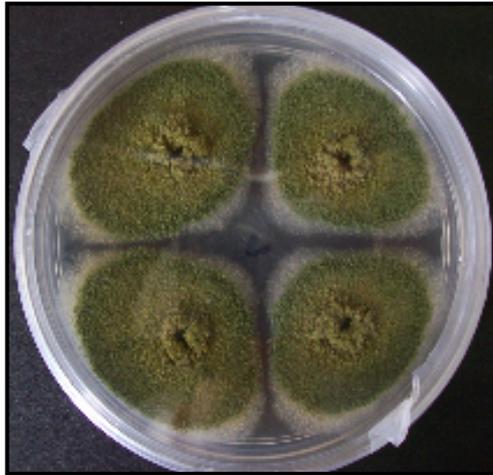
Bacterias Gram positivo (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), bacteria Gram negativo (*Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y micobacteria (*Mycobacterium smegmatis*).

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTILEVADURA



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

TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA



Aspergillus flavus



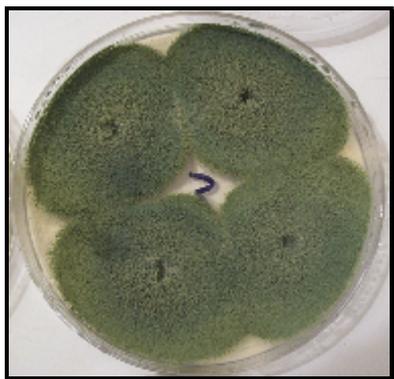
Aspergillus niger



Trichophyton rubrum

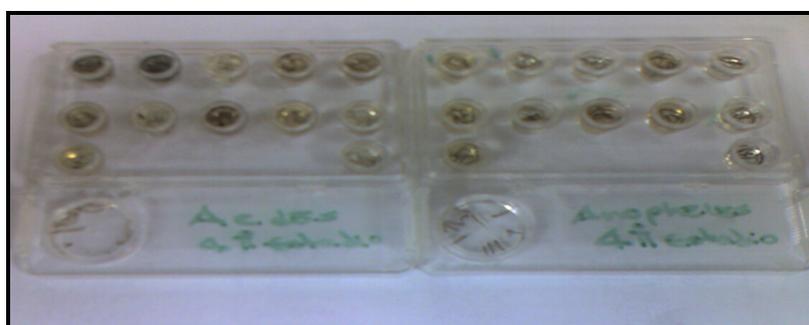
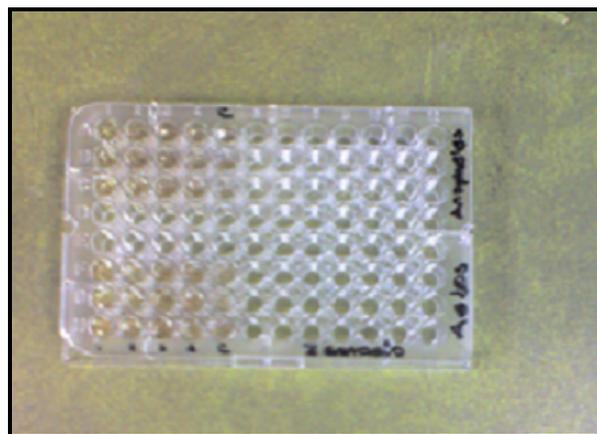


Microsporum gypseum



Aspergillus fumigatus

TAMIZAJE CONTRA LA ACTIVIDAD LARVICIDA



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