

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



Determinación de la presencia de piretrinas, evaluación de actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* y citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina* en fracciones de los extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

María Celeste Mendoza Prillwitz

Química

Guatemala, Noviembre de 2016

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

Determinación de la presencia de piretrinas, evaluación de actividad larvica contra larvas de *Aedes aegypti* y citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina* en fracciones de los extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

Informe de Tesis

Presentado por:

María Celeste Mendoza Prillwitz

Para optar al título de

Química

Guatemala, Noviembre de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elisa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

ACTO QUE DEDICO A

A Dios

A mis padres Roberto Mendoza y María Dolores Prillwitz de Mendoza

A mis hermanos Sergio, María Linda, María José, María Fernanda, María Dolores, Luis Enrique

A mi sobrino Eduardo Alejandro

A mis familiares

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mi camino y ser mi fortaleza.

A mis padres por enseñarme a luchar por lo que se quiere, por su amor, por su comprensión, por su entrega y sobre todo por su apoyo a lo largo de estos años. Me queda decirles que son lo que más amo en la vida y que son mi ejemplo más grande.

A mis hermanos por alegrarme la vida con su existencia, soy muy afortunada en tenerlos.

A mi sobrino por ser la personita más especial. Te amo Eduardo tu venida a este mundo alegró sin duda la vida de todos.

A mis tías, tíos y primos ya que sin su apoyo tampoco lo hubiera logrado.

A mis catedráticos ya que sus enseñanzas me han formado como profesional.

Al Departamento de Química Orgánica en especial a la Licda. Diana Pinagel por su confianza, me llevo experiencias únicas profesionales y personales.

INDICE

I.	Resumen -----	1
II.	Introducción-----	3
III.	Antecedentes -----	5
	A. Generalidades Biogénicas de Terpenos -----	5
	B. Origen de las unidades en C ₅ -----	6
	1. Vía del mevalonato -----	6
	C. Piretrinas -----	8
	1. Bioactividad de las piretrinas -----	9
	2. Obtención y Usos -----	10
	3. Ensayos -----	10
	D. Familia Asteraceae-----	10
	E. Género <i>Tithonia</i> -----	12
	F. <i>Tithonia tubaeformis</i> (Jacq.) Cass. -----	12
	1. Identificación y Descripción -----	12
	2. Biología y Ecología -----	13
	G. Trabajos de Investigación relacionados con <i>Tithonia tubaeformis</i> (Jacq.) Cass. -----	14
	H. Género <i>Lasianthaeae</i> -----	14
	I. <i>Lasianthaeae fruticosa</i> (L.) K. Becker-----	15
	1. Identificación y Descripción -----	15
	J. Trabajos de Investigación relacionados con <i>Lasianthaeae</i> <i>fruticosa</i> (L.) K. Becker-----	15
	K. Evaluación de la toxicidad en Plantas -----	16
	L. Ensayos de Citotoxicidad -----	17
	M. Bioensayo de Letalidad en <i>A. salina</i> -----	17
	N. Actividad contra larvas de insectos -----	19
IV.	Justificación -----	20
V.	Objetivos -----	22
VI.	Hipótesis -----	23
VII.	Materiales y Métodos -----	24
	A. Universo -----	24
	B. Muestra -----	24
	C. Recursos -----	24

1. Humanos -----	24
2. Materiales -----	24
D. Métodos -----	26
E. Diseño de Investigación -----	31
F. Análisis de Resultados -----	32
VIII. Resultados -----	34
IX. Discusión de Resultados -----	40
X. Conclusiones -----	43
XI. Recomendaciones -----	45
XII. Referencias -----	46
XIII. Anexos -----	50

I. RESUMEN

La investigación llevada a cabo permitió un estudio fitoquímico y de bioactividad, no experimental, transaccional y descriptivo de dos especies endémicas de Guatemala siendo estas *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker pertenecientes a la familia Asteraceae, de las cuales se conoce muy poco o no se cuenta con información respecto a su contenido de metabolitos secundarios.

A través de este estudio se determinó la presencia o ausencia de piretrinas, así como la determinación de actividad citotóxica y larvicida.

La identificación del material vegetal, se realizó en la Unidad de Investigación del Herbario BIGU. Se hizo por sonicación extractos hexánicos de hojas y flores de ambas especies realizándose el posterior fraccionamiento cromatográfico por cromatografía en columna (CC) y Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Se llevó a cabo el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) para la determinación de los compuestos presentes en todas las fracciones obtenidas. Además se evaluó la actividad citotóxica en nauplios de *Artemia salina* y larvicida en larvas de *Aedes aegypti* del estadio IV, en dichas fracciones.

Los resultados de los análisis por CG-EM demostraron la ausencia de piretrinas y la presencia en las fracciones estudiadas de alcanos de cadena larga y esteroides, siendo el componente más común en ambas especies el octacosano.

Se observó actividad citotóxica en la fracción dos (F2), correspondiente al fraccionamiento hexano/acetona (9:1) del extracto hexánico de hojas de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker, con un CL_{50} de 0.0800 mg/mL.

Para la actividad larvicida la fracción dos (F2), correspondiente a la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y la fracción ocho (F8), correspondiente al fraccionamiento hexano/acetona (9:1) del extracto hexánico de hojas de la especie *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass., presentaron actividad larvicida con un CL_{100} de 0.0995 mg/mL para F2 y un CL_{100} de 0.0951 mg/mL para F8.

A pesar de la ausencia de piretrinas, esta investigación aportó un estudio fitoquímico y biológico de las especies analizadas, donde los análisis cromatográficos por CG-EM

determinaron que el componente más común en ambas especies fue el octacosano y los ensayos biológicos revelaron resultados positivos en actividad citotóxica en la fracción dos (F2), como actividad larvicida en las fracciones dos y ocho (F2 y F8), según el procedimiento indicado.

II. INTRODUCCIÓN

Guatemala por ser un país con gran diversidad geográfica, permite el crecimiento de una variedad inmensa de especies de plantas, de las cuales muchas de ellas han demostrado su potencial para proveer compuestos que han servido como nuevas alternativas para combatir afecciones como plagas y enfermedades que afectan a nuestro país.

Las especies *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker, son pertenecientes a la familia Asteraceae. Son especies de amplia distribución y pueden encontrarse desde México, Centroamérica, hasta el norte de Venezuela. *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass., es una planta anual y se le puede encontrar en floración de junio a noviembre mientras que *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker, se le puede encontrar en floración y con fruto todo el año.

La finalidad del presente trabajo de investigación fue el de llevar a cabo un estudio descriptivo, no experimental y transaccional que permitió la determinación de la presencia de piretrinas, así como un estudio experimental para evaluar actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina* y actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* en ambas especies, debido a que estas han sido muy poco estudiadas en otros países y no han sido estudiadas en Guatemala, por lo cual no se cuenta con información química y/o biológica que pueda ser de importancia para un aprovechamiento de dichas especies.

El objetivo de este trabajo de investigación fue brindar un aporte al estudio fitoquímico y biológico así como un enriquecimiento al estudio de la biodiversidad florística que crece en Guatemala de las especies *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

La investigación se llevó a cabo a partir de las hojas y flores de las especies antes mencionadas, basando su identificación en caracteres morfológicos específicos a las que seguidamente se les realizó extracciones con hexano para la obtención de fracciones en las que se determinó la presencia y/o ausencia de piretrinas así como la evaluación de la actividad citotóxica y larvicida.

Para llevar a cabo dicho trabajo de investigación se utilizaron técnicas específicas como extracción por sonicación para la obtención de extractos vegetales, así como cromatografía en columna (CC) para la obtención de fracciones, además de

cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) para la determinación de la presencia y/o ausencia de piretrinas y modelos experimentales *in vitro* para evaluar actividad citotóxica y larvicida de las fracciones obtenidas.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades Biogénicas de Terpenos

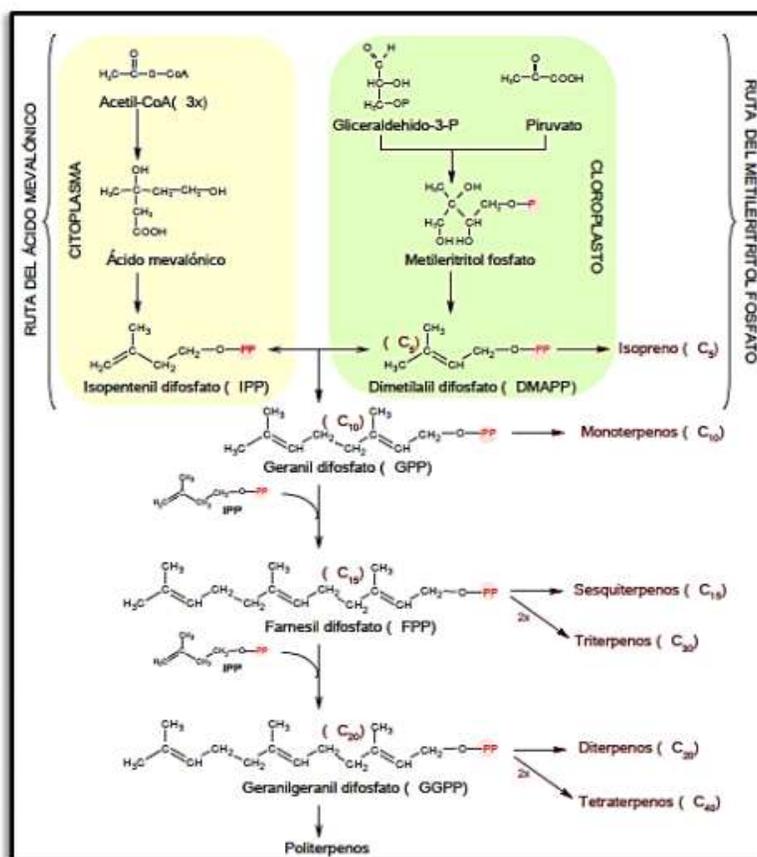
Elaborados a partir de los mismos precursores, terpenoides y esteroides constituyen sin duda, el más amplio conjunto conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. La inmensa mayoría de los terpenos son específicos del reino vegetal. Igualmente, los triterpenos son específicos del reino vegetal. Los esteroides vegetales, como los triterpenos, proceden –vía escualeno- del mevalonato: casi siempre, su estructura demuestra su especificidad vegetal: cardiotónicos cardenólidos, alcaminas esteroídicas, saponósidos, fitoesteroles.

Todos los terpenos y los esteroides tienen en común que se pueden considerar formados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del 2-metilbutadieno: ya, en 1887, O. Wallach consideraba que los terpenos debían estar constituidos a partir de unidades isoprénicas y, algunas decenas de años más tarde (1953), Ruzicka, después de más de treinta años consagrado al estudio de los terpenos, transformaba esta hipótesis en una regla general cuyo principio ha sido, después confirmado experimentalmente. (Bruneton, 1993, pp.457)

La diversidad de los metabolitos terpénicos naturales, se han considerado debido a reacciones y mecanismos que justifican la existencia de los principales esqueletos (*ver imagen No. 1*):

- monoterpenos regulares (aceites esenciales, oleorresinas, iridoides);
- monoterpenos irregulares (piretrinas);
- sesquiterpenos (aceites esenciales, lactonas sesquiterpénicas);
- diterpenos;
- triterpenos y esteroides (saponósidos, heterósidos cardiotónicos, fitoesteroles, triterpenos modificados);
- carotenos;
- poliisoprenos.

Imagen No. 1 Rutas biosintéticas de los principales esqueletos terpénicos



Nota: Tomado de Tinoco (2013)

B. Origen de las unidades en C₅

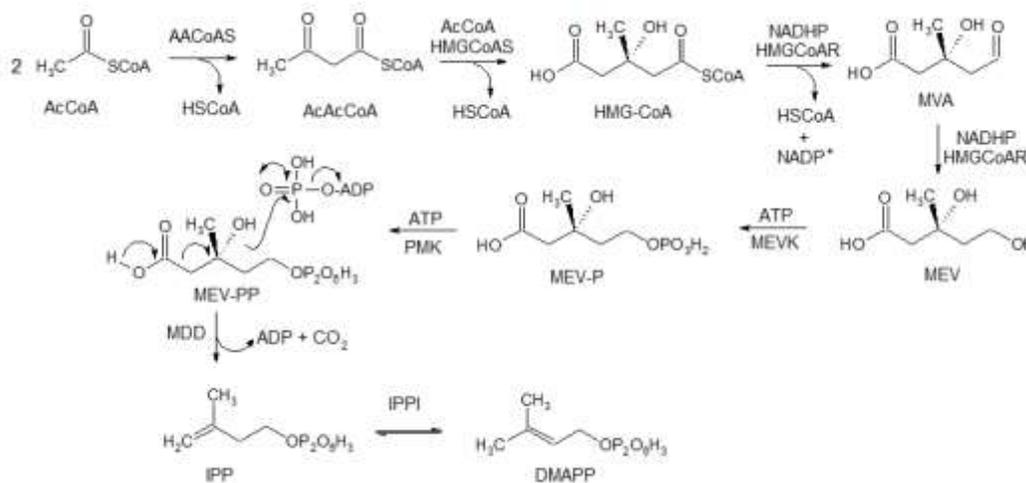
1. Vía del mevalonato

Inicialmente, el marcado con isótopos permitió demostrar que el esqueleto carbonado de los terpenos provenía del acetato. Posteriormente, se demostró que el ácido mevalónico era el precursor universal de estos compuestos. La etapa inicial del proceso implica la condensación de los tioésteres del ácido acético: formación del aceto-acetato (Claisen) y condensación (aldólica) de éste con una molécula de acetilcoenzima A; la reacción está catalizada por una enzima, hidroximetilglutarilcoenzima A sintetasa. Otra enzima, hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa, efectúa la reducción NADPH dependiente del 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A (HMG-CoA), a ácido 3*R*-mevalónico (MVA) (se ha comprobado que el otro isómero de este ácido no se incorpora).

La conversión del ácido mevalónico en estructuras hemiterpénicas comienza con una doble fosforilación. Una nueva fosforilación permite introducir un importante grupo de partida –el grupo pirofosfato- cuya eliminación permitirá la descarboxilación: la mevalonato-5-difosfato descarboxilasa induce la formación del pirofosfato de isopentenilo (IPP). (Bruneton, 1993, pp.461)

El isopentenilpirofosfato se isomeriza mediante la isopentenildifosfato Δ -isomerasa en dimetililpirofosfato (DMAPP). El reagrupamiento alílico 1,3 implica la adición de un protón del medio, eliminación del protón *pro-2R*. Este DMAPP es altamente reactivo: puede sufrir un ataque nucleófilo en C-1 con salida concomitante del grupo pirofosfato; el ataque puede ser debido a una molécula de IPP (*vide infra*) o de cualquier molécula reactiva (de ahí la existencia de metabolitos «mixtos» C- u O-alkilados) (*ver imagen No. 2*). (Bruneton, 1993, pp.463)

Imagen No.2 Vía del Mevalonato



Nota: Tomado de Dewick (2009)

Enzimas:

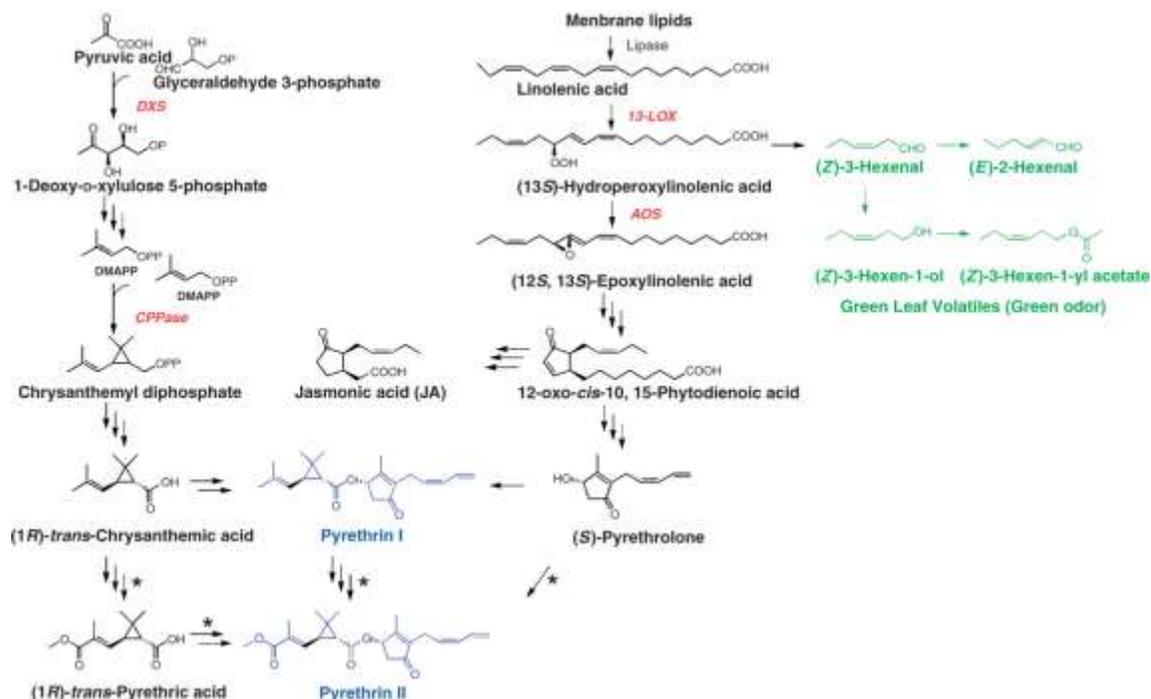
- Acetoacetil-CoAsintetasa (AACoAS).
- 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGCoAS).

- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCAR).
- Mevalonato quinasa (MEVK).
- Fosfomevalonato quinasa (PMK).
- Mevalonato 5-difosfato descarboxilasa (MDD).
- Difosfato de isopenteniloisomerasa (IPPI)

C. Piretrinas

Los monoterpenos «irregulares» producto del acoplamiento no clásico del IPP y del DMAPP se encuentran, según algunos autores, en los aceites esenciales. De hecho, los únicos monoterpenos irregulares que realmente se utilizan son las piretrinas, ésteres de ácidos ciclopropanicos con esqueleto del crisantemano aislados de una Asteraceae, el pelitre (*Tanacetum cinerariifolium*). (Bruneton, 1993, pp.605) (ver imagen No. 3)

Imagen No. 3 Ruta biosintética de formación de Piretrinas



Nota: Tomada de Kikuta, Y., Ueda, H., Nakayama, K., Katsuda, Y., Ozawa, R., Takabayashi J.,...Matsuda, K. (2011)

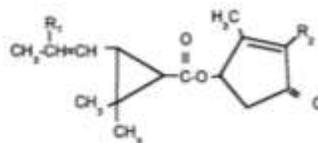
1. Bioactividad de las piretrinas

Las piretrinas son tóxicas para los animales de sangre fría: peces, batracios, insectos. Estos insecticidas «de contacto» se caracterizan por un *knock down* importante (*i.e.* aptitud para hacer caer el insecto al suelo) pero su efecto letal es menos marcado. Conviene matizar esta afirmación: el éster metílico de los compuestos de la serie II se degrada rápidamente por las células nerviosas de los insectos y, por este motivo, el efecto letal es débil mientras que su aptitud para paralizar los insectos es grande. A contrario, el *knock down* de los ésteres de la serie I es menos marcado pero su estabilidad más prolongada aumenta su efecto letal (*ver imagen No. 4*). Las piretrinas poseen igualmente propiedades insectífugas (*repelencia*).

Las piretrinas son venenos nerviosos que actúan tanto a nivel de las fibras sensitivas como de las fibras motoras, originando falta de coordinación, hiperactividad y posteriormente parálisis y muerte del insecto. Su toxicidad aguda para el hombre y los animales domésticos es despreciable por vía oral (CL_{50} aproximadamente 2g/kg) y su labilidad excluye la posibilidad de efectos acumulativos. No parece que los ésteres naturales induzcan resistencia. (Bruneton, 1993, pp.607)

Imagen No. 4 Estructuras de Piretrinas

Piretrinas



	R ₁	R ₂
PIRETRINA I	CH ₃	CH ₂ CH=CHCH=CH ₂
JASMOLINA I	CH ₃	CH ₂ CH=CHCH ₂ CH ₃
CINERINA I	CH ₃	CH ₂ CH=CHCH ₃
PIRETRINA II	COOCH ₃	CH ₂ CH=CHCH=CH ₂
JASMOLINA II	COOCH ₃	CH ₂ CH=CHCH ₂ CH ₃
CINERINA II	COOCH ₃	CH ₂ CH=CHCH ₃

Nota: Tomado de Piretrinas y Piretroides (s.f.)

2. Obtención y Usos

Aunque la extracción con dióxido de carbono supercrítico permite obtener con gran selectividad extractos muy ricos en sustancias activas, la forma más corriente de utilización es el extracto obtenido con ayuda de disolventes (hexano, éter de petróleo) y que contiene de 25 a 50% de piretrinas que se estabilizan con BHT; se utilizan también los capítulos pulverizados. Los extractos comerciales, solos o asociados a sinergistas o a otros insecticidas, se utilizan tras ser diluidos en un disolvente apropiado en forma de disoluciones, emulsiones o aerosoles. Estas diferentes preparaciones se comercializan sobre todo como insecticidas domésticos: lucha contra las moscas, pulgas, cucarachas y otros insectos. También se emplean en medicina veterinaria para combatir los parásitos externos de los animales domésticos. El uso fitofarmacéutico de las piretrinas se encuentra limitado por su inestabilidad a la luz y su rápido metabolismo. (Bruneton, 1993, pp.607)

3. Ensayos

“Aparte de la identificación botánica, los principales ensayos consisten en la identificación de las piretrinas a partir de un extracto hexánico por distintas técnicas cromatográficas y espectrales. También puede realizarse una cuantificación hidrolizando y valorando los ácidos que se forman” (Bravo, 2002, p. 251).

D. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae o Compositae posee un gran número de especies descritas hasta el momento, además presenta importancia ecológica y económica. En ella se incluyen los girasoles, margaritas, lechugas y las dalias. (Herbario Universidad de San Carlos de Guatemala, 2015)

La familia comprende aproximadamente 1,500 géneros y entre 20,000 a 30,000 especies. En Guatemala la familia Asteraceae es una de las de mayor riqueza, en el trabajo Flora de Guatemala, llevado a cabo por el Herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala -USCG- del Centro de Estudios Conservacionistas –

CECON-, se reportan más de 600 especies, en 138 géneros y 11 tribus. Los estudios en el país sobre esta familia han sido limitados. La familia habita desde zonas frías hasta los trópicos, pasando por las zonas templadas y subtropicales. (Herbario Universidad de San Carlos de Guatemala, 2015)

Las Asteráceas comprenden más de 40 especies de importancia económica, las cuales incluyen plantas alimenticias (lechuga), oleaginosas (girasol, cártamo), medicinales (manzanilla), ornamentales (dalia, zinia, crisantemo) y de uso industrial como insecticidas y otras sustancias químicas, tales como el piretro (*Tanacetum*, o en *Chrysanthemum*). (Herbario Universidad de San Carlos de Guatemala, 2015)

Cuadro No. 1

Las 20 familias de plantas más numerosas de Guatemala

Familias	Especies	Géneros	Endémicas
Orchidaceae	796	138	200
Asteraceae	655	169	56
Poaceae	534	143	39
Fabaceae	347	67	8
Rubiaceae	308	72	32
Euphorbiaceae	222	36	23
Cyperaceae	214	21	10
Solanaceae	180	26	18
Piperaceae	165	2	56
Melastomataceae	159	27	12
Mimosaceae	153	12	88
Acanthaceae	140	36	0
Bromeliaceae	156	15	27
Pteridaceae	123	24	2
Lamiaceae	110	23	10
Myrtaceae	102	10	7
Caesalpiniaceae	100	16	1
Scrophulariaceae	97	37	13
Asclepiadaceae	96	14	12
Areaceae	94	27	16

Nota: Tomado de Véliz (2008)

Las familias más diversas y abundantes en el país (Cuadro 1) son las orquídeas (Orchidaceae) con 796 especies; las compuestas (Asteraceae) con 655; las gramíneas (Poaceae) con 534; la familia de los frijoles (Fabaceae) con 347 especies y la familia del café (Rubiaceae) con 308 especies. Estas familias son aquéllas que tienen presencia en las diversas comunidades vegetales del país. (Véliz, 2008, p.265)

E. Género *Tithonia*

Tithonia es un género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia Asteraceae. Comprende 45 especies descritas y de estas, solo 11 aceptadas. Siendo estas además de *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass., *T. calva* Sch. Bip., *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, *T. fruticosa* Canby & Rose, *T. hondurensis* La Duke, *T. koelzii* McVaugh, *T. longiradiata* (Bertol.) S.F. Blake, *T. pedunculata* Cronquist, *T. pittieri* (Greenm.) S.F. Blake, *T. rotundifolia* (Mill.) S.F. Blake: girasol mexicano y *T. thurberi* A. Gray. (Género *Tithonia*, s.f.)

F. *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

“Hierba criptofita y hermafrodita de porte erecto. Mide hasta dos metros de altura. Es una planta densamente tomentosa y áspera. También conocida como Acahual, Gigantón y Girasol (*ver anexo No. 2*)” (Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2007).

1. Identificación y Descripción

- **Hábito y forma de vida:** Planta anual, erecta, por lo general muy robusta.
- **Tamaño:** De hasta 4 m de alto.
- **Tallo:** Cilíndrico, finamente estriado, veloso-hirsuto en toda su extensión aunque el indumento es más denso en los tallos jóvenes y en los pedúnculos de las cabezuelas, de tal modo que se ven blanquecinos, cuando no es así, son rojizos o verdosos, más o menos ramificado.
- **Hojas:** Alternas con pecíolos de 1.5 a 11 cm de largo, láminas ovadas a triangular-ovadas (las superiores a menudo lanceoladas), hasta de 15 cm de largo y 17 cm de ancho, ápice acuminado, margen crenado-aserrado, base a menudo truncada o subcordada, pero decurrente sobre el pecíolo, hispido-pilosas y verdes oscuras en el haz, mucho más densamente

pubescentes y más pálidas en el envés, sobre todo en la juventud. Suaves al tacto, no ásperas, como en *Simsia* o *Helianthus*.

- **Inflorescencia:** Cabezuelas solitarias o agrupadas por varias en el extremo de las ramas, sobre pedúnculos fistulosos, ensanchados y cubiertos por pubescencia larga y densa hacia su extremo, hasta de 45 cm de largo; involucro anchamente campanulado, sus brácteas 15 a 25, de largo subigual o algo desigual, oblongas a lanceoladas, de 1.5 a 3.5 cm de largo, hispido-pilosas; receptáculo convexo a hemisférico, paleas ovadas, de 10 a 18 mm de largo, cuspidadas o aristadas y a menudo oscuras en el ápice.
- **Cabezuelas/Flores:** Flores liguladas de 11 a 20, sus corolas amarillas a anaranjadas, las láminas elípticas, hasta de 5 cm de largo; flores del disco (30) 60 a 200, sus corolas amarillas o anaranjadas, 5 a 7 mm de largo, el tubo de 0.5 mm de largo.
- **Frutos y semillas:** Aquenio oblongo-cuneado, grueso, de 4 a 6 mm de largo, pálido, velutino, vilano de 2 aristas anchas, desiguales, hasta de 3.5 mm de largo, 12 a 14 escamas desiguales, lacerado-fimbriadas, de 0.3 a 1.2 mm de largo, a veces las aristas faltan.
- **Plántulas:** Hipocótilo alargado de hasta 100 mm, sin pelos; cotiledones de lámina oblonga, de 8 a 15 mm de longitud, sin pelos; epicótilo de hasta 30 mm; hojas opuestas, lámina aovada de 12 a 25 mm de largo y 5 a 10 mm de ancho, ápice agudo, borde crenado, pecíolo de 2 a 8 mm de largo. (Espinosa & Sarukhán, 1997)

2. Biología y Ecología

- **Propagación, dispersión y germinación:** Por semilla. Las semillas son dispersadas por el agua de riego, maquinaria agrícola y como contaminante de semilla certificada.
- **Ciclo de vida:** Planta anual.
- **Fenología:** Se le puede encontrar en floración de junio a noviembre. En terrenos agrícolas con riego puede estar en diferentes etapas fenológicas durante todo el año. (Perdomo & Vibrans, 2009)

G. Trabajos de Investigación relacionados con *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Según Hinojosa, Gutiérrez, Siller, Rodríguez, Morales, Guerrero, et al., (2013), se conoce muy poco acerca de las aplicaciones, naturaleza química de las sustancias y compuestos bioactivos de *T. tubaeformis*, en extractos metanol-agua. El rendimiento de los extractos y la capacidad antiinflamatoria se cuantificaron usando extractos metanólicos. Estos se obtuvieron de plantas de diferentes regiones de México en Jalisco: Norte y Sur de La Barca (NB y SB), Ocotlán (NO y SO) y Tepatitlán (NT y ST). Se utilizó un diseño factorial con tres repeticiones usando la prueba de la mínima diferencia estadística ($P < 0.05$). El screening fitoquímico reveló la presencia de fenoles tipo pirogálico y catecol. La ausencia de saponinas se observó en todas las muestras. Las plantas de las regiones de La Barca y Ocotlán (NB y NO) mostraron los más altos rendimientos de extracto en comparación con las demás muestras. Todas las regiones presentaron alta actividad antiinflamatoria, sin embargo, las muestras no tuvieron diferencias significativas.

Así mismo Juárez y Cazón (2003), trabajaron con extractos acuosos de la parte aérea de *T. tubaeformis* donde dichos extractos fueron fraccionados en n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. El extracto clorofórmico de tallos/hojas presentó menor porcentaje de germinación y por cromatografía TLC sobre sílica gel se separó un flavonoide (5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona) y se determinó su estructura por métodos espectroscópicos. Los resultados de este trabajo sugieren que 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona puede ser usada como un compuesto autotóxico inhibidor de la germinación de *T. tubaeformis*.

No se han encontrado más trabajos de investigación relacionados con dicha especie.

H. Género *Lasianthaeae*

Lasianthaeae es un género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia Asteraceae. Se distribuye desde México hasta el norte de Venezuela. Comprende 26 especies descritas y de estas solo 15 aceptadas. Siendo estas

además de *L. fruticosa* (L.) K. Becker, *L. aurea* (D. Don) K.M. Becker, *L. beckeri* B.L. Turner, *L. ceanothifolia* (Willd.) K.M. Becker, *L. crocea* (A.Gray) K.M. Becker, *L. gentryi* B.L. Turner, *L. helianthoides* DC., *L. machucana* B.L. Turner, *L. macrocephala* (Hook. & Arn.) K.M. Becker, *L. palmeri* (Greenm.) K.M. Becker, *L. podocephala* (A. Gray) K.M. Becker, *L. ritovegana* B.L. Turner, *L. rosei* (Greenm.) McVaugh, *L. seemannii* (A. Gray) K.M. Becker, *L. squarrosa* K.M. Becker y *L. zinnioides* (Hemsl.) K.M. Becker. (Castelo, Ricalde y Panero, 2005)

I. *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker

“Arbustos o árboles pequeños de madera blanda, a veces trepando flojamente sobre otras plantas. También conocida como *malacate*, *árnica Che'*, *k'anxikin*, *sakk'anxikin*, *xtabentun*, *saktaj* (ver anexo No. 3)” (Harrison, 1975, pp. 297).

1. Identificación y Descripción

- **HOJAS:** Hojas opuestas, salvo algunas alternas en la inflorescencia, lanceoladas a ovadas, 5–16 (–22) cm de largo y 5–8 cm de ancho, ápice acuminado, base aguda, escabrosas a casi glabras, 3-nervias cerca de la base; pecíolos 1–4.5 cm de largo.
- **FLOR:** Flósculos del radio 8–13, fértiles, las lígulas 7.5–15 mm de largo, amarillo brillantes.
- **FRUTO:** Aquenio.
- **USOS:** Melífera y medicinal
- **FENOLOGÍA:** En Guatemala se le puede encontrar en floración y con fruto todo el año.
- **DISTRIBUCION Y HABITAT:** México, Centroamérica e introducida en el norte de Venezuela. (Harrison, 1975, pp. 297)

J. Trabajos de Investigación relacionados con *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker

No se han encontrado trabajos de investigación relacionados con dicha especie.

K. Evaluación de la toxicidad en Plantas

Desde tiempos muy antiguos las plantas han sido utilizadas como medicinas. Varias especies de plantas han demostrado su potencial para proveer drogas efectivas contra enfermedades, por lo que, muchos grupos de investigación se dedican a evaluar extractos vegetales como estrategia para hallar nuevas alternativas terapéuticas frente a estas afecciones. Sin embargo, es bien conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan. (Fernández, Mendiola, Monzote, García, Sariago, Acuña, et al., 2009, pp. 254)

El uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de profundas investigaciones que no se limitan al campo de la experimentación, sino que una vez que se comercializan se siguen observando. El aumento en el consumo de productos naturales es debido en lo principal a la percepción de que al ser "naturales" sólo pueden ser beneficiosos y carecen de riesgos para la salud. Sin embargo, aunque hoy en día sabemos que las sustancias de origen vegetal no carecen de efecto biológico, las propiedades de las mismas están escasamente estudiadas y contrastadas. Existe falta de regulación de los compuestos botánicos en muchos países como Estados Unidos, en los que estos productos se consideran como suplementos dietéticos, escapando así de las exigencias aplicadas en materia de eficacia y seguridad a los fármacos convencionales. (Ruiz, García, Alonso, Jiménez, Orta y Carrazana, 2015, pp. 14)

Por esta razón, se llevan a cabo investigaciones con el propósito de determinar, además de la acción farmacológica, la toxicidad de las plantas medicinales. El elevado costo de estas pruebas así como el sufrimiento causado a los animales ha motivado el reemplazo de experimentos que utilicen animales de laboratorio, la reducción del número de animales usados en cada prueba o el perfeccionamiento de las metodologías existentes con el propósito de reducir el dolor y el estrés a los animales. (Fernández, Mendiola, Monzote, García, Sariago, Acuña, et al., 2009, pp. 254)

L. Ensayos de Citotoxicidad

La definición de toxicidad tiende a variar dependiendo de la naturaleza del estudio, si las células mueren o simplemente tienen un metabolismo alterado. Estos ensayos son empleados porque son baratos, fácilmente cuantificables y reproducibles. Muchos experimentos *in vitro*, tienen el propósito de determinar la potencial citotoxicidad de los compuestos estudiados, porque ellos van a ser usados como fármacos, cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos. (Freshney, 2000, pp. 365)

La configuración de los modelos experimentales empleados *in vitro* para valorar la toxicidad de los compuestos químicos se fundamenta en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato es el material orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica *in vitro*, el xenobiótico. Estas alteraciones se valoran mediante indicadores de toxicidad, que son los parámetros que se determinan para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo. (Repetto, 2002, pp. 409)

Según Freshney, (2000), los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia, los primeros se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas. Mediante estos ensayos se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento en términos de concentraciones letales (LC). (p. 366)

“La concentración letal 50 (LC₅₀) es la concentración de la sustancia de un tratamiento que causa la muerte al 50% de las células presentes, evaluadas inmediatamente después del tratamiento” (Castro, 2006, p. 42).

M. Bioensayo de Letalidad en *A. salina*

Artemia spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se conocen comúnmente por el nombre de *Artemia*, también llamados “monos de mar” o “brineshrimp” en inglés. *Artemia* es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de

alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos. Por razones prácticas, las especies con un estado criptobiótico, durante su ciclo de vida son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar. (Pino y Lazo, 2010, pp. 35)

Se trata de una prueba utilizada para la evaluación de la actividad tóxica general no específica de extractos vegetales, y en algunos laboratorios es utilizada como tamizaje preliminar en la búsqueda de agentes anticancerígenos. Sin embargo, es importante recalcar que en el tamizaje de *Artemia salina*, se detecta actividad biológica general que puede ser traducida en una amplia gama de actividades biológicas específicas. (Ticona, Nieva, Irahola y Giménez, 1998, pp. 12)

Este ensayo está basado en la determinación de la CL_{50} a las 24 horas de las larvas de una cepa específica de *Artemia salina*. *Artemia* es también útil para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas, responde a un amplio rango de compuestos química y farmacológicamente diversos; es por ellos que resulta tan importante su aplicación en programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas y medicamentos de origen natural. Además, el ensayo permite la evaluación rápida de las relaciones estructura-actividad y son fácilmente observables las interacciones entre compuestos.

El ensayo de *Artemia salina* tiene la ventaja de ser más rápida (24 horas), barata y sencilla (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20mg o menos). Además, no se requiere suero animal que si es necesario para las citotoxicidades. De esta manera, los compuestos bioactivos novedosos se pueden detectar y aislar rápidamente mediante un fraccionamiento biodirigido de los extractos de las plantas. (Pino y Lazo, 2010, pp. 38-40)

N. Actividad contra larvas de insectos

Ante la aparición cada vez más frecuente de resistencia de *Aedes aegypti* a los insecticidas tradicionales, se hace necesario el estudio de extractos vegetales que puedan ser usados como alternativas de control.

Los productos vegetales que presentan actividad insecticida o repelente comprobada juegan un papel importante en el control de la transmisión de las enfermedades metaxénicas. Algunos productos como la nicotina obtenida de hojas de tabaco, *Nicotiana tabacum* L., la anabasina y la lupinina, alcaloides extraídos de la hierba rusa *Anabasis aphylla* L., la rotenona de *Derris elíptica* Benth. y piretroides de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. han sido utilizados como insecticidas naturales mucho antes del descubrimiento de insecticidas orgánicos sintéticos.

Los fitoquímicos obtenidos de las plantas con potencial para el control de vectores comprobado pueden ser utilizados como una alternativa a los insecticidas sintéticos o juntos con otros insecticidas para el control de vectores. Los productos vegetales pueden ser utilizados como insecticidas tanto para larvas como para adultos o como repelentes para protección contra la picadura del mosquito, según el tipo de actividad que presente. Se ha reportado que una gran cantidad de plantas posee actividad insecticida o repelente contra los mosquitos vectores, pero muy pocas han demostrado tener utilidad práctica para el control de vectores. Los productos vegetales se pueden obtener ya sea de la planta completa o de una parte específica de esta por extracción con diferentes tipos de disolventes tales como los acuosos, metanol, cloroformo, hexano, etc. según la polaridad de los fitoquímicos. Algunos fitoquímicos actúan como un agente tóxico general (adulticida y larvicida), en tanto que otros interfieren con el crecimiento y el desarrollo (inhibidor del crecimiento) o con la reproducción (quimioesterilizante) o producen estímulo olfativo actuando como repelente o atrayente. . (“Prospects”, 2003, pp.1)

IV. JUSTIFICACIÓN

Dentro de las actividades agrarias y económicas fundamentales de Guatemala se encuentra la agricultura, que constituye una gran fuente de alimentos para la población guatemalteca. El aumento en la agricultura ha traído como consecuencia la expansión de plagas y enfermedades, por lo que se ha buscado en la actividad agrícola, evitar que los cultivos sean dañados por organismos no deseados, en el que el control químico ha jugado un rol importante en el uso de plaguicidas.

A pesar de las preocupaciones por el daño que ocasionan, se ha intensificado su uso en los últimos años y el empleo de plaguicidas sigue representando un grave riesgo. Se reconoce que cada año los efectos a largo plazo de la exposición habitual a ellos provocan a menudo enfermedades crónicas como el cáncer, trastornos neurológicos y del aparato reproductor (Pérez, 2010, pp. 1).

Además existe una gran diversidad climática en Guatemala, lo que ha permitido la proliferación de un gran número de insectos vectores causantes de enfermedades típicas de la región, por lo que la biodiversidad florística guatemalteca puede ser aprovechada y ser de suma importancia para lograr prevenir, limitar o regular tanto organismos nocivos en los cultivos, así como los vectores que ocasionan las enfermedades.

El área de Química de Productos Naturales ha sido en los últimos tiempos, un área de mucho crecimiento debido a la búsqueda de nuevos compuestos que puedan llegar a combatir enfermedades o más recientemente, el uso de estos como plaguicidas naturales, tal es el caso de las piretrinas. Debido a que se ha demostrado que los metabolitos secundarios tienen una gran actividad biológica, estos pueden llegar a servir como materia prima para la elaboración de productos que permitan batallar con las preocupaciones anteriormente descritas.

Por lo anterior el trabajo de investigación tuvo como propósito fundamental, el llevar a cabo la determinación de la presencia de piretrinas, así como la evaluación de la actividad larvicida y citotóxica de las fracciones a obtener de los extractos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

El estudio exploratorio se realizó en las especies antes mencionadas debido a que pertenecen a la familia Asteraceae, esta familia contiene diversas especies que se

distinguen por tener compuestos y principios activos que les confieren propiedades útiles con fines medicinales y biocidas, entre las que se incluyen propiedades larvicidas, ovicidas, adulticidas y repelentes, siendo esta última propiedad en el caso de la especie *Tithonia*. Las especies fueron elegidas debido a que encajan con las características físicas de especies que contienen piretrinas siendo la característica principal la de tener cabeza de girasol.

El objetivo de este trabajo de investigación, ha sido el de brindar un aporte encaminado al enriquecimiento del estudio de la biodiversidad florística que crece en Guatemala, mediante la determinación de la presencia de piretrinas, y de la evaluación de bioactividad de las fracciones a obtener de los extractos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

V. OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Determinar la presencia de piretrinas en fracciones de los extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.
- Evaluar actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* para la determinación de la CL_{50} en fracciones de los extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.
- Evaluar actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti* para la determinación del efecto insecticida en fracciones de los extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

Objetivos Específicos

- Obtener extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.
- Aislar fracciones de los extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala y determinar la presencia de piretrinas mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).
- Aislar fracciones de los extractos hexánicos de las hojas y flores de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala y evaluar su actividad larvicida y citotóxica.

VI. HIPÓTESIS

- Al menos una de las fracciones de los extractos hexánicos de las flores u hojas de las especies *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, presenta piretrinas.
- Al menos una de las fracciones de los extractos hexánicos de las flores u hojas de las especies *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, presenta actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*.
- Al menos una de las fracciones de los extractos hexánicos de las flores u hojas de las especies *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, presenta actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Las especies vegetales *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker.

B. Muestra

10g de material vegetal seco de cada especie (proveniente de flores y hojas) que se emplearán para efectuar los análisis.

C. Recursos

1. Humanos:

- Tesisista: Br. María Celeste Mendoza Prillwitz
- Asesor(a): Licda. Irma Nohemí Orozco Godínez

2. Materiales:

a) Equipo:

- Plancha de calentamiento con agitador magnético.
- Horno eléctrico L-C, Lab-Line Instrument, Inc.
- Rotavapor Büchi 461
- Balanza semianalítica Ohaus (modelo Scout II), de 0-250g.
- Cromatógrafo de gases Agilent 6890N con divisor de flujo y columna HP5MS de 30m X 320 µm de diámetro interno con detector selectivo de masas Agilent 5973N acoplado al cromatógrafo.
- Biblioteca de referencia de espectros de masa NIST 98.
- Procesador de alimentos
- Lámpara de luz ultravioleta (UV) con longitudes de onda de 254 y 365 nm.
- Equipo de seguridad personal (bata, guantes, lentes y mascarilla para gases).
- Bomba de oxígeno para pecera
- Lámpara de luz blanca
- Estereoscopio
- Desecadora
- Refrigeradora

- Sonicador
- Termómetro
- Tamizador
- Agitador tipo vórtex
- Pipetadores automáticos de 10-100 μL y 100-1000 μL
- Porta tips
- Cubetas plásticas
- Mechero
- Mangueras de hule
- Mangueras de corrosil
- Papel aluminio

b) Reactivos:

- Hexano
- Acetona
- 1-octanol
- Sal de mar
- Agua de chorro
- Agua destilada estéril
- DimetilSulfóxido (DMS)
- Sílica gel (60-100 mesh)

c) Cristalería:

- Vasos de precipitar de 100 y 250mL
- Vidrios de reloj
- Erlenmeyers de 250mL
- Probetas de 10, 50 y 100mL
- Balón de fondo redondo Corning 24/40, de 1L
- Varillas de agitación
- Tubos de ensayo con rosca
- Micropipetas de vidrio
- Micropipetas de plástico
- Frascos de vidrio de 5mL y 500mL color ámbar con rosca

- Viales color ámbar
- Capilares sin heparina
- Columna cromatográfica de vidrio fritado
- Cámara cromatográfica de tapa de vidrio plana
- Cromatoplasmas HP-KF (sílice de alto rendimiento indicador fluorescente) de 10cm x 20cm.
- Gradilla para tubos de ensayo
- Pinzas universales de ajuste dual de tres puntas pequeñas con tamaño de agarre de 33mm, longitud total 167mm, extensión de abrazadera 102mm
- Microplaca de fondo plano de 96 pozos
- Pecera

d) Biológicos:

- Huevos de *A. salina*
- Larvas de *A. aegypti* estadio IV procedentes del Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

D. Métodos

Etapa 1: Identificación y Obtención de material vegetal fresco:

Se recolectaron las muestras *in situ* –según descripción botánica y clasificación- de las especies endémicas *T. tuabeiformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, para los que la identificación y caracterización botánica de las muestras recolectadas, se llevó a cabo por el Herbario BIGU, de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

***Etapa 2:** Secado, Molienda y Preparación de extractos hexánicos:

Se secó a temperatura ambiente y en sombra todas las partes aéreas (flores y hojas) de las especies recolectadas. Se determinó la humedad residual del material vegetal. Una vez seco, se molió con ayuda de un procesador de alimentos. Luego se cernió con un tamizador a partículas semifinas. Se obtuvieron extractos hexánicos a partir del material vegetal (flores y hojas), por medio de la

técnica de sonicación, para ello se utilizó 10g de material vegetal antes mencionado seco pulverizado, se sonicó por 1 hora, la extracción de la misma muestra se realizó cinco veces (se utilizaron 30mL de hexano en cada extracción), los extractos combinados se colocaron en un frasco de color ámbar de 1L. El solvente fue evaporado en un rotavapor Büchi 461 (30°C, vacío, 150 RPM) hasta casi sequedad (1mL), se determinó el rendimiento de los extractos crudos secos y se colocaron en un frasco color ámbar de 10mL y refrigeraron a 4°C hasta su uso. (Ban, Sladonja, Lukić, Lušetić, Kovačević, Žnidarčić, 2010)

*Este procedimiento se realizó con cada una de las partes aéreas (flores y hojas) de las especies recolectadas.

***Etapa 3:** Obtención de fracciones a partir de los extractos hexánicos y efectuar análisis de piretrinas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM):

Las fracciones se obtuvieron a partir de los extractos reconcentrados, para ello se utilizó la técnica de cromatografía en columna (CC). Se rellenó la columna con sílicagel (60-100 mesh) y prehumedeció la columna con hexano, el eluyente se descartó. Cuando el hexano alcanzó el tope de la sílica gel, el extracto concentrado se recargó en la columna. Se permitió que el extracto penetrara en la columna con la adición sucesiva de hexano. La columna se eluyó de la siguiente forma: A) Hexano y B) 10% de Acetona en Hexano. Se recolectaron las fracciones en tubos de ensayo con rosca.

Se llevó a cabo la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) para determinar fracciones similares, para ello se utilizó como fase móvil 1-octanol y se sembró en una placa cromatográfica de sílica gel 60 F₂₅₄, las fracciones obtenidas por cromatografía en columna (CC). Las fracciones similares fueron unidas en un solo recipiente y se evaporó el solvente de las fracciones similares en un rotavapor Büchi 461 (30°C, vacío, 150 RPM) hasta casi sequedad (1mL), se colocó en un frasco color ámbar de 10mL y refrigeró a 4°C hasta su uso.

Se analizó mediante CG-EM, Para ello:

-Se fijaron parámetros de operación del equipo:

- Temperatura inicial: 280°C

- Temperatura final: 350°C
- Gas Portador: Helio
- Presión: 3.00 psi
- Split: 5:1

-Se tomó, con la jeringa del cromatógrafo, 1µL de muestra y fue inyectado en el diafragma de la cámara de vaporización del equipo.

-Dio inicio la corrida cromatográfica.

-Se evaluó el cromatograma y espectros de masas obtenidos con la ayuda de la base de datos NIST 98.

*Este procedimiento se realizó con cada una de las fracciones obtenidas de las partes aéreas (flores y hojas) de las especies recolectadas.

Etapa 4: Tamizaje de la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*:

a) Procedimiento

El ensayo frente a *A. salina*, se realizó según lo descrito por Meyer y colaboradores (1982).

i. Preparación del agua de mar:

- En un vaso de precipitar, se disuelve 35g, de la sal de mar en un litro de agua destilada.
- Se marca el volumen inicial de agua en el vaso de precipitar.
- Se filtra y refrigera hasta el momento de usar, la solución es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

ii. Cultivo de *A. salina*

- Se forra la mitad de una pecera con papel aluminio.
- Se coloca en un vaso de precipitar 200mL del agua de mar y airear por 30 min.
- Se coloca el agua en la pecera y se agregan aproximadamente 40mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro).
- Se incuba por 24 h a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasaran al área abierta de la pecera (lado con luz).

- No mover la pecera después de agregados los huevos, ya que pasarían del área cerrada y esto ya no permitirá el conteo de nauplios.

b) Determinación de la citotoxicidad

- Se pesa 1mg del extracto a ensayar y disolver con 1mL de dimetilsulfóxido (DMS). Se disuelve con ayuda de un vortex.
- Se agrega por triplicado en una microplaca: 100µL del extracto disuelto, 100µL de agua de mar con 10-15 nauplios.
- Control negativo: 100µL de agua de mar en 100µL de agua de mar con 10-15 nauplios.
- Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 h.
- Contar en el estereoscopio el número de nauplios muertos.

c) Validación

- Si se observa más del 10% de nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

d) Interpretación de resultados

- Se calculó el % de camarones muertos:
 - Se suma el número de camarones muertos en los tres pozos (X).
 - Se suma el número total de camarones en los tres pozos (Y).
 - Se divide X dentro de Y, y se multiplica por 100.

$$\% \text{ de camarones muertos} = \frac{X(\text{número de camarones muertos en los tres pozos})}{Y(\text{número total de camarones en los tres pozos})}$$

* 100

- Si el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50%, repetir la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125mg/mL.
- Se obtienen los valores de X y Y en cada dosis y se determina el valor de CL₅₀ con el programa de computadora Finney (DOS).
- Si el % de muertos es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1mg/mL.

Etapa 5: Tamizaje de la actividad larvicida contra *Aedes aegypti*

a) Procedimiento

El ensayo frente a *A. aegypti*, se realizó según lo descrito por el Manual de Procedimientos Estándar de Operaciones: actividad larvicida con *Aedes aegypti* del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales –LIPRONAT–, USAC (2013).

-Se coloca en vaso de precipitar 200mL de agua de chorro y se deja reposar por 48 h. Las larvas utilizadas de *A. aegypti* serán proporcionadas por el Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

-Se pesan 1mg del extracto a ensayar y se disuelve en 1mL de agua de chorro reposada. Se disuelve con ayuda de un vortex:

- 100µL del extracto disuelto más 100µL de agua de chorro reposada con 4-5 larvas.
- Se incuba a temperatura ambiente (entre 25-28°C).
- Se hace un recuento en el estereoscopio, el número de larvas muertas y se determina la concentración letal al 100% (CL₁₀₀). La prueba de tamizaje será positiva si todas las larvas están muertas.
- Para el control negativo: se agrega solo 200µL de agua de chorro reposada con 4-5 larvas.
- Para el control positivo: se agrega 100µL de agua de chorro reposada con 4-5 larvas y 100µL de hexano.

b) Validación

- Si se observa más del 10% de larvas muertas en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.
- El control positivo debe tener una CL₁₀₀ por debajo de 0.125mg/mL para validar la corrida.

c) Interpretación de resultados

- La prueba de tamizaje se toma como positiva si todas las larvas se encuentran muertas.
- Si el porcentaje de larvas muertas es 100%, calcular la CL₁₀₀.

E. Diseño de Investigación

1. Para el muestreo se planteó un diseño de investigación no experimental, descriptiva y transaccional que se desarrolló en tres etapas: i. Recolecta de las muestras *in situ* –según descripción botánica y clasificación- de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, la identificación y caracterización de las muestras recolectadas, se llevó a cabo por el Herbario BIGU, de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC; ii. Secado, molienda y preparación de extractos hexánicos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, por medio de la técnica de sonicación y iii. Obtención de fracciones a partir de los extractos hexánicos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, por cromatografía en columna (CC) y se efectuó un análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) para la determinación de piretrinas (*ver anexo No. 4*).

2. Para la determinación de actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*, se planteó un estudio experimental, donde se comparó el número de nauplios muertos después del contacto durante 24 h con fracciones de los extractos hexánicos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, en las siguientes diluciones: 1, 0.5, 0.25, 0.12mg/mL (*ver anexo No. 5*).

- a. Variables de interés
 - Variable dependiente: Muerte de nauplios de *A. salina*.
 - Variable independiente: Fracciones de los extractos hexánicos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

b. Análisis de datos

Regresión no paramétrica, usando la transformación probit por el método de Finey, con la curva encontrada.

3. Para la determinación de actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti*, se planteó un estudio experimental, donde se comparó el número de larvas muertas después del contacto durante 24 h con fracciones de los extractos hexánicos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, en la siguiente dilución: 1 mg/mL (*ver anexo No. 6*).

a. Variables de interés

Variable dependiente: Muerte de larvas de cuarto estadio de *A. aegypti*.

Variable independiente: Fracciones de los extractos hexánicos de las especies endémicas *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala.

b. Análisis de datos

Regresión no paramétrica, usando la transformación probit por el método de Finey, con la curva encontrada.

F. Análisis de Resultados

1. Para la determinación de piretrinas en las especies *T. tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *L. fruticosa* (L.) K. Becker de la región de San Lucas Sacatepéquez, Guatemala, se realizaron en fracciones a obtener de los extractos hexánicos de las especies antes mencionadas. Se efectuó un análisis de las fracciones por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), en el cual los resultados se compararon con bibliotecas específicas propias del equipo donde se realizó el análisis. Los resultados se tradujeron en términos de “presencia” o “ausencia” de piretrinas,

2. Para la determinación de actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*, la interpretación de resultados se hizo de la siguiente manera: (Meyer, Ferrigni, Putnam, Jacobsen, Nichols y McLaughlin, 1982)

- Se calculó el % de camarones muertos:
 - Se suma el número de camarones muertos en los tres pozos (X).
 - Se suma el número de camarones en los tres pozos (Y).
 - Se divide X dentro de Y, y se multiplica por 100.

$$\% \text{ de camarones muertos} = \frac{X(\text{número de camarones muertos en los tres pozos})}{Y(\text{número total de camarones en los tres pozos})} * 100$$

- Sí el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50%, repetir la prueba utilizando dosis de 1, 0.5, 0.25, 0.12mg/mL.
- Se obtienen los valores de X y Y en cada dosis y se determina el valor de CL₅₀ con el programa de computadora Finney (DOS).
- Si el porcentaje de muertos es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1mg/mL.
- Las determinaciones se realizarán por triplicado.

3. Para la determinación de actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti*, la interpretación de los resultados se hizo en base a una prueba de tamizaje donde se tomó como positiva si todas las larvas se encontraban muertas. Si el porcentaje de larvas muertas fuese 100%, calcular la CL₁₀₀. La determinación se realizó por triplicado. (Manual de Procedimientos Estándar de Operaciones, LIPRONAT, 2013)

VIII. RESULTADOS

- a) El cuadro No. 1 corresponde a la descripción del porcentaje de humedad del material vegetal fresco de hojas y flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. Como el porcentaje de rendimiento de las fracciones obtenidas de los extractos madres de hojas y flores de las especies anteriormente mencionadas.

Cuadro No. 1 Determinación del Porcentaje de Humedad del Material Vegetal y % de Rendimiento de fracciones obtenidas por Cromatografía en Columna (CC) de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Espece Vegetal	Peso del Material Vegetal fresco	Peso del Material Vegetal seco	Porcentaje de Humedad	Peso de fracciones	Rendimiento de fracciones (%)
<i>Lasianthaeae fruticosa</i> (L.) K. Becker (Hojas)	10.05g	3.13g	68.86%	0.301g	F1: 9.62%
				0.217g	F2: 6.93%
<i>Lasianthaeae fruticosa</i> (L.) K. Becker (Flores)	10.23g	6.62g	35.29%	0.431g	F3: 6.51%
				0.204g	F4: 3.08%
<i>Tithonia tubaeformis</i> (Jacq.) Cass. (Flores)	10.37g	7.00g	32.50%	0.200g	F5: 5.28%
				0.201g	F6: 5.30%
<i>Tithonia tubaeformis</i> (Jacq.) Cass. (Hojas)	10.45g	3.79g	63.73%	0.203g	F7: 2.90%
				0.645g	F8: 9.21%

Porcentaje de humedad (% de humedad = $(pi-pf)/pi * 100$) (pi = peso inicial, pf = peso final). Porcentaje de rendimiento (% de rendimiento = $(\text{peso de fracciones}/\text{peso del material vegetal seco} * 100)$). **Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Lab. De Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

- b) El cuadro No. 2 y 3 corresponden a las fracciones obtenidas de los extractos madres de hojas y flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass., luego de efectuar un fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC). Siendo reunidas las fracciones de composición similar de acuerdo a análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Cuadro No. 2 Identificación de fracciones obtenidas de los extractos hexánicos de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker (ver anexo No. 4)

Material Vegetal	Elución	Cantidad de fracciones	Identificación
Hojas	Isocrático Hexano	3	F1
Hojas	Inicio gradiente de polaridad (Hexano/Acetona (9:1))	7	F2
Flores	Isocrático Hexano	3	F3
Flores	Inicio gradiente de polaridad (Hexano/Acetona (9:1))	5	F4

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Lab. De Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Cuadro No. 3 Identificación de fracciones obtenidas de los extractos hexánicos de *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. (ver anexo No. 4)

Material Vegetal	Elución	Cantidad de fracciones	Identificación
Flores	Isocrático Hexano	2	F5
Flores	Inicio gradiente de polaridad (Hexano/Acetona (9:1))	3	F6
Hojas	Isocrático Hexano	1	F7
Hojas	Inicio gradiente de polaridad (Hexano/Acetona (9:1))	4	F8

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Lab. De Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

- c) Los cuadros No. 4, 5, 6 y 7 corresponden a la identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) de las fracciones obtenidas por fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC) de los extractos madres de hojas y flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Cuadro No. 4 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-EM) en fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker

Tipo de Fracción	Resultados observados	No. De pico	RT	Nombre del compuesto	Match	RMatch	Metabolito
F1: Hexano	La base de datos empleada	90	22.238	Eicosano	948	979	Alcano
	identificó con una confiabilidad superior al 90%, 3 sustancias.	92	23.444	Tetracosano	955	965	Alcano
		95	24.561	Octacosano	960	968	Alcano
F2: Hexano/Acetona (9:1)	La base de datos empleada	93	15.931	Diisooctilftalat o	919	983	Éster
	identificó con una confiabilidad superior al 90%, 2 sustancias.	99	23.420	Estigmasterol	956	959	Esteroides

RT= Tiempo de retención; Match = Coincidencia. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos del Departamento de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Cuadro No. 5 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-EM) en fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker

Tipo de Fracción	Resultados observados	No. De pico	RT	Nombre del compuesto	Match	RMatch	Metabolito
F3: Hexano	La base de datos empleada	77	9.863	Hexadecano	926	954	Alcano
	identificó con una confiabilidad superior al 90%, 3 sustancias.	86	14.283	Eicosano	957	975	Alcano
		92	17.122	Octacosano	973	982	Alcano
F4: Hexano/Acetona (9:1)	La base de datos empleada	68	9.847	Hexadecano	908	973	Alcano
	identificó con una confiabilidad superior al 90%, 1 sustancias.						

RT= Tiempo de retención; Match = Coincidencia. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos del Departamento de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Cuadro No. 6 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-EM) en fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Tipo de Fracción	Resultados observados	No. De pico	RT	Nombre del compuesto	Match	RMatch	Metabolito
F5: Hexano	La base de datos	89	15.759	Octacosano	964	972	Alcano
	empleada	93	18.095	Escualeno	905	937	Esteroides
	identificó con una confiabilidad superior al 90%, 3 sustancias.	94	18.908	Nonacosano	975	976	Alcano
F6: Hexano/Acetona (9:1)	La base de datos empleada identificó con una confiabilidad superior al 90%, 1 sustancias.	88	16.276	Octacosano	950	966	Alcano

RT= Tiempo de retención; Match = Coincidencia. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos del Departamento de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Cuadro No. 7 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-EM) en fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas de *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Tipo de Fracción	Resultados observados	No. De pico	RT	Nombre del compuesto	Match	RMatch	Metabolito
F7: Hexano	La base de datos	80	14.955	Tetracosano	963	969	Alcano
	empleada identificó con una confiabilidad superior al 90%, 2 sustancias.	91	18.571	Octacosano	945	954	Alcano
F8: Hexano/Acetona (9:1)	La base de datos empleada	70	9.905	Oxido de Cariofileno	902	909	Sesquiterpeno
	identificó con una confiabilidad superior al 90%, 3 sustancias.	80	12.907	Fitol	938	973	Alcohol
		88	17.052	Octacosano	969	977	Alcano

RT= Tiempo de retención; Match = Coincidencia. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos del Departamento de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

- d) Los cuadros No. 8 y 9 corresponden a la determinación de actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* de las fracciones obtenidas de los extractos madres de hojas y flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Cuadro No. 8 Actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* en fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas y flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker

Material Vegetal	Tipo de fracción	CL ₅₀ mg/mL
Control	---	0.0718
Hojas	F1: Hexano	0.3362
	F2: Hexano/Acetona (9:1)	0.0800
Flores	F3: Hexano	0.1262
	F4: Hexano/Acetona (9:1)	0.2537

La actividad citotóxica fue evaluada mediante la prueba en placa de *A. salina*. Todos los extractos mostraron una CL₅₀ menor a 1 mg/mL. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales-LIPRONAT-, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Cuadro No. 9 Actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* en fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas y flores de *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Material Vegetal	Tipo de fracción	CL ₅₀ mg/mL
Control	---	0.0718
Flores	F5: Hexano	0.1594
	F6: Hexano/Acetona (9:1)	0.1595
Hojas	F7: Hexano	0.3081
	F8: Hexano/Acetona (9:1)	0.1132

La actividad citotóxica fue evaluada mediante la prueba en placa de *A. salina*. Todos los extractos mostraron una CL₅₀ menor a 1 mg/mL. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales-LIPRONAT-, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

- e) Los cuadros No. 10 y 11 corresponden a la determinación de actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti* estadio IV de las fracciones obtenidas de los extractos madres de hojas y flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Cuadro No. 10 Actividad larvícida contra larvas estadio IV de *A. aegypti* en fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas y flores de *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker

Especie	Tipo de fracción	CL ₁₀₀ mg/mL
Control	---	0.0718
Hojas	F1: Hexano	0.2500
	F2: Hexano/Acetona (9:1)	0.0995
Flores	F3: Hexano	0.1422
	F4: Hexano/Acetona (9:1)	0.1686

La actividad larvícida fue evaluada mediante la prueba en placa de *A. aegypti* larvas de estadio IV. Todos los extractos mostraron una CL₁₀₀ menor a 1 mg/mL. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales-LIPRONAT-, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Cuadro No. 11 Actividad larvícida contra larvas estadio IV de *A. aegypti* en fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas y flores de *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.

Material Vegetal	Tipo de fracción	CL ₁₀₀ mg/mL
Control	---	0.0718
Flores	F5: Hexano	0.1847
	F6: Hexano/Acetona (9:1)	0.1994
Hojas	F7: Hexano	0.2367
	F8: Hexano/Acetona (9:1)	0.0951

La actividad larvícida fue evaluada mediante la prueba en placa de *A. aegypti* larvas de estadio IV. Todos los extractos mostraron una CL₁₀₀ menor a 1 mg/mL. **Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales-LIPRONAT-, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Como se observa en la Cuadro No. 1, el material vegetal que contiene mayor humedad en ambas especies son las hojas, esto debido a que las hojas en las plantas realizan el proceso llamado transpiración mediante el cual estas expulsan agua a la atmósfera. Asimismo el Cuadro No. 1 demuestra que la mayor cantidad de masa la obtuvo la fracción ocho (F8), correspondiente a las hojas de *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass., esto puede deberse a que los metabolitos secundarios presentes en esta fracción se encuentran en mayor proporción en relación a los metabolitos secundarios encontrados en las fracciones restantes. Los mayores porcentajes de rendimiento se encontraron en las fracciones obtenidas de las hojas en ambas especies, esto debido a que en las hojas se obtuvieron la mayor cantidad de fracciones al realizarse el fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC). De igual forma la cantidad de masa obtenido en las fracciones en estudio fue lo suficiente para llevar a cabo los análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) y los ensayos *in vitro* para evaluar actividad citotóxica y larvicida. (Sánchez, Calvo, García, Morcillo, Reyero y Vidal, s.f.)

Las fracciones analizadas tanto en hojas como en flores, muestran la presencia de seis compuestos para la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker (ver cuadro No. 4 y 5) y seis compuestos para la especie *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. (ver cuadro No. 6 y 7), en ambas especies se muestra la ausencia de piretrinas en las fracciones analizadas obtenidas bajo el procedimiento descrito. Las sustancias fueron identificadas efectuándose un análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) utilizando la base de datos NIST 98, esta base de datos provee datos generales por lo que la posible identificación de piretrinas en las fracciones analizadas también pudo haberse visto limitada a la poca especificidad de la base de datos para sustancias con posible actividad insecticida como es el caso de las piretrinas. En el análisis efectuado, la abundancia relativa de las sustancias varía sensiblemente entre especies, aunque en ambos casos el compuesto más abundante fue el octacosano. Estudios previos en identificación de compuestos han indicado la obtención de compuestos similares a los obtenidos en esta investigación en la familia Asteraceae, según el estudio llevado a cabo por Formisano, C., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M. y Rosselli, S. (2010), efectuaron una hidrodestilación de las partes aéreas de *Centaurea*

spinosociliata subsp. *cristata* (CSC) y *Centaurea spinosociliata* subsp. *spinosociliata* (CSS) pertenecientes a la familia Asteraceae colectadas en Croacia, obteniendo dos aceites de color amarillo pálido. Setenta y tres compuestos fueron identificados (49 para CSC y 60 para CSS) por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM), siendo el heptacosano el componente más abundante en ambos aceites. El nonacosano y el óxido de cariofileno fueron el segundo y tercer componente más abundantes en *C. spinosociliata* subsp. *cristata*, aunque también fueron encontrados en *C. spinosociliata* subsp. *spinosociliata* en menor abundancia. Otro compuesto encontrado en los aceites de ambas especies fue el octacosano.

La actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*, la fracción dos (F2) de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker (Hojas) presentó una CL_{50} de 0.0800mg/mL comparable con el control (*ver anexo No. 7*); como se observa en el cuadro No. 4, el metabolito de mayor abundancia en dicha fracción fue un esteroide, el estigmasterol, por lo que de manera preliminar podría asociarse la posible actividad determinada a dicho metabolito, considerándose el ensayo de actividad citotóxica utilizado como un tamizaje preliminar en la búsqueda de agentes anticancerígenos. Estudios han indicado que el estigmasterol puede ser útil en la prevención de ciertos cánceres, según Kim, Y., Li, X., Kang, K., Ryu, B. y Kim, S., (2014), estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que los esteroides vegetales pueden ofrecer protección contra los cánceres más comunes en las sociedades occidentales, como el de colon, de mama y de próstata. Las razones pueden incluir el efecto de los fitosteroides en la estructura y la función del tumor y el tejido del huésped, las vías de transducción de señales que regulan el crecimiento del tumor y apoptosis, la función inmune del huésped y el metabolismo del colesterol por el anfitrión.

Las fracciones restantes, según la tabla del CYTED (*ver anexo No. 9*) presentan una toxicidad moderada. (Sarasa y Burbano, 2015)

Para la actividad larvicida se dispuso evaluar el estadio larvario IV, debido a que en este estadio se observan de mejor manera las propiedades insectífugas (repelencia) que pueden llegar a tener las sustancias de las fracciones en estudio. Como se observa en el cuadro No. 10 y 11, la fracción dos (F2) de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker (Hojas) presentó un CL_{100} de 0.0995mg/mL y la fracción ocho (F8) de la especie *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. (Hojas) presentó un CL_{100} de 0.0951mg/mL

comparables con el control (*ver anexos No. 7 y 8*). Como se observa en el cuadro No. 3, el metabolito de mayor abundancia fue el estigmasterol, por lo que de manera preliminar podría sugerirse que dicha actividad puede deberse a este compuesto, a pesar de no contar con información que respalde que dicho metabolito posea esa actividad. Como se observa en el cuadro No. 6, el metabolito de mayor abundancia en dicha fracción fue un sesquiterpeno, el óxido de cariofileno, dicho metabolito podría ejercer la actividad larvicida en dicha fracción, ya que según un estudio llevado a cabo por Jaensen, Pålsson y Borg-Karlson, (2006), se determinó que las hojas de la especie *H. suaveolens* poseían mayoritariamente β -cariofileno (un 42% del material vegetal) y este estudio demostró que dicho compuesto tiene propiedades de repelencia a insectos, insecticida, acaricida, y / o actividad pesticida contra *A. aegypti*.

Las fracciones restantes, no pudieron ser comparadas con ningún test o tabla específica debido a que no se contó con información disponible para ello. Por lo que la no actividad en dichas fracciones se basó en relación al control.

X. CONCLUSIONES

1. Las fracciones analizadas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría masas (CG-EM) de las hojas y flores de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker sugieren la presencia de seis compuestos: Eicosano, Tetracosano, Octacosano, Diisocitilato, Estigmasterol y Hexadecano.
2. Las fracciones analizadas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de las hojas y flores de la especie *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. sugieren la presencia de seis compuestos: Octacosano, Escualeno, Nonacosano, Tetracosano, Óxido de cariofileno y Fitol.
3. No se observó presencia de piretrinas en las fracciones obtenidas según el procedimiento indicado, analizadas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.
4. El octacosano fue el compuesto más abundante en ambas especies de las fracciones analizadas que sugiere el estudio realizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).
5. Para la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*, la fracción dos (F2) de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker (Hojas), presentó actividad larvicida con un CL_{50} de 0.0800mg/mL comparable con el control de acuerdo a la metodología empleada en esta evaluación.
6. Las fracciones uno, tres, cuatro, cinco, seis, siete y ocho (F1, F3, F4, F5, F6, F7 y F8) no mostraron actividad citotóxica comparable con el control de acuerdo a la metodología empleada en esta evaluación.
7. Para la actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti* estadio IV, la fracción dos (F2) de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker (Hojas) y la fracción ocho (F8) de la especie *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. (Hojas), presentaron actividad larvicida con un CL_{100} de 0.0995mg/mL para la fracción F2 y un CL_{100}

de 0.0951 mg/mL para la fracción F8 comparable con el control de acuerdo a la metodología empleada en esta evaluación.

8. Las fracciones uno, tres, cuatro, cinco, seis y siete (F1, F3, F4, F5, F6 y F7) no mostraron actividad larvívica comparable con el control de acuerdo a la metodología empleada en esta evaluación.

XI. RECOMENDACIONES

1. Obtener extractos etanólicos de las hojas y flores de las especies endémicas *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker y *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass., para tener un estudio más amplio y detallado de los metabolitos secundarios presentes en ambas especies.
2. Realizar un tamizaje fitoquímico previo para determinar preliminarmente los posibles metabolitos secundarios presentes en ambas especies.
3. Efectuar un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en las fracciones de ambas especies, para determinar los metabolitos no volátiles y tener una descripción más completa y detallada de los componentes presentes.
4. Efectuar trabajos de aislamiento de los metabolitos observados y obtener otras pruebas espectrales que confirmen la presencia de estos, así como poder evaluar las bioactividades sugeridas (citotoxicidad y actividad larvicida).

XII. REFERENCIAS

- Ban, D., Sladonja, B., Lukić, M., Lukić, I., Lušetić, V., Kovačević, K., et al. (2010). Comparison of pyrethrins extraction methods efficiencies. *African Journal of Biotechnology*. 9(18), 2702-2708.
- Bravo, L. (2002). *Farmacognosia*. España: ELSEVIER
- Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia, fitoquímica plantas medicinales* (2aed). España: ACRIBIA, S.A.
- Castelo, E., Ricalde, O. y Panero, J.L. (2005). Actualización del catálogo de autoridades de las Asteraceae, Tribu Heliantheae y Eupatorieae. Herbarium, The University of Texas. Base de datos SNIB Conabio, proyecto CS011. Recuperado de http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxaget?p_ifx=itismx&p_lang=es
- Castro, S. (2006). Implementación de un método in vitro de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Dewick, P. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. (3aed.) Reino Unido: John Wiley and Sons.
- Espinosa, F. J. y J. Sarukhán, 1997. *Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones*. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Fernández, A., Mendiola, J., Monzote, L., García, M., Sariego, I., Acuña, D., et al., (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista cubana del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" del Instituto de Farmacia y Alimentos*, 61(3), 254-258
- Formisano, C., Senatore, F., Bancheva, S., Bruno, M. y Rosselli, S. (2010). Volatile components from aerial parts of *Centaurea spinosociliata* Seenus ssp. *cristata* (Bartl.) Dostál and *Centaurea spinosociliata* Seenus ssp. *spinosociliata* growing wild in Croatia. *Croat. Chem. Acta*, 83(4), 403-408
- Freshney, R. (2000). *Culture of animal cell: A manual of basic technique*. New York: John Wiley and Sons Incorporation.

- Género *Tithonia*. (s.f.). Consultado el 10 de enero de 2016. Recuperado de <http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/132452-Tithonia>.
- Harrison, N. (1975). *Lasianthaea fruticosa* (L.) K.M. Becker. *Phytology*, 31(3), 297
- Herbario Universidad de San Carlos de Guatemala-USCG-del Centro de Estudios Conservacionistas –CECON-. (2015). Asteráceas. Guatemala: (s.n.). Recuperado de http://sitios.usac.edu.gt/herbario/?page_id=97
- Hinojosa, J., Gutiérrez, M., Siller, F., Rodríguez, A., Morales, J., Guerrero, P., et al., (2013). Screening Fitoquímico y Capacidad Antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora*, 15(2), 53-60
- Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-SEMARNAT-. (2007). *Compositae Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. Acahual, Gigantón, Girasol. México: (s.n.). Recuperado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/379/flora23.html>
- Jaenson, T., Pålsson, K. y Borg-Karlson, A., (2006). Evaluation of Extracts and Oils of Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellent Plants from Sweden and Guinea-Bissau. *J. Med. Entomol*, 43(1): 113-119.
- Juárez, V. y Cazón, A. (2003). Autotoxicidad en *Tithonia tubaeformis* como un posible mecanismo de control a la invasión. *Ecología austral*, 13(2), 133-138
- Kikuta, Y., Ueda, H., Nakayama, K., Katsuda, Y., Ozawa, R., Takabayashi J.,...Matsuda, K. (2011). Specific Regulation of Pyrethrin Biosynthesis in *Chrysanthemum cinerariaefolium* by a Blend of Volatiles Emitted from Artificially Damaged Conspecific Plants. *PlantCellPhysiol*, 52 (3), 588-596.
- Kim, Y., Li, X., Kang, K., Ryu, B. y Kim, S., (2014). Stigmasterol isolated from marine microalgae *Navicula incerta* induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *BMB Reports*, 47(8), 433–438.
- Manual de Procedimientos Estándar de Operación: actividad larvicida con *Aedes aegypti*. (2013). Laboratorio de Investigación en Productos Naturales – LIPRONAT–. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45, 31-34.

- Perdomo, F. y Vibrans, H. (2009). *Tithonia tubiformis* (Jacq.) Cass. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tithonia-tubiformis/fichas/ficha.htm>
- Pérez, N. (2010). Alternativas al control químico de plagas. Revista Virtual REDESMA, 4(1), 1-13
- Pino, O y Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Revista Protección Vegetal, 22(1), 34-43
- Piretrinas y Piretroides. (n.d.). Consultado el 21 de julio de 2016. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/032598/032598-06.pdf>
- Prospects of using herbal products in the control of mosquito vectors. Indian Council for Medical Research - ICMR Bulletin. (2003). 33(1), 1-9
- Repetto, M. y Repetto, G. (2002). *Toxicología Fundamental, Métodos alternativos, Toxicidad in vitro* (4ª ed.). España: Ediciones Díaz de Santos.
- Ruiz, A., García, A. Alonso, L., Jiménez, G., Orta, I. y Carrazana, A. (2015). Vigilancia de las reacciones adversas por fitofármacos en Cuba en el período 2003-2010. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 20(1), 14-24.
- Sánchez, M., Calvo, M., García, M., García, E., Morcillo, J., Reyero, C. y Vidal, M., (s.f.). El Ciclo del Agua, Transpiración. Consultado el 21 de julio de 2016. Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/diciex/proyectos/agua/transpiracion.html>
- Sarasa, K. y Burbano, D. (2015). Estudio de la Actividad Larvicida frente a *Artemia salina* (Artemiidae) e Insecticida sobre *Corythucha gossypii* (Tingidae) del extracto etanólico de semillas de *Annona reticulata* (Annonaceae). (Tesis de Pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira.
- Ticona, V., Nieva, M., Irahola, P. y Giménez, A. (1998). Pruebas biológicas destinadas a evaluar citotóxicos como indicadores de potenciales antitumorales. *Biofarbo*, 6, 11-16
- Tinoco, D. (2013). Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los extractos totales y metabolitos secundarios de *Hedyosmum racemosum* de Zamora, Ecuador. (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Véliz, M. (2008). Guatemala y su Biodiversidad un enfoque histórico, cultural, biológico y económico. (Documento Técnico 67 (06-2008)). Guatemala: Consejo

Nacional de Áreas Protegidas-CONAP-. Recuperado de
<http://es.scribd.com/doc/94485828/Diversidad-floristica-de-Guatemala#scribd>

XIII. Anexos

Anexo 1

Glosario

1. **Acuminado:** Dícese del órgano o estructura que termina en punta.
2. **Ápice:** Designa el extremo superior o punta de una hoja o fruto.
3. **Aquenio:** Fruto seco que contiene una sola semilla, cuya envoltura externa no está soldada a la misma.
4. **ATP:** Adenosina trifosfato
5. **BHT:** Butilhidroxitouleno
6. **Cardenólido:** Son compuestos orgánicos caracterizados por un núcleo esteroideo (genina o aglicona) que cuenta con un grupo hidroxilo en la posición C14 y un anillo lactónico insaturado de cinco miembros en la posición C17.
7. **Cardiotónico:** Es una sustancia de naturaleza esteroídica que debido a su acción a nivel cardíaco provoca un aumento de la frecuencia (cronotropico), excitabilidad (batmotropico) y contractilidad (inotropico) de las fibras miocárdicas.
8. **CC:** Cromatografía en columna
9. **CCF:** Cromatografía en capa fina
10. **CG-EM:** Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
11. **Criptobiótico:** Es un estado que consiste en la suspensión de los procesos metabólicos, en la que algunos seres vivos entran cuando las condiciones medioambientales llegan a ser extremas.
12. **Criptofita:** Conjunto de formas vegetales en que la parte persistente puede quedar completamente protegida bajo el nivel del suelo o bajo el agua.
13. **Cuneada:** Hoja que en su base se estrecha paulatinamente.
14. **DMAPP:** Dimetilalilpirofosfato
15. **Escabrosa:** Lleno de asperezas, de tricomas cortos y rígidos que se aprecian al tacto.
16. **Esteroido:** Los esteroides son un tipo de compuestos orgánicos derivados del núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano que se compone de carbono e hidrógeno formando cuatro anillos fusionados, tres con seis átomos y uno con cinco; posee en total 17 átomos de carbono.
17. **Fitoesterol:** Son moléculas orgánicas que forman parte de la membrana de las células vegetales, con una función similar a la del colesterol en las membranas celulares animales.

18. **Flósculo:** Flor pequeña de las compuestas, laciniada o tubulosa.
19. **Glabra:** Sin pelo.
20. **Hemiterpénica:** Clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno, un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. El nombre proviene de que los primeros miembros de esta clase fueron derivados del aguarrás.
21. **HMG-CoA:** 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A
22. **Inflorescencia:** Conjunto de flores que nacen agrupadas de un mismo tallo.
23. **Insectífuga:** Sustancia repelente de insectos.
24. **IPP:** Pirofosfato de isopentenilo
25. **Iridoide:** Grupo de monoterpenos (C₁₀), que presentan como esqueleto de carbono el 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano, denominado como iridano.
26. **Isoprénica:** Es un compuesto orgánico con fórmula CH₂=C(CH₃)-CH=CH₂.
27. **Lanceolada:** Con forma de lanza, es decir con forma elíptica y alargada, y estrechado en el ápice y la base.
28. **Lígula:** Flor de las compuestas (Compositae) con los pétalos de la corola soldados en forma de lengüeta; en las hojas de las gramíneas estructura membranosa o pelosa que puede encontrarse en la zona de contacto entre el limbo y la vaina.
29. **Melífera:** Que lleva o tiene miel.
30. **Metaxénica:** Se atribuye a enfermedades transmitidas por vectores.
31. **MVA:** Acido 3R-mevalónico
32. **NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
33. **Nauplio:** Es la primera larva característica de los crustáceos.
34. **Nervia:** Conjunto de fibras en forma de hilos o cordoncillos, generalmente colocadas longitudinalmente en el envés de las hojas, sobresaliendo ligeramente de su superficie.
35. **Ovada:** Con el contorno en forma de huevo, con la parte más ancha en la zona basal.
36. **Peciolada:** Parte de la hoja que une el limbo al tallo.
37. **Pedúnculo:** Ramita o rabillo que sostiene una inflorescencia o un fruto tras su fecundación.
38. **Saponósido:** También conocidos como saponinas, son heterósidos que constan de una parte glucídica (con uno o más azúcares) y de una genina (parte no glucídica) denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica, por tanto de carácter poco polar.

39. **Sinergista:** Fármaco que actúa en combinación con otro, teniendo los dos mayor efecto cuando se administran juntos que al tomarlos por separado.
40. **Terpenoide:** Terpenos modificados químicamente.
41. **Tioéter:** Es un compuesto que contiene el grupo funcional formado por un puente de azufre entre dos cadenas carbonadas ($R-S-R'$ o R^1-S-R^2)
42. **Xenobiótico:** Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio.

Anexo No. 2 *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass.



Anexo No. 3 *Lasianthaea fruticosa* (L.) K. Becker



Anexo No. 4 Fracciones de hojas y flores de *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. y *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker



Anexo No. 5 Actividad citotóxica en nauplios de *A. salina*



Anexo No. 6 Actividad larvica en larvas de *A. aegypti* estadio IV



Anexo No. 7 Fracción 2 (F2) de la especie *Lasianthaeae fruticosa* (L.) K. Becker
(Hojas)



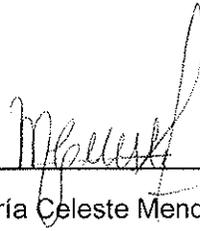
Anexo No. 8 Fracción 8 (F8) de la especie *Tithonia tubaeformis* (Jacq.) Cass. (Hojas)



Anexo No. 9 Tabla de clasificación de toxicidad según CYTED

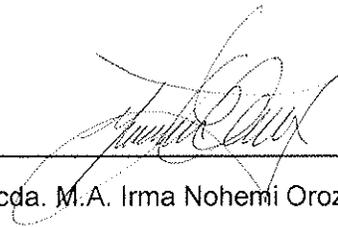
I	Extremadamente tóxico	0-10	µg/ml
II	Altamente tóxico	10-100	µg/ml
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/ml
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/ml
VI	Relativamente inocuo	<1500	µg/ml

Nota: Tomado de Sarasa y Burbano (2015)



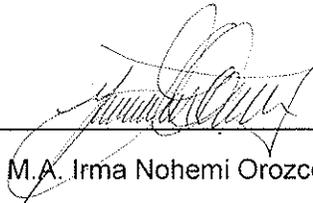
Br. María Celeste Mendoza Prillwitz

Autora



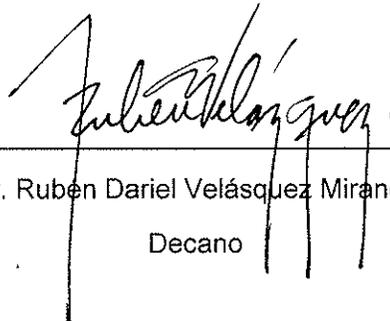
Licda. M.A. Irma Nohemi Orozco Godínez

Asesora



Licda. M.A. Irma Nohemi Orozco Godínez

Directora Escuela de Química



Dr. Ruben Dariel Velásquez Miranda

Decano