

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

Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de Ixbut
(*Euphorbia lancifolia* Schlecht.)

Jorge André Moran Urizar

Químico Farmacéutico

Guatemala, Febrero de 2020

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

**Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de Ixbut
(*Euphorbia lancifolia* Schlecht.)**

Informe de Tesis

Presentado por

Jorge André Moran Urizar

Para optar al título de

Químico Farmacéutico

Guatemala, Febrero de 2020

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovani Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merari Caseros Castañeda	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

- A Dios: Por haberme permitido llegar a este día tan esperado por mí y mi familia, y por haberme llenado de Bendiciones en el transcurso del camino.
- A mis padres: Ingrid Urizar y Jorge Moran, por tanto amor, esfuerzo, paciencia, educación, ánimos, sacrificio y ejemplo que me han brindado a lo largo de mi vida, para poder crecer siendo una persona de bien. Este logro representa todo lo anterior mencionado y es gracias a ustedes.
- A mis abuelos: María Guadalupe de Urizar, Rubén Urizar y Miriam Moran, por haber sido mis padres sustitutos en todo momento, hasta el día de hoy y por siempre. Porque me han educado y han influido en mí para ser la persona que soy hoy en día.
- A mis hermanos: Miriam Georgina y Diego Pablo, porque ustedes me han brindado palabras de aliento y su cariño en todo momento, espero que este logro sea un ejemplo de esfuerzo y perseverancia para ustedes.
- A mis tíos: Por sus consejos, cariño y porque han sido un claro ejemplo de vida para mí.
- A mi familia: Por estar al pendiente de mí en todo momento y por su apoyo incondicional.
- A Zandra Argueta: Por ser la luz en mi camino, por brindarme tanto amor, por siempre cuidarme más de lo que yo podría hacerlo, por estar para mí en todo momento, por ayudarme a seguir adelante, a no desviarme, a no desfallecer. Agradezco a Dios por haberla puesto en mi camino desde ese 24 de abril de 2015, ha sido una de mis mayores bendiciones en la vida. Las palabras se quedan cortas pero los sentimientos son infinitos. La amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido culminar exitosamente una etapa más de mi vida, por las Bendiciones que ha derramado sobre mí, y por la maravillosa familia que me ha dado.

A mis padres, gracias eternas, ustedes han sido unos padres ejemplares, han sabido a pesar de las dificultades de la vida, sacar adelante a un pequeño niño llamado Jorge André Moran Urizar, que el día de hoy está terminando una fase muy importante de su vida. Sin ustedes nada de esto habría sido posible. Les estaré agradecido siempre. Los amo.

A Lupita y a Rubén, les agradezco el amor, el tiempo, el esfuerzo y las enseñanzas que me han brindado desde agosto de 1994. Han sido como unos padres para mí, siempre los llevo en mi corazón.

A mi familia en general, porque siempre han estado para mí cuando más los he necesitado, este logro no es solo mío, es de todos nosotros, cada uno de ustedes ha llenado una parte de mi corazón y de mi formación como persona. Se los agradezco mucho.

A mi novia, Zandra Argueta, muchas gracias por todo su apoyo, por ayudarme a culminar este logro en mi vida, por cuidarme y por estar siempre presente.

A mis amigos, Andrés de León, Maryuri Mejía, Gabriela Ponce, Rafael Funes, Velvett del Busto, Gabriela Guzmán, Enrique Woc. Por su amistad, por las carcajadas y su ayuda a lo largo de la carrera.

A la Tricentenario Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Centenario Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por aceptarme como un miembro más y ayudarme en mi formación profesional.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT- por abrirme las puertas para la realización de mi trabajo de graduación.

A mi asesora Dra. Sully Cruz, a mi revisora Licda. Lesbia Guerra y a la Licda. Nereida Marroquín por su guía, ayuda y conocimientos para la elaboración de mi trabajo de graduación.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES.....	3
4. JUSTIFICACIÓN.....	9
5. OBJETIVOS.....	10
6. HIPÓTESIS.....	11
7. MATERIALES Y MÉTODOS	12
8. RESULTADOS.....	27
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
10. CONCLUSIONES.....	36
11. RECOMENDACIONES	37
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. RESUMEN

Euphorbia lancifolia comúnmente llamada ixbut, es una planta medicinal con un importante potencial, muy utilizada en Guatemala en la medicina tradicional como galactagoga y en entnoveterinaria para aumentar la leche en bovinos; sin embargo, son pocos los estudios químicos y biológicos reportados.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto etanólico de Ixbut, con el fin de poder encontrar nuevas opciones para desarrollo de antibióticos, porque las bacterias están creando resistencia hacia los antibióticos ya conocidos, este ha sido un problema que ha crecido últimamente en todo el mundo. Independientemente del uso inadecuado de los mismos, es importante invertir recursos en investigación para poder contar con más opciones al momento de intentar combatir a las bacterias. Para poder llegar a un resultado en concreto fue necesario utilizar la metodología de tamizaje antimicrobiano por agar planta, con el cual fue posible determinar que el extracto etanólico de Ixbut, presentó actividad antimicrobiana frente a una de las bacterias en estudio.

Posteriormente se utilizó la técnica de microdilución para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto hacía la bacteria contra la que demostró actividad antimicrobiana. En base al resultado se determinó que el extracto etanólico de Ixbut presentó actividad antimicrobiana frente a la bacteria *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* a una concentración inhibitoria mínima de 1 mg/mL.

También se realizó un tamizaje fitoquímico con el cual se evidenció la presencia de diferentes metabolitos secundarios, tales como cumarinas, terpenos, flavonoides y antocianinas.

2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país privilegiado por su gran diversidad ecológica y cultural. Desde la época precolombina, la región de Guatemala ha sido habitada por indígenas que se han relacionado con la naturaleza y han sabido utilizar sus recursos para alimento, vestimenta, medicina, artesanía, rituales y tradiciones. Estos conocimientos han sido heredados, modificados o perdidos a través del tiempo.

El conocimiento de las propiedades farmacológicas de varias plantas de Guatemala aún sigue siendo escaso, por lo que resulta necesario continuar en la constante búsqueda de los posibles usos medicinales de las diferentes plantas, por medio de investigaciones y experimentación.

Cabe resaltar que, además, muchas de las plantas que se utilizan en medicina popular no cuentan con estudios científicos que sustenten sus propiedades curativas, que validen su aplicación clínica y que aseguren la carencia de propiedades toxicológicas para el humano.

Por otro lado, es de gran importancia encontrar nuevos antibióticos, ya que cada día más bacterias adquieren resistencia a la acción de los mismos, esto debido a las mutaciones que sufren las bacterias como consecuencia de la mala adherencia terapéutica de los pacientes con los antibióticos.

El Ixbut (*Euphorbia lancifolia* Schlecht.) es una planta de origen Centroamericano que ha sido muy poco estudiada como muchas otras plantas en el país. Resulta necesario investigar otros posibles usos medicinales de dicha planta para poder identificar si posee alguna acción farmacológica beneficiosa para la población.

Actualmente el Ixbut es comercializado en Guatemala en forma de bolsitas de té, soluciones a base de Ixbut y en forma de extractos encapsulados, todos con el fin de estimular la secreción de leche materna (Rosengarten, 1982); estos se encuentran en supermercados del país.

La presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antimicrobiana por medio de un método *in vitro* empleando el extracto etanólico de Ixbut.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Euphorbiaceae*

Con alrededor de 8700 especies ubicadas en 320 géneros, la familia Euphorbiaceae es una de las más grandes a nivel mundial y ocupa el sexto lugar en diversidad después de Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Rubiaceae. Su distribución es subcosmopolita, y aunque está mejor representada en las regiones tropicales y subtropicales, como América y África, varios representantes se extienden a las zonas templadas de ambos hemisferios. La familia es sumamente importante, ya que muchos de sus miembros se cultivan para su uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental (Steinmann, 2002).

Estudios químicos realizados recientemente en el género *Euphorbia*, muestran la presencia principalmente de derivados terpénicos (algunos de estructuras nuevas) y flavonoides. De *Croton chilensis*, especie monotípica, se aislaron especialmente alcaloides del tipo de la morfina y aporfina (Bittner et al., 2001).

De las restantes especies estudiadas en esta familia se aislaron especialmente triterpenos y flavonoides conocidos. Igualmente se estudió, en ocho especies, la distribución de n - alcanos en las fracciones de hidrocarburos refinados (Bittner et al., 2001).

El género *Euphorbia* (con aproximadamente 1600 especies) es el que ha llamado más la atención y ha sido estudiado precisamente por su contenido en diterpenos biológicamente activos. Un estudio de la distribución de estos diterpenos en aproximadamente 60 especies de *Euphorbia* demostró que un 90% de las especies estudiadas contenían estos compuestos. El estudio químico de este género alcanza solo a unas 250 especies, donde se han encontrado terpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas, glicósidos cianogénicos y taninos, entre otros (Bittner et al., 2001).

Algunas de las especies del género *Euphorbia* se usan en medicinas populares para tratar enfermedades de la piel, heridas, gonorrea, migrañas, así como parásitos intestinales. El género es conocido por contener gran variedad de compuestos que han sido investigados por su toxicidad y su actividad terapéutica potencial y muchos de ellos se han utilizado para tratamientos médicos desde la antigüedad (Alabri et al., 2018).

3.2 *Euphorbiaceae* a estudio

La especie utilizada en esta investigación fue:

3.2.1 *Euphorbia lancifolia* Schlecht.

Descripción botánica

Hierba perenne, algo carnosa y suculenta, tallos rollizos, verde pálidos, glabros, ascendentes, postrados o procumbentes, hasta de 2 m de largo. Hojas alternas, peciolos erectos muy cortos, rómbico-lanceoladas, 5-9 cm de largo, agudas o acuminadas, agudas a la base, enteras, verde y glabras encima, pálidas por debajo, ligeramente pilosas; nervios laterales obsoletos; involucros en pequeñas cimas terminales desnudas, lóbulos 4, glabros, crenados, blanquecinos (Cáceres, 2006).

Hábitat y distribución

Nativa de bosques secos, a veces bosques de pino, sabanas o en campos abiertos a 600-1,900 msnm, del sur de México y Belice hasta Costa Rica; introducida en el Caribe y Colombia. Se ha descrito en Alta Verapaz, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez (Cáceres, 2006).

Usos medicinales

Los tallos huecos con escasas hojas se venden en los mercados locales. La infusión o decocción de hojas goza de una gran reputación para favorecer la lactancia materna inclusive cuando ésta se ha ido, combatir la impotencia sexual, fiebre puerperal, dolor de cuerpo y cólico estomacal. Tópicamente se usa la decocción en baños para combatir llagas y dolor de cuerpo. Se le atribuye propiedad galactogoga, antiséptica y tónico estimulante (Cáceres, 2006).

Composición Química y Principios Activos

En la revisión de 30 años del Chemical Abstracts y la información más reciente de NAPRALERT se encontró muy poca información sobre la composición química de la especie. La materia vegetal usada como medicina son las hojas frescas o secas, que deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos (Cáceres, 2006).

En la revisión de literatura no se encontraron referencias sobre la relación entre la actividad farmacológica atribuida y la composición química, ni estudios sobre la formulación de productos fitofarmacéuticos (Cáceres, 2006).

3.3 Resistencia microbiana

La resistencia actual de los gérmenes a los antimicrobianos constituye un serio problema de salud en todo el orbe y un reto aún mayor para el futuro. Muchas investigaciones se han realizado desde los últimos 30 años del siglo pasado hasta nuestros días en todos los países, sobre todo para conocer los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia y la creación de nuevos productos farmacéuticos y naturales para hacerle frente (Serra, 2017).

La resistencia a los antimicrobianos (farmacorresistencia) se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones causadas por ellos dejen de ser eficaces. Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes. La resistencia a los antimicrobianos es el término más amplio para la resistencia de diferentes tipos de microorganismos y abarca la resistencia a los medicamentos antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y fungicidas (Serra, 2017).

Por el gran impacto ecológico y en la salud pública de la resistencia antimicrobiana, la Organización Mundial de la Salud (OMS)/ Organización Panamericana de la Salud (OPS), la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, el Centro de control y

prevención de enfermedades (CDC), la Food and Drug Administration (FDA) y los Institutos Nacionales de Salud, entre otros, han emitido diferentes documentos con lineamientos y recomendaciones dirigidas a detener el problema. Se dirigen cuantiosos recursos para amparar investigaciones con vistas a profundizar en los sistemas de vigilancia de la resistencia, la prevención de las enfermedades infecciosas, la producción de nuevos fármacos y la búsqueda de tratamientos alternativos eficaces (Serra, 2017).

3.4 Estudios previos

Existen artículos científicos en donde mencionan diferentes hallazgos encontrados y metodologías aplicadas a las plantas del género *Euphorbia*, como se mencionan a continuación:

Alabri et al. presentan en su publicación “Espectroscopia de fluorescencia: método de regresión por mínimos cuadrados parciales para la cuantificación de quercetina en *Euphorbia masirahensis*” (2018) en la cual utilizaron espectroscopia de fluorescencia en conjunto con regresión parcial de mínimos cuadrados para estimar la cantidad de quercetina en diferentes fracciones de *Euphorbia masirahensis*, obteniendo como resultados que la fracción con mayor cantidad de quercetina recuperada fue la de *n*-butanol. La importancia es el incremento de utilización de quercetina, ya que es un flavonoide que protege contra enfermedades degenerativas, y con ese método se concluyó que la fracción antes mencionada fue la mejor en esa metodología (Alabri, 2018).

En la publicación de Kim et al., “Dos nuevos glucósidos diterpenoides de tipo lautánico con actividad inhibidora de la producción de interleucina 6 (IL-6) de las raíces de *Euphorbia kansui*” (2018) se presentó como resultado, que los compuestos 1 y 2 (kansuingol A y B, respectivamente) ejercieron actividades inhibitoras en la producción de IL-6 con valores de concentración inhibitoria media (IC50) de 2.96 y 1.94 μ L, respectivamente. Además, kansuingol A (1) disminuyó las expresiones de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), los cuales son mediadores de inflamación (Kim, 2018).

También, existen varios antecedentes de trabajos de Tesis realizados en la Universidad de San Carlos de Guatemala de las facultades de Ciencias Químicas y Farmacia y de Veterinaria y Zootecnia. Entre las cuales se pueden resaltar:

Dennya Guaran presenta en su tesis “La actividad lactogénica del Ixbut (*Euphorbia lancifolia*) y su posible efecto a nivel de síntesis proteica medida por el cambio de ácidos nucleicos (ADN y ARNm)” (1994) en la cual concluye que la administración del Ixbut (*Euphorbia lancifolia*) a ratas lactantes no aumentó la concentración de ácido desoxirribonucleico en la glándula mamaria (Guaran, 1994).

Maude Tzapin presenta en su tesis “Efecto del consumo de Ixbut (*Euphorbia lancifolia* Schlecht.) sobre la densidad y el volumen de la leche materna” (2005) los resultados demuestran que el aumento de volumen observado en las muestras de leche materna del grupo experimental post-tratamiento, no fue estadísticamente significativo (Tzapin, 2005).

De acuerdo a Antonio Maza, “El uso de Ixbut (*Euphorbia lancifolia*) en la producción de leche en bovinos de doble propósito en el Chal, Dolores, Petén” (2011) la inclusión de Ixbut (*Euphorbia lancifolia*), en la dieta de bovinos de doble propósito en El Chal, Dolores, Petén, incrementa la producción láctea elevando la producción en un 67% en bovinos de doble propósito del Chal, Dolores, Petén (Maza, 2011).

También cabe resaltar un artículo científico elaborado por Cates et al., de nombre “Activities of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and selected microbes: Evidence for their conservation” (2014) en el cual utilizan extractos de 41 plantas propias del área Ch’orti’ en el sureste de Guatemala. En este estudio utilizaron extracto de acetona y de metanol de *E. lancifolia*, los cuales no presentaron ninguna actividad antimicrobiana ni anticancerígena frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans* (Cates et al., 2014). Sin embargo, en la presente investigación se utilizó un extracto etanólico, ya que de ese solvente no se había reportado ningún resultado aún. Dicho extracto será evaluado contra algunas cepas similares al estudio mencionado (*Escherichia coli* y *Candida albicans*) y otras cepas diferentes (*Bacillus spizizenii*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetobacter aceti* y *Salmonella typhi*).

Schultes en el artículo científico “*Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies*” (1987) menciona que existe una prometedora ventaja etnofarmacológica que debería investigarse a fondo, sobre el uso por parte de los Mayas de Ixbut. Menciona que se llevaron a cabo experimentos en colaboración con una compañía farmacéutica, en donde demostraron mayor producción de leche en mujeres posparto. Y concluyen que el principio activo en *Euphorbia lancifolia* nunca ha sido aislado, pero que el uso nativo durante siglos y experimentos preliminares, evidencian que es un prometedor sujeto etnofarmacológico digno de más investigación fitoquímica y farmacológica (Schultes, 1987).

Según Ana Suruy “Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de la infusión de hoja de Guayaba (*Psidium guajava*, L.) sobre las principales bacterias que causan enteritis en lechones” (2013) la actividad antibacteriana de la infusión de hoja de Guayaba *in vitro* fue eficaz, por lo que esto permite evidenciar que la metodología con agar planta es aplicable a otro tipo de investigaciones similares, en este caso, utilizó un extracto de Guayaba, el cual fue mezclado con agar planta (Suruy, 2013).

Lidia Canel en su tesis “Actividad antimicrobiana y antimicótica de los extractos de cinco especies de plantas del género *Vernonia* nativas del Sur-Occidente de Guatemala” (2012) utiliza una metodología muy parecida a la que se utilizó, obteniendo un extracto etanólico el cual fue mezclado con agar planta, e inoculado con las bacterias; observándose actividad antimicrobiana. Esto brinda soporte para utilizar la metodología propuesta para esta investigación (Canel, 2012).

4. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas son la principal causa de muerte en todo el mundo. La resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial. La eficacia de muchos antibióticos existentes se ve amenazada por la aparición de bacterias resistentes a varios fármacos. Se sabe que a lo largo de la historia muchas enfermedades infecciosas han sido tratadas con remedios herbales. Por esto, existe una necesidad continua y urgente de descubrir nuevos compuestos antimicrobianos con diferentes estructuras y diferentes o nuevos mecanismos de acción para enfermedades nuevas o para ya conocidas pero que las bacterias mutan constantemente (Singh y Kumar, 2013).

La abundancia de plantas en la tierra ha llevado a un creciente interés en la investigación mundial de diferentes extractos obtenidos de plantas medicinales tradicionales, como una posible fuente potencial de nuevos fármacos antimicrobianos.

En Guatemala se han utilizado diversas plantas tradicionales como medicamentos para tratar las afecciones primarias o comunes a través de los años. Sabiendo esto y que Guatemala es un país megadiverso resulta importante seguir una línea de investigación para identificar y validar los usos medicinales de diferentes plantas.

El Ixbut es una planta de la cual no se tiene mucho conocimiento acerca de su actividad antimicrobiana. Si bien presenta una actividad galactagoga demostrada por varios estudios, aún no existe un estudio en el país sobre la actividad antimicrobiana del Ixbut, por lo que los resultados de esta investigación serán de utilidad para saber si se puede obtener un nuevo antimicrobiano a partir de esta planta.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de Ixbut (*Euphorbia lancifolia* Schlecht.).

5.2 Específicos

- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto etanólico de Ixbut contra las bacterias *Escherichia. coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus spizizenii*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acetobacter aceti*.
- Identificar qué bacterias son inhibidas por la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de Ixbut (*Euphorbia lancifolia* Schlecht.).
- Determinar la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas y terpenos en el extracto etanólico de Ixbut.

6. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de Ixbut presenta actividad antimicrobiana *in vitro* positiva frente a alguna de las bacterias a evaluar (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus spizizenii*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acetobacter aceti*).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo

7.1.1 Universo (población)

Planta del género *Euphorbia*

7.1.2 Muestra

Extracto etanólico de hoja y tallo de Ixbut (*Euphorbia lancifolia*)

7.2 Recursos

7.2.1 Recursos Humanos

Autor: Jorge André Moran Urizar

Asesora: Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

Revisora: Licda. Lesbia Mengala Guerra Urizar

7.2.2 Recursos físicos

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –
LIPRONAT–.

Laboratorio de Fitoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacia, USAC.

7.2.3 Recursos económicos

300 g de muestra de <i>Euphorbia lancifolia</i>	Q100.00
Donación de materiales a LIPRONAT	Q300.00
Impresiones	Q300.00
Gasolina	Q300.00
Total	Q1,000.00

*Costo cubierto por tesista.

7.2.4 Equipo y Materiales

- Algodón
- Asa de nicromo en argolla
- Atomizador para cromatografía en capa fina
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Balón para evaporador rotatorio de 1000 mL
- Beakers
- Cajas de Petri
- Cámara cromatográfica
- Campana de extracción de gases
- Campana bacteriológica con flujo laminar
- Desecadora
- Estufa eléctrica
- Evaporador rotatorio BÜCHI
- Gradillas
- Guantes
- Incubadora
- Mechero
- Micropipetas
- Papel filtro Whatman No. 1
- Percolador de acero inoxidable
- Pinzas
- Pipetas automáticas
- Plantilla para siembra
- Puntas amarillas de 200 μ L
- Puntas azules de 1000 μ L
- Refrigeradora
- Rotavapor con baño de calentamiento y recirculación de agua fría

- Sonificador
- Tamiz
- Tijeras
- Tubos con tapón de hule o rosca
- Varilla de agitación

Reactivos

- Agar planta
- Agar Müeller-Hinton
- Agua desmineralizada
- Caldo tripticasa soya
- Estándar de alcaloides
- Estándar de cumarinas
- Estándar de flavonoides
- Etanol al 30%
- Etanol al 50%
- Etanol al 70%
- Etanol 90%
- Solución salina

7.2.5 Institucionales

- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–
- Universidad de San Carlos de Guatemala
- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

7.3 Metodología

7.3.1 Recolección

Euphorbia lancifolia procede de la Finca El Kakawatal (Samayac, Suchitepéquez). Dichas plantas fueron colectadas e identificadas, siendo depositado un ejemplar en el herbario BIGU. Se utilizó aproximadamente 150g del material vegetal abarcando principalmente las hojas y el tallo de la planta.

7.3.2 Secado y molienda del material vegetal

El secado del material se realiza en un horno de convección de aire forzado a 40° C, hasta la obtención de un porcentaje de humedad menor al 10%. Luego, es necesario disminuir el tamaño de partícula con el uso de tijeras y tamizar para su posterior guardado en bolsas plásticas e identificadas para su utilización (Gudiel, 2009).

7.3.3 Determinación de sólidos totales

Agregar 1g de material vegetal de *Euphorbia lancifolia*, a cuatro frascos identificados, añadir 20 mL de etanol al 30%, 50%, 70% y 90% respectivamente, dejar reposar por un día. Colocar 4 cápsulas identificadas al horno a 110°C por una hora, desecar por 10 minutos y tarar. Pasadas las 24 horas de extracción colocar 1g de cada extracto en su cápsula respectivamente identificada, llevar a sequedad con una estufa y posteriormente secar en horno a 110°C por una hora, desecar y pesar. Calcular el porcentaje de sólidos totales extraídos en etanol al 30%, 50%, 70% y 90% (Gudiel, 2009).

7.3.4 Preparación del extracto etanólico, tamizaje antimicrobiano mediante técnica de agar planta y evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro*

- Percolación

Colocar algodón en un percolador de acero inoxidable a modo de tapar la boquilla por dentro, luego introducir un cono de papel filtro en el cual se coloca el material vegetal seco, agregar el solvente etanólico a la concentración indicada hasta cubrir toda la droga, dejar reposar por 24 horas y recolectar el líquido en un Erlenmeyer (Gudiel, 2009).

- Extracto

El líquido obtenido del percolador se concentra en el evaporador rotatorio; el material vegetal contenido en el percolador se sigue gastando con más solvente etanólico hasta que se agota (Gudiel, 2009).

- Filtración del extracto

- Trabajar la filtración en la campana de flujo laminar.
- Aspirar el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 ml.
- Desenroscar la aguja y enroscar en la jeringa el filtro de 0.45 μm de diámetro.
- En un frasco estéril recibir el filtrado haciendo pasar la dilución del extracto por el filtro lentamente (Gómez, 2008).

7.3.5 Preparación del agar planta

- Preparar tubos con 9.0 ml de agar Müller-Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar). Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos, dejar enfriar a 50°C. En una caja de Petri simple agregar 1.0 ml de la solución del extracto filtrado (este debe tener una concentración de 10 mg/ml) y los 9 ml de agar Müller-Hinton. Tapar

la caja y homogenizar con movimientos circulares. La concentración final que se obtiene es de 1mg/ml (Gómez, 2008).

- Dejar solidificar e incubar a 36 °C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

7.3.6 Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo (*Escherichia. coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus spizizenii*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acetobacter aceti*) a ensayar inoculándolo en una caja de Petri con agar tripticasa-soya, incubar a 36 °C durante 24 horas.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 ml de caldo tripticasa-soya, incubar a 36 °C durante 24 horas.
- Diluir 0.05 ml de la suspensión anterior en 4.95 ml de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100) (Gómez, 2008).

7.3.7 Demostración de la actividad antibacteriana

- Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Realizar seis repeticiones por microorganismo. Dejar reposar 5-10 minutos e incubar a 36 °C durante 24 horas.
- Utilizar como control negativo 9 ml de agar Müller-Hinton mezclándole 1 ml de etanol al 50 % (Gómez, 2008).

7.3.8 Interpretación de resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación (LIPRONAT, 2013, pp. 1-3).

Esquema 1. Distribución de las bacterias en cada una de las cajas de Petri utilizadas en el tamizaje antimicrobiano.

		Caja A	Caja B	Caja C
A	<i>B. spizizenii</i> ATCC 6633	1, 5	7, 12	4, 6
B	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9827	7, 11	3, 6	2, 12
C	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2, 14	9, 16	8, 13
D	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12, 15	1, 11	3, 14
E	<i>A. aceti</i> ATCC 15973	3, 8	5, 13	7, 9
F	<i>E. coli</i> ATCC 8739	9, 13	4, 15	5, 10
G	<i>S. typhi</i>	6, 16	10, 14	1, 15

7.3.9 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de la actividad antimicrobiana por técnica de microdilución.

- Preparación del extracto: Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió en 10 mL de buffer de fosfato (PBS).
- Realización de la suspensión de bacterias:
 - Se utilizaron cepas con 24 horas de incubación para la realización del estándar MacFarlan 0.5
 - Se tomaron de 2 a 3 colonias de la bacteria y se suspendieron en tubos con caldo Müeller Hinton.
 - Se ajustó la turbidez a un estándar de MacFarlan 0.5 por medio de un turbidímetro.
 - Se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar proliferación bacteriana.
- **Preparación del revelador:**
 - Se preparó una solución de 0.4 mg/mL de MTT (bromuro de (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) en buffer de fosfato y se utilizó inmediatamente después de preparado para evitar que reaccionara con la luz.
- **Inoculación en la placa:**
 - Se inoculó según se muestra en el Esquema 1, con un control de crecimiento bacteriano, un control de esterilidad del caldo Mueller Hinton y un control de esterilidad del extracto, en placas con fondo plano.
 - Se añadieron 200 µL de caldo Mueller Hinton en la columna 1 (de la 1A a la 1H).
 - Se agregó en todos los pozos 100 µL de caldo Mueller Hinton, con excepción en la columna 4 (de la 4A a la 4H).
 - Se agregó en la columna 4, 200 µL de la dilución madre de extracto.

- Se transfirieron de los pozos de la columna 4 (posición 4A a la 4H) 100 μ L a los pozos de la columna 5 (posiciones 5A a la 5H) y así sucesivamente, hasta llegar a los pozos de la fila 12. NOTA: no cambiar punta de pipeta entre cada una de las diluciones.
- Finalmente se tomaron 100 μ L de los pozos de la fila 12 y se descartaron. De esta forma se obtuvieron diluciones seriadas del extracto con un volumen total de 100 μ L.
- Se añadió 100 μ L de la suspensión de bacterias a todos los pozos de las filas 3 a 12.
- Se incubó a 35°C por 16-18 horas.
- Se agregaron 50 μ L de la solución de MTT a todos los pozos de la placa.
- Se incubó por 2 horas a 35°C en cámara húmeda y se leyó la absorbancia a 492 nm.

Esquema 2. Distribución de muestras en microplaca para determinación de CIM antimicrobiana *in vitro*.

Reactivo		A	B	C	D	E	F	G	H	Cantidad	
Ctl. Neg	Esterilidad del medio	○	○	○	○	○	○	○	○	200 μ L medio	
Ctl. pos	Bacteria	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L medio	+ 100 μ L bacteria
ATB	Dilución 1	○	○	○	○	○	○	○	○	200 μ L D1	100 μ L bacteria
	Dilución 2	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D2	
	Dilución 3	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D3	
	Dilución 4	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D4	
	Dilución 5	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D5	
	Dilución 6	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D6	
	Dilución 7	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D7	
	Dilución 8	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D8	
	Dilución 9	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D9	
	Dilución 10	○	○	○	○	○	○	○	○	100 μ L D10	
		50 μ L MTT								100 μ L descartar	

7.3.10 Tamizaje fitoquímico

➤ Investigación de alcaloides

Ensayos macro y semimicro

Se disuelve 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregan 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego se añade 25 mL de metanol a 60° C. Se filtra con papel filtro Whatman 1 y se acidifica el filtrado con ácido clorhídrico 2N. La solución resultante se divide en 4 tubos y se evalúa de la siguiente manera:

- Tubo 1: Se agrega 5 gotas de reactivo de Mayer
- Tubo 2: Se agrega 5 gotas de reactivo de Dragendorff
- Tubo 3: Se agrega 5 gotas de reactivo de Wagner
- Tubo 4: Testigo

Se utiliza como estándar soluciones al 1% de atropina y papaverina. Se observa durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos (Gudiel, 2009).

Ensayo en cromatografía de capa fina

Se concentra 1 ml de extracto vegetal y se aplica en la cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar se emplea solución de atropina y papaverina al 1% en metanol (10µL).

Fase móvil: Acetato de etilo, metanol y agua (100:13.5:10), n-butanol, ácido acético y agua (4:1:1)

Fase estacionaria: Placa de silicagel 60 F₂₅₄.

Detección

- Sin tratamiento químico: En UV a 254 nm fluorescencia, UV a 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo.

- Reactivo Dragendorff: En visible se ven zonas cafés o naranjas, los colores no son estables (Gudiel, 2009).

➤ **Investigación de flavonoides y antocianinas**

Ensayo macro y semimicro

Extraer 3g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol o metanol al 80%, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 mL de metanol al 80%, filtrar y dividir en 7 tubos:

- Tubo 1: Agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado
- Tubo 2: Agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10% (p/v)
- Tubo 3: Agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas)
- Tubo 4: Agregar magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado
- Tubo 5: Agregar un álcali a un extracto acuoso
- Tubo 6: Agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético
- Tubo 7: Testigo

Detección

- Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.
- Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavonoles (rojo a magenta), flavononas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo);

isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración (Matías, 2008).

Ensayo en cromatografía en capa fina

Extraer 1g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60° C. Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10 µL de quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100:11:11:27), n-butanol, ácido acético, agua (40:10:50); acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, etilmetilcetona, agua (50:7:3:30:10).

Detección

- Sin tratamiento químico: UV a 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV a 365nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.
- Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG): Fluorescencia intensa en UV a 365 nm.
- Solución 1: Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP)
- Solución 2: Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas. (Wagner, Bladt y Zgainski, 1984)

➤ **Investigación de cumarinas**

Ensayo macro y semimicro

Medir 5 mL de extracto vegetal metanólico. Agregar 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N, observar bajo luz UV a 365nm (fluorescencia azul o verde: positivo) (Matías 2008).

Ensayo en cromatografía de capa fina

Se concentra 1 mL de extracto vegetal y se aplica 20µL en la comatoplaca de silica gel de 60 F₂₅₄. Como estándar preparar una solución de canela en metanol al 1% de 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).

Detección

- Sin tratamiento químico: Todas las cumarinas muestran una intensa fluorescencia azul o verde-azul a UV a 365nm.
- Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%, a UV a 365nm fluorescencia azul o verde-azul (Wagner, Bladt y Againzki, 1984).

➤ **Investigación de Esteroides o Triterpenoides**

Reacciones de color

Pesar 0.1g de extracto y disolver con 5 mL de etanol o metanol y filtrar.

Al extracto disuelto realizarle las siguientes pruebas:

- Liebermann Burchard: Aplicar unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en la que las saponinas triterpenoidales dan color rosado o púrpura.

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

- Ácido tricloroacético: Se le añade a la muestra unos cristales de ácido tricloroacético.

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

- Carr-Price 1 mg de muestra en cloroformo se le agrega 2 mL de tricloruro de antimonio al 30% en cloroformo.

Resultado: color azul, posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.

7.4 Análisis de Resultados

El diseño experimental consistió de 3 repeticiones para el control y para el agar planta; las unidades experimentales fueron las bacterias y el extracto utilizado.

La prueba de hipótesis que se realiza está basada en un diseño estadístico binomial, en donde la ausencia de la actividad antimicrobiana será H_0 con $p=0.5$ y la presencia de la actividad será H_a con un $p \neq 0.5$. Para rechazar la hipótesis nula (H_0) es necesario que el extracto etanólico de Ixbut presente actividad antimicrobiana contra una de las bacterias en estudio.

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

$H_a: p \neq 0.5$ (Si tiene actividad antimicrobiana)

Para la encontrar la CIM se realizó una microdilución con la bacteria que fue inhibida, determinando en ese estudio que la CIM fue de 1 mg/mL.

8. RESULTADOS

10.1 Porcentaje de humedad de la planta. Se realizó la medición de humedad de la planta por medio de una balanza de humedad, la cual se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1
Porcentaje de humedad de hojas y tallos de Ixbut.

	% de humedad
Día 1	10.93%
Día 2	7.50%

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.2 Rendimiento de extracto etanólico de ixbut. Se presentan los resultados de la obtención del extracto realizado por percolación de 150 g de material vegetal (hojas y tallos) de *Euphorbia lancifolia* en la tabla 2.

Tabla 2
Rendimiento de extracto etanólico de Ixbut.

Especie y cantidad utilizada	Solvente	Gramos de Extracto (g)	% de Rendimiento
<i>Euphorbia lancifolia</i> 150 g*	Etanol 90%	11.71 g	7.81%

*g: gramos

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.3 Tamizaje antimicrobiano mediante técnica de agar planta. A continuación se presentan los resultados del tamizaje antimicrobiano, el cual se realizó por triplicado, para control y agar planta. El resultado se observa en la tabla 3.

Tabla 3
Tamizaje antimicrobiano mediante técnica de agar planta.

	A	B	C	D	E	F	G
Control	+	+	+	+	+	+	+
Agar planta	-	+	+	+	+	+	+

+: Creció la bacteria -: No creció la bacteria

A: *B. subtilis subsp spizizenii*, B: *P. aeruginosa*, C: *S. aureus*, D: *C. albicans*, E: *A. aceti*, F: *E. coli*, G: *S. typhi*

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.4 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extracto etanólico de *E. lancifolia* por el método de microdilución.

Tabla 4
CIM del extracto etanólico de Ixbut.

Bacteria	CIM
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> ATCC 6633	1 mg/mL

mg/mL: miligramo por cada mililitro.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.5 Determinación de flavonoides por ensayo macrométrico.

Tabla 5
Resultado de ensayo macrométrico de flavonoides.

Ensayo	Resultado
Ácido sulfúrico	Positivo
Cloruro Férrico al 10% (FeCl ₃)	Positivo
HCl ₁ y calor	Positivo
Mg ²⁺ y HCl ₁	Positivo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.6 Determinación de flavonoides en el extracto etanólico de *E. lancifolia* Schlecht por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

Tabla 6
Resultados de la CCF de flavonoides.

Especie	olor de la banda	Rf	Resultado
<i>Euphorbia lancifolia</i>	Amarillo	0.31	
	Verde	0.41	
	Amarillo	0.6	Positivo
	Azul	0.7	Positivo
Estándares			
Quercetina	Amarillo	0.98	
Rutina	Amarillo	0.6	
Ácido clorogénico	Azul	0.12	
	Azul	0.7	
Hiperósido	Amarillo	0.84	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.7 Determinación de antocianinas en el extracto etanólico de *E. lancifolia* Schlecht por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

Tabla 7
Resultados de la CCF de antocianinas.

Especie	olor de la banda	Rf	Resultado
<i>Euphorbia</i>	Azul	0.61	
<i>lancifolia</i>	Morado	0.91	Positivo
Estándares			
Rojo de Sudán	Morado	0.93	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.8 Determinación de cumarinas por ensayo macrométrico.

Tabla 8
Determinación de cumarinas.

Prueba	Resultado
Ensayo macrométrico con Hidróxido de Potasio 0.5 N	Fluorescencia verde (Positivo)

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.9 Determinación de cumarinas en el extracto etanólico de *E. lancifolia* Schlecht por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

Tabla 9
Resultados de la CCF de cumarinas.

Especie	olor de la banda	Rf	Resultado
<i>Euphorbia</i>	Azul	0.04	Positivo
<i>lancifolia</i>	Morado	0.34	
	Azul/Celeste	0.37	
	Azul	0.51	
	Azul	0.67	
	Azul	0.87	Positivo
Estándares			
p-cumarico	Morado	0.01	
Cumarina	Azul	0.06	
	Azul	0.91	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.10 Determinación de terpenos por ensayo macrométrico.

Tabla 10

Resultado de ensayo macrométrico de terpenos.

Prueba	Resultado
Liebermann-Burchard	Color verde azulado (Positivo)
Ácido Tricloroacético	Negativo
Carr-Price	Negativo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

10.11 Determinación macrométrica de alcaloides.

Tabla 11

Resultado de ensayo macrométrico de alcaloides.

Prueba	Resultado
Mayers	Negativo
Dragendorff	Negativo
Wagner	Negativo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se analizó el Ixbut, con el fin de realizar pruebas de tamizaje fitoquímico y evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto etanólico de la planta, dichos estudios se realizaron ante la inquietud de descubrir nuevos posibles antibióticos debido al problema mundial creciente sobre la resistencia que presentan las bacterias frente a los mismos.

Inicialmente se realizó la prueba de humedad para verificar que el material vegetal se encontrara en óptimas condiciones para poder realizar el extracto etanólico, y poder prevenir los efectos de la humedad residual sobre los metabolitos activos. Para ello el material vegetal debe tener menos del 10% de humedad. Como se observa en la tabla 1, el primer día de comenzada esta investigación no cumplió la humedad, por lo que fue necesario secar el material en un horno de secado a 40°C durante 24 horas. El porcentaje de humedad al día siguiente fue de 7.50% por lo que ya era posible continuar con la siguiente prueba.

En la tabla 2 se observa el resultado del rendimiento del extracto etanólico realizado con etanol al 90% como solvente, el cual obtuvo un valor del 7.81% de rendimiento.

Posteriormente, ya con el extracto etanólico obtenido, se procedió a realizar el tamizaje antimicrobiano (Ver Anexo 2), por la técnica de agar planta, esto se realizó con el fin de determinar si el extracto de Ixbut tenía actividad antimicrobiana contra alguna de las 7 bacterias utilizadas en este estudio (Ver Anexo 1), para ello fue necesario elaborar controles en cajas de Petri con las bacterias inoculadas, sin el extracto; así como, cajas de Petri con las bacterias inoculadas y el extracto. Después de incubadas las cajas de Petri en una incubadora a 25°C por un día, se observó que el extracto etanólico de Ixbut sí presentó actividad antimicrobiana, aunque esta actividad solo logró inhibir el crecimiento de una bacteria, *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* en las 3 cajas de Petri de agar planta (ver Anexo 2.).

Tomando en cuenta el resultado anterior se realizó el análisis de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de extracto etanólico de *E. lancifolia* por el método de microdilución. En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio fue inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CIM se determinó después

de la incubación. Se puede realizar la CIM en microdilución, para lo cual se escogen las placas que tienen 96 pocillos (12 mmx 8 mm), en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, el o los antimicrobianos a estudio y 11 diluciones. Las placas de microdilución deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben (Ramírez y Castaño, 2009).

Tras haber incubado la microplaca con la bacteria a estudio (Ver Anexo 3), el extracto y las respectivas diluciones, se procede a adicionar el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esa forma actividad metabólica (Ver Anexo 3) (Ramírez y Castaño, 2009).

En el estudio de Bittner et al., de 2001, menciona que tanto extractos acetónicos y metanólicos, utilizados en otra investigación, no mostraron actividad antimicrobiana contra 4 cepas de bacterias y una levadura, mientras que el extracto etanólico de *Ixbut* mostró actividad antimicrobiana frente a una de las bacterias en esta investigación.

El extracto etanólico mostró actividad mínima inhibitoria en concentración de 1 mg/mL contra *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* de tipo ATCC, como se muestra en la tabla 4, aceptando la hipótesis planteada en la investigación, por el resultado obtenido.

En la tabla 5 se observan los resultados de las pruebas macrométricas de flavonoides, las cuales presentaron resultado positivo, esto se pudo observar ya que al tubo 1 se agregó ácido sulfúrico concentrado, lo que causó que la solución del extracto se vuelve de un tono más oscuro que el de referencia. Con esta reacción, las flavonas y flavonoles dan coloraciones fuertemente amarillas, las flavanonas, anaranjadas o rojo; las chalconas y auronas, rojo fresa o rojo azulado (Orantes, 2008). En base a estos resultados, se puede suponer que el compuesto identificado probablemente fue una flavonona como lo puede ser la hesperidina, dando un tono más oscuro a la solución. Para detectar los flavonoides se deben evaluar reacciones de cambios de color y/o formación de precipitado comparado con el testigo (Ver Anexo 4), al haberse oscurecido se da por entendido que si hubo reacción, evidenciando presencia de flavonoides. Al tubo 2 se le agregaron 5 gotas de cloruro férrico al 10%, con el cual si se evidenció cambio en la coloración en el fondo del tubo. La reacción de coloración

verde negruzco indica la presencia de compuestos fenólicos (Orantes, 2008). Se puede suponer que el compuesto identificado probablemente fue ácido clorogénico, por el cambio de coloración en el fondo del tubo de ensayo, a un tono más oscuro. Al tubo 3 se agregó ácido clorhídrico con lo cual se oscureció la solución en comparación con el testigo, por lo que al ser un cambio en el color notable se deduce que si hubo reacción con flavonoides. En esta reacción se producen coloraciones rojo-violeta debido a la presencia de dihidroflavonoles (Colina, 2016). Se puede suponer que el compuesto identificado probablemente fue un favonol, como lo pudo ser el kaempferol, por el cambio de coloración en el fondo del tubo de ensayo, a un tono más oscuro. Y por último, al tubo 4 se agregó magnesio metálico y ácido clorhídrico concentrado (Reacción de Shinoda) con lo cual ocurrió una reacción donde se veía desprendimiento de burbujas dentro de la solución y una formación de precipitado. La aparición de colores que van del rojo profundo a magenta indica la presencia de una flavanona o dihidroflavanol, dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionan (Fernández, 2005). En este caso, el tubo cambió a una coloración más oscura, siendo compatible con la presencia de rutina, que es un favonol. En base a los resultados anteriores se llega a la conclusión de que el extracto etanólico de ixbut sí presentó flavonoides.

Al haber encontrado una respuesta favorable a flavonoides por medio del método macrométrico, se procedió a identificar flavonoides por el método micrométrico, para lo cual fue necesario realizar una cromatografía en capa fina (Ver Anexo 4.), en la cual, como se muestra en la tabla 6, se encontraron 2 bandas cuyos colores (amarillo y azul) y factores de retención (0.60 y 0.70) fueron similares a los de los estándares de Rutina (amarillo con Rf de 0.60) y ácido clorogénico (azul con Rf de 0.70), respectivamente (Ver anexo 4). Por lo que, en base a los resultados obtenidos se concluye que el material vegetal contiene flavonoides como parte de su composición, hablando de metabolitos secundarios.

De igual forma se identificaron antocianinas por medio de una cromatografía en capa fina (Ver Anexo 4), en la cual se pudo observar una banda de color morado hasta el frente del solvente en la cromatoplaca. El estándar utilizado fue Rojo de Sudán, el cual presentó una fluorescencia morada a la altura del frente del solvente, por lo que se podría decir que si hay antocianinas presentes en la muestra; sin embargo, se debe recordar que al iluminar con luz blanca la clorofila se ve verde, siendo el pigmento que confiere ese color a las hojas. Pero,

bajo la luz ultravioleta, la clorofila se torna roja, debido a sus propiedades fluorescentes (Garcia y Contreras, 2015).

Los resultados de la tabla 8 indican que existe presencia de cumarinas en el material vegetal, esto se identificó por medio del método macrométrico para cumarinas, el cual presentó una fluorescencia verde después de agregado el hidróxido de potasio y visto a la luz UV. Esto sucede ya que ocurre la solubilización en medio básico, y las cumarinas se caracterizan por su absorción en la región ultravioleta del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presentan coloración exaltada, en este caso de color verde, en presencia de amoníaco (Ver Anexo 5.).

En el ensayo micrométrico para cumarinas, se realizó una cromatografía en capa fina, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9. Se obtuvieron 2 bandas de color azul, las cuales fueron las más significativas, una con Rf de 0.04 y la otra con un Rf de 0.87. Los estándares utilizados fueron el ácido p-cumarico y estándar de cumarina, pero, únicamente el estándar de cumarina obtuvo dos bandas azules, una con Rf 0.06 y otra con 0.91, por lo que se puede deducir por la similitud del factor de retención que el extracto posee cumarinas.

Se realizó de igual forma la investigación de terpenos en el extracto etanólico del Ixbut; para ello se realizaron las pruebas de Liebermann Burchard, ácido tricloroacético y Carr-Price, cada una identificando distintos tipos de estructuras de terpenos. Los resultados plasmados en la tabla 10 indican que la única prueba positiva fue la de Liebermann Burchard, ya que se obtuvo un cambio de coloración a azul verdoso, como se logra apreciar en el Anexo 6, indicando posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico. Este resultado indica que el material vegetal si posee estructuras esteroideas o triterpenoides, por lo que se confirma lo citado por Bittner et al. (2001), en relación a que el género *Euphorbiaceae* posee terpenos biológicamente activos, los cuales son los que posiblemente concedieron la actividad antimicrobiana en la evaluación por el método de microdilución.

Por último en la tabla 11 se encuentran los resultados de la investigación de alcaloides por el método macrométrico, el cual arrojó únicamente resultados negativos, los cuales se pueden observar en el Anexo 7, tanto para la prueba de Mayer's, Dragendorff y Wagner, por lo que

se puede concluir que el extracto no contenía alcaloides en su composición, ya que no se dieron los cambios en la coloración, distintivos de cada prueba.

Del ixbut se ha reportado la presencia de sesquiterpenos, eleinol, ingenol, cumarinas como p-hidroicinámico, dihidroxicumarina, p-kaempférol, escopoletina, flavonoides como quercetina y ácido vanílico, esteroides como β -sitosterol, crisofanol, brevifolina, daucosterol (Mohanty et al., 2014). Con esta información, se confirma lo reportado en la literatura con los datos experimentales encontrados, ya que, según los resultados obtenidos, el Ixbut tiene dentro de su composición química, flavonoides, terpenos y cumarinas.

10. CONCLUSIONES

- 10.1** El extracto etanólico de Ixbut presentó actividad antimicrobiana frente a la bacteria *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* a una concentración inhibitoria mínima de 1 mg/mL.
- 10.2** Se determinó en el extracto de Ixbut la presencia de flavonoides por medio del método macrométrico y micrométrico, detectándose bandas correspondientes a rutina y ácido clorogénico.
- 10.3** Se encontraron posibles esteroides o triterpenoides en el extracto de Ixbut mediante el método de Liebermann Burchard, lo que indicaría, según se evidencia en el estudio de Bittner et al. (2001), que últimamente se han estudiado más Euphorbiaceas por diterpenos biológicamente activos, pudiendo ser este metabolito secundario el causante de la actividad antimicrobiana presentada.
- 10.4** No se detectaron alcaloides en el extracto de Ixbut.
- 10.5** Realizada la prueba micrométrica de cumarinas se logró detectar que el extracto contiene cumarina, ya que el color azul de una de las bandas del extracto fue el mismo que el del estándar y el factor de retención del extracto fue muy similar.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1** En futuras investigaciones o trabajos de tesis con la misma temática se recomienda evaluar otras bacterias, diferentes a las utilizadas en este estudio, con el extracto etanólico de Ixbut para definir un espectro de actividad antimicrobiana.
- 11.2** Utilizar otros solventes para realizar el extracto, tanto polares como apolares y realizar de nuevo las pruebas antimicrobianas, para determinar si existe una mejor respuesta de la actividad.
- 11.3** Realizar una nueva investigación o trabajo de tesis para identificar el metabolito responsable de la actividad antimicrobiana en el Ixbut y determinar si es viable el aislamiento del metabolito para formulación de posibles antibióticos.
- 11.4** Elaborar investigaciones similares por parte de futuros interesados en la temática, sobre otras especies de Euphorbiaceas, para identificar el grado de actividad antimicrobiana presente en ellas.
- 11.5** Realizar investigaciones bibliográficas para explorar otros usos del Ixbut y posibles ensayos que pueden ser realizados en la planta.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alabri, Z., Hussain, J., Mabood, F., Rehman, N., Ali, L., Al-Harrasi, A., Hamaed, A., Khan, A., Rizvi, T., Jabeen, F., Khan, A., Naureen, Z. & Farooq, S. (2018). Espectroscopia de fluorescencia: método de regresión por mínimos cuadrados parciales para la cuantificación de quercetina en *Euphorbia masirahensis*. *Journal of the International Measurement Confederation*. 121(2018). 355-359.
- Bittner, M., Alarcón, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernández, V., Hoeneisen, M., & Silva, M. (2001). Estudio químico de especies de la familia euphorbiaceae en Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46(4), 419-431.
- Cáceres, A. (2006). *Vademecum Nacional de Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Canel, L. (2012). “*Actividad antimicrobiana y antimicótica de los extractos de cinco especies de plantas del género vernonia nativas del sur-occidente de Guatemala*”. Tesis de licenciatura de Química Farmacéutica, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Cates, R., Thompson, A., Brabazon, H., McDonald, S., Lawrence, M., Williams, S., Peniallilo, P., Fuentes, J., Espinoza, L., Martínez, J., Arbizú, D., Villagran, E. & Ancheta, F. (2014). Activities of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and selected microbes: Evidence for their conservation. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(33), 1040-1050.
- Colina, A. (2016). “*Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst*” de la zona de Yucay (Cusco)”. Tesis de licenciatura en Química. Universidad Nacional Mayor e San Marcos. Perú.
- Fernández, L. (2005). “*Fitoquímica del Agave salmiana*”. Tesis de licenciatura en Quimicofarmacobiología. Universidad de las Américas Puebla. México.

- García, J. & Contreras, R. (2015). Fluorescencia roja de la clorofila. *Sociedad Española de Óptica*. 48(2). 93-97.
- Gómez, A. (2008). “*Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de piperáceas (P. jacquemontianum, P. oradendon y P. umbellatum)*”. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Guaran, D. (1994). “*Actividad lactogénica del Ixbut (Euphorbia lancifolia) y su posible efecto a nivel de síntesis proteica medida por el cambio de ácidos nucleicos (ADN y ARNm)*”. Tesis de licenciatura en Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Gudiel, L. (2009). *Evaluación fitoquímica y actividad antioxidante de Polypodium triseriale SW. (calahuala)*. Tesis licenciatura en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Kim, Y., Ahn, J., Chae, H. Choi, Y., kim, J. & Chin, Y. (2018). Dos nuevos glucósidos diterpenoides de tipo lautánico con actividad inhibidora de la producción de IL-6 de las raíces de Euphorbia kansui. *Journal of Asian Natural Products*. 155(2018). 1207-1210.
- Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT). (2013). Tamizaje de la actividad antibacteriana in vitro. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 1-3.
- Maza, A. (2011). “*El uso de Ixbut (Euphorbia lancifolia) en la producción láctea en bovinos de doble propósito en El Chal, Dolores, Petén*”. Tesis de licenciatura en Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mohanty, I., Senapati, M., Jena, D. & Behera, P. (2014). Ethnoveterinary importance of herbal galactogogues-a review. *Veterinary World*. 7(5). 325-330.
- Matias, E. (2008). “*Caracterización fitoquímica y cuantificación por espectrofotometría UV de flavonoides totales en extractos de rizomas y frondas de Polypodium triseriale*”. Tesis licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Orantes, E. (2008). “*Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae)*”. Tesis de licenciatura en Química. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Ramirez, L. & Castaño, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 42. 263-268.
- Rosengarten, F. (1982). A neglected mayan galactagogue-Ixbut (*Euphorbia lancifolia*). *Journal of Ethnopharmacology*. 5(1982). 91-112.
- Schultes, R. (1987). Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 94, 79-95.
- Serra, M. A. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 16(3). 402-419.
- Singh, G. & Kumar, P. (2013). Phytochemical study and screening for antimicrobial activity of flavonoids of *Euphorbia hirta*. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 3(3), 111-116.
- Suruy, A. (2013). “*Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de la infusión de hoja de guayaba (psidium guajava, l.) Sobre las principales bacterias que causan enteritis en lechones*”. Tesis de licenciatura en Médico Veterinario, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Steinmann, V. W. (2002). Diversidad y endemismo de la familia euphorbiaceae en México. (Spanish). *Acta Botanica Mexicana*, (61), 61-93.
- Tzapin, M. (2005). “*Efecto del consumo de Ixbut (Euphorbia lancifolia Schlecht.) sobre la densidad y el volumen de la leche materna*”. Tesis de licenciatura en Nutrición. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Wagner, H., Blatt, S., & Zgainski, E. (1984). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

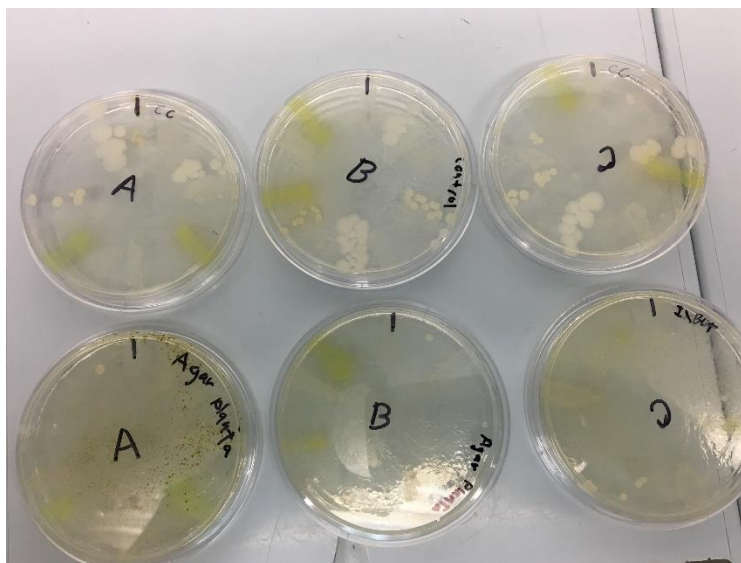
13. ANEXOS

10.1 Anexo 1. Bacterias utilizadas en la investigación



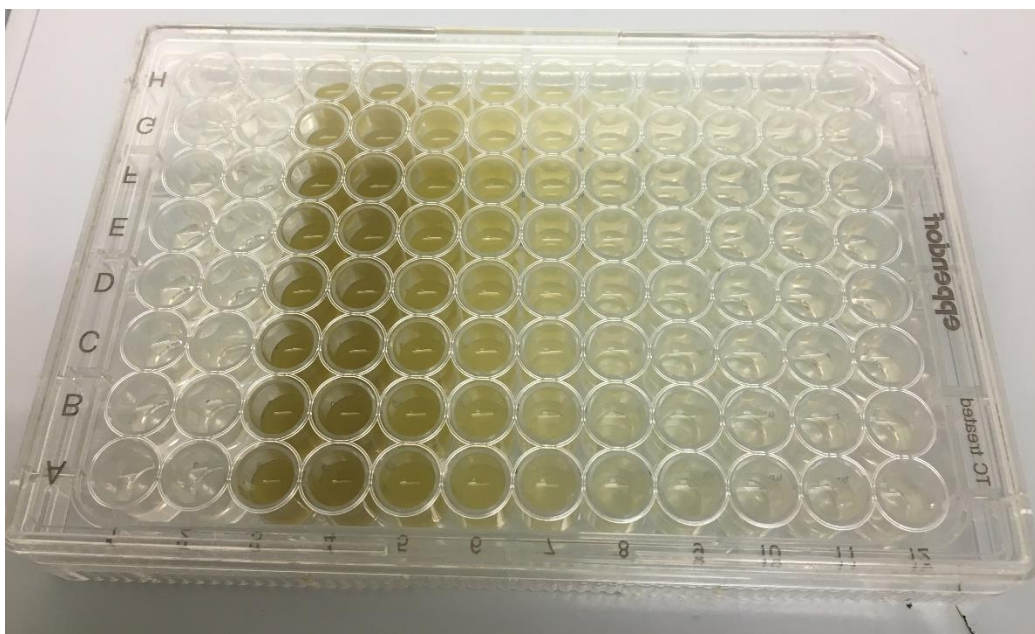
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-.

10.2 Anexo 2. Tamizaje antimicrobiano mediante técnica de agar planta.



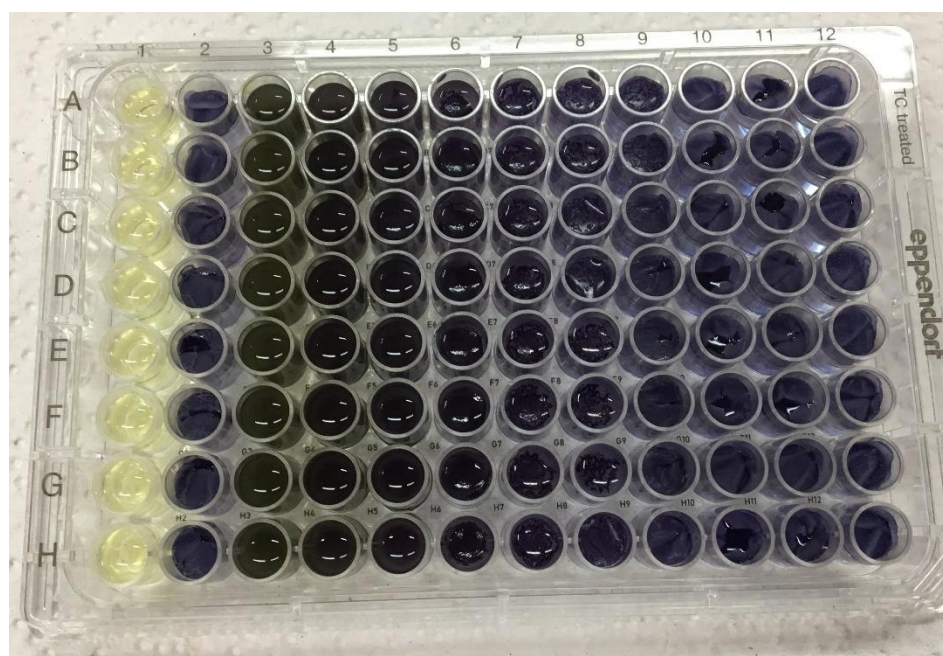
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-.

10.3 Anexo 3. Concentración inhibitoria mínima por el método de microdilución.



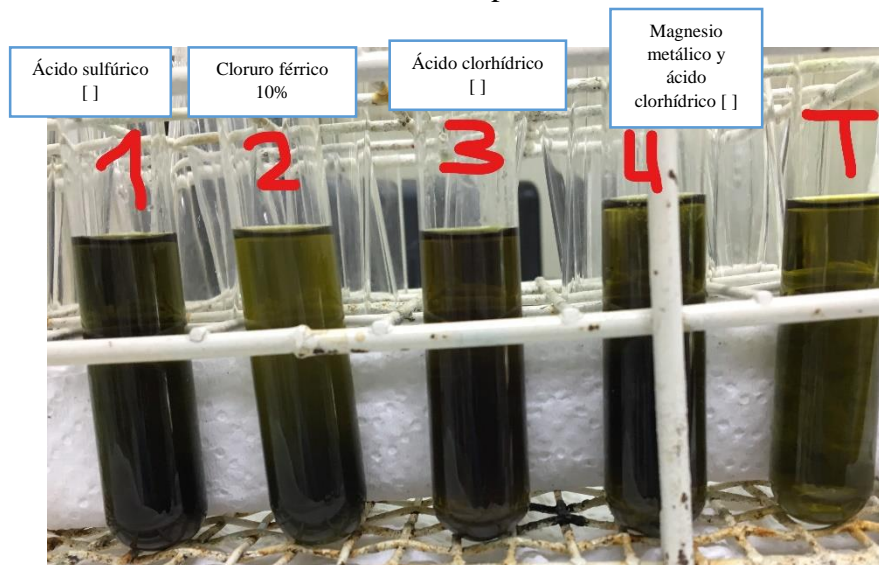
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

Esta foto es de la misma microplaca ya inoculada, pero después de agregado el reactivo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), evidenciando la reacción REDOX.

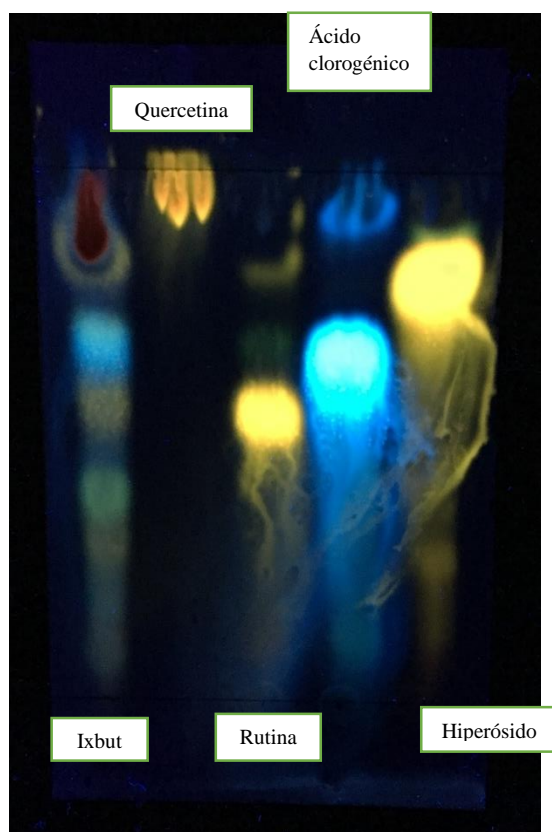


Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

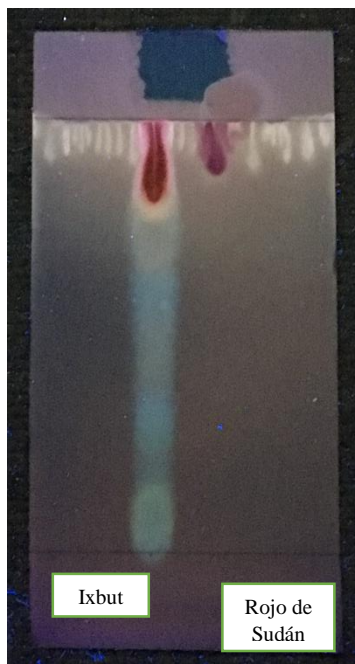
10.4 Anexo 4. Investigación de Flavonoides por el método macro y semimicro y Antocianinas, respectivamente.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

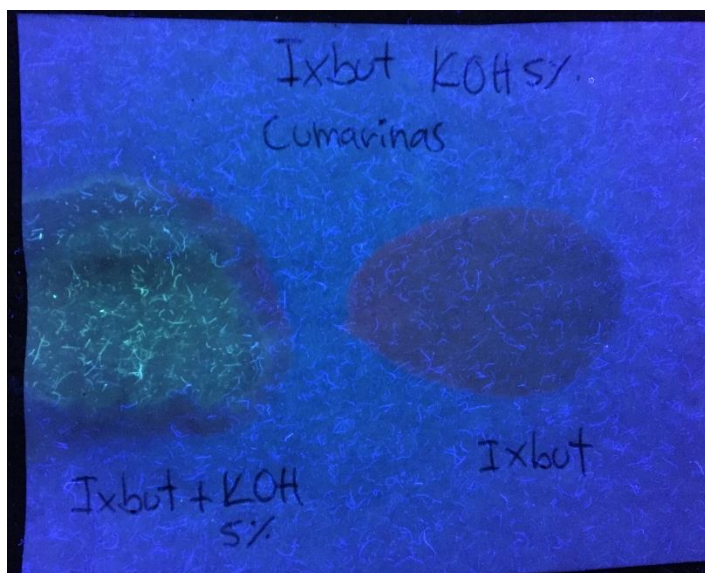


Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

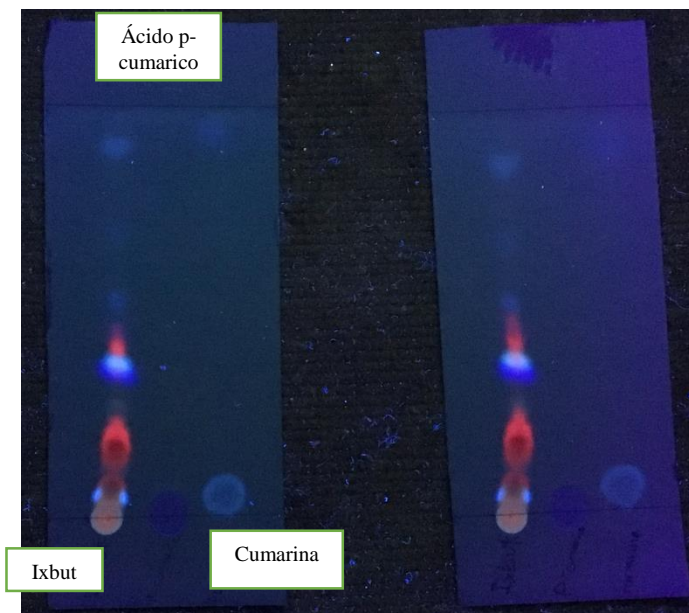


Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

10.5 Anexo 5. Investigación de Cumarinas por el método macro y semimicro.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

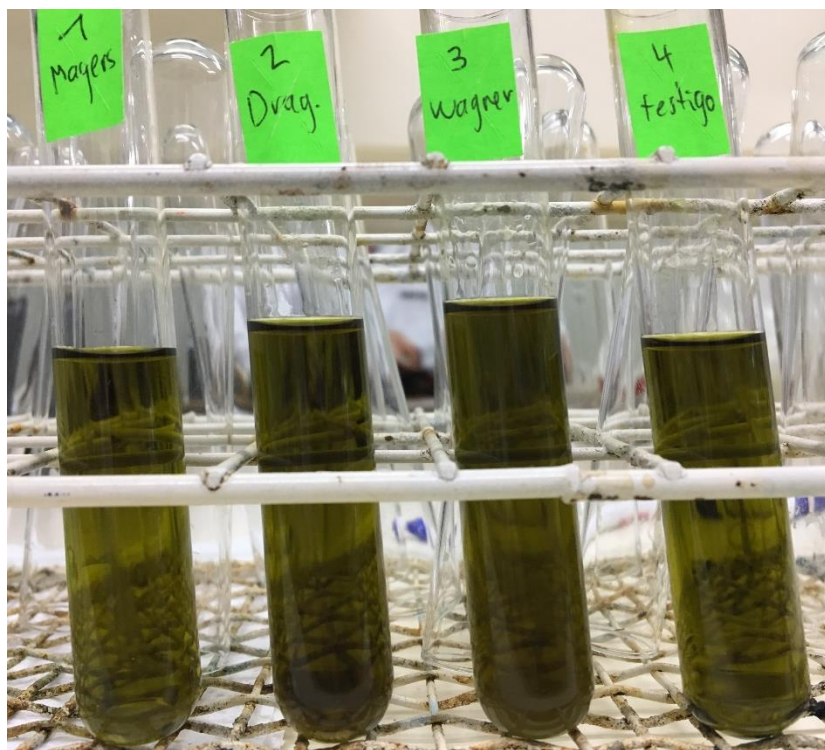


Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

10.6 Anexo 6. Investigación de terpenos.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.

10.7 Anexo 7. Investigación de alcaloides.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT–.



Br. Jorge André Moran Urizar

Estudiante



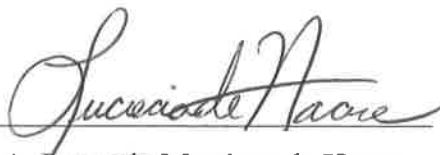
Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

Asesora



Lcda. Lesbia Mengala Guerra Urizar

Revisora



M.A. Lucrecia Martínez de Haase

Directora de Escuela de Química Farmacéutica



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia