

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Identificación de los componentes químicos en *Vitex gaumeri*
como precursores para el tratamiento de leishmaniasis cutánea en
Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Felipe Alejandro Ramírez Caravantes
para optar al grado académico de Licenciado en Química

Guatemala,
2019

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Identificación de los componentes químicos en *Vitex gaumeri*
como precursores para el tratamiento de leishmaniasis cutánea en
Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Felipe Alejandro Ramírez Caravantes
para optar al grado académico de Licenciado en Química

Guatemala,
2019

Vo.Bo.:



Lic. Angélica Rebecca Hasselmann Arana

Tribunal Examinador:



Lic. Ángel César Ramírez Sandoval



Lic. Angélica Rebecca Hasselmann Arana



Lic. Irma Patricia Orellana Catalán

Fecha de aprobación:

Guatemala, 2 de diciembre de 2019

Prefacio

Este trabajo involucró un gran esfuerzo personal que, al final de todo, se transformó en un gran logro. Aparentó ser un trabajo solitario, pero se requirió de la ayuda de muchas personas para poder seguir adelante. Sin el apoyo de estas personas, el trabajo hubiera sido fatigante y demandante; gracias a ellos, el camino hacía mi graduación se convirtió en una verdadera e increíble travesía.

Dentro del área universitaria quiero agradecer al departamento de Biología de la UVG, especialmente a Lic. María Renée Álvarez por su ayuda en la recolección e identificación de la planta, y a Lic. María Priscila Juárez, M. Sc. Gabriela Alfaro, M. Sc. Daniel Ariano y Ericka Santos por su paciencia y ayuda en la gestión del viaje a Petén. También a los alumnos del curso de Comportamiento Animal y Biología de la Conservación, quienes me disculpo porque, según ellos, yo llevé la mala suerte de tardarnos más de 18 horas para llegar a Petén. Pero las risas no faltaron, ¿no?

Agradezco también al departamento de Química de la UVG, especialmente a Lic. Angélica Hasselmann, Lic. Ángel Ramírez, Lic. María José Bran y Lic. Ana Luisa Mendizabal por su ayuda y apoyo durante todos estos meses de experimentación. Menciono también a Byron Barrera, con quien estoy muy agradecido, porque me tuvo paciencia y estuvo atento en la gestión de mis experimentos.

Dentro de la UVG, agradezco además a Dra. Mónica Berger del departamento de Antropología por su ayuda en mantener contactos con las comunidades de Petén, al Ing. Gamaliel Zambrano del departamento de Ingeniería Química y la Dra. Mónica Orozco del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA), quienes me ayudaron en el proceso de moler la planta. A Lic. Renata Mendizabal del Centro de Estudios en Salud (CES), quien me orientó en la búsqueda de información sobre la leishmaniasis.

También agradezco a Pablo Axcantí y a la familia Rodríguez Aguirre, especialmente a Winner y Ashly, quienes me ayudaron un montón en la recolecta de la planta, y a M.A. Isaí Martínez y Elí Martínez por abrirme sus brazos en su querida tierra de Petén.

Adicionalmente, estoy agradecido con Heraldo Hurtado y Guido Fernández por su excelente ayuda dentro del laboratorio, ya que, sin ustedes, no habría terminado mis experimentos a tiempo.

Y en los momentos en que menos lo esperé, Adriana Lam y Erik Torres llegaron al rescate, gracias por aportar esa buena cereza al pastel.

Por último, y no menos importante, agradezco a mi familia –mis padres Angélica y Felipe, y mis hermanas Cecilia, Andrea y Beatriz– y amigos –Erik Torres, Guido Fernández, Mónica Caballeros, Karyn Castañeda, Katherinne Herrera, Luis González, Daniel Gygax, Max Méndez, Pedro Valdés, Paolo Marsicovétere, Marcos Gutiérrez, Rodrigo Albizures, Mariana Pira, Ana Lucía Vásquez, Javier Rodríguez, Elí Martínez, Heraldo Hurtado, Francisco Herrarte, Silvio Urizar, Luisa Reynoso, Adriana Lam, Gabriela Cabrera, Paula Mejicano, Mijeong Lee, Marcela Morales, Estefani Quesada, Diego González, Eduardo Santizo, Werner Morales y Andrea Portocarrero–, quienes estuvieron siempre al tanto de mi investigación.

Esta investigación te la dedico a ti, querido lector, ya que te has tomado el tiempo en tomar esta investigación / tesis para fines científicos, como lo son la búsqueda de métodos que utilicé en mi trabajo –que con mucho gusto recopilé para ti–, la investigación de resultados y conclusiones –que con mucho gusto trabajé para ti, sabiendo que la gente necesita que esta investigación continúe–, o simplemente para aumentar tu conocimiento –que con mucho gusto comparto para ti, sabiendo que la ciencia es de todos y para todos–. Gracias a ti sabré que Guatemala podrá salir adelante en estas épocas tormentosas.

ÍNDICE

	Página
Prefacio	ix
Lista de cuadros	xiii
Lista de figuras.....	xv
Resumen.....	xix
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	3
A. General	3
B. Específico	3
III. Justificación.....	5
IV. Marco teórico.....	7
A. Leishmaniasis	7
B. Plantas medicinales	14
C. Género <i>Vitex</i>	16
V. Antecedentes.....	19
VI. Metodología.....	21
A. Sitio de estudio	21
B. Sujeto de estudio.....	21
C. Diseño, enfoque y tipo de investigación.....	21
D. Tipo y tamaño de muestra	21
E. Criterio de inclusión y exclusión.....	21
F. Variables.....	21
G. Hipótesis	22
H. Metodología.....	22
I. Plan de análisis de datos y presentación de resultados	25
VII. Resultados.....	27
A. Taninos	28
B. Esteroles	29
C. Glicósidos cianogénicos	30

D.	Sesquiterpenlactonas	30
E.	Quinonas.....	32
F.	Saponinas.....	33
G.	Glicósidos cardiotónicos	35
H.	Flavonoides	36
I.	Alcaloides	38
VIII.	Análisis de resultados	41
A.	Identificación de las familias.....	41
B.	Comparación entre hoja y corteza	45
IX.	Conclusiones.....	47
X.	Recomendaciones	49
XI.	Bibliografía.....	51
XII.	Anexo.....	57
A.	Figuras adicionales	57
B.	Entrevista.....	86
C.	Metodología complementaria	87
D.	Certificado	98

Lista de cuadros

Página

1. Detección de moléculas volátiles en aceites esenciales por cromatografía de gases con espectrómetro de masas. Los picos descritos se refieren al cromatograma de la Figura 11. .	27
2. Tiempos de extracción del sistema Soxhlet con diferentes solventes.	28
3. Descripción de los productos de las pruebas para taninos realizadas en los extractos de diclorometano y metanol en hoja y corteza.....	28
4. Descripción de los productos de las pruebas para esteroides realizado en los extractos de diclorometano, benceno y metanol.....	29
5. Prueba de Guignard para confirmar la presencia de glucósidos cianogénicos.....	30
6. Descripción de los productos de las pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de diclorometano y metanol.....	31
7. Cromatografía en capa fina (TLC) de la planta seca. Se utilizó una solución de resorcinol 2% en metanol junto con ácido sulfúrico 2% (1:1) como agente revelador.....	32
8. Pruebas de quinonas adicionales. Ver Figura 40.....	32
9. Descripción de los productos de las pruebas para quinonas en extractos de diclorometano, benceno y metanol.....	33
10. Descripción de los productos de las pruebas para saponinas (ver Figura 42).	34
11. TLC de la planta seca para la separación y detección de saponinas. El revelador (A) es una solución en cloroformo de cloruro de antimonio (III) al 20% y (B) es una solución etanólica de ácido acético al 10% con ácido sulfúrico al 10%.	34
12. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos. (Ver Figura 45 al Figura 48).	35
13. Test de Raymond para glicósidos cardiotónicos.	35
14. Descripción de los productos de las pruebas para glicósidos cardiotónicos en extractos metanólicos.	36
15. TLC de la planta seca para la separación y detección de glicósidos cardiotónicos. Se realizó con una fase móvil de diclorometano–metanol–agua (65:35:10) y con revelador (A) de cloruro de antimonio (III) y (B) de cloramina T.....	36
16. Descripción de los productos de las pruebas para flavonoides.	37
17. Descripción de los productos de las pruebas para alcaloides.	38
18. TLC de la planta seca para la separación y detección de alcaloides. Se realizó con una fase móvil de diclorometano-acetona-dietilamina (5:4:1) y con revelador (A) de reactivo de Dragendorff y (B) de ácido sulfúrico al 5%(v/v).	39

Lista de figuras

	Página
1. Leishmaniasis A) cutánea (LC) y B) mucocutánea (LMC).	8
2. Secciones transversales de A) un promastigoto con aumento de $\times 11000$ y de B) un amastigoto con aumento de $\times 28000$. Se observa el núcleo (N), el cinetoplasto (K), el flagelo (F) y un megasoma (M) –homólogo a un lisosoma–.	9
3. Mosca de arena – <i>Phlebotomus papatasi</i> –.	10
4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	11
5. Árbol y frutos de <i>Vitex gaumeri</i> (San Benito, El Petén, Guatemala).	17
6. Hojas y flores de <i>Vitex gaumeri</i> (San Benito, El Petén, Guatemala).	18
7. Diagrama de flujo de la metodología	57
8. Mapa del lugar en donde se recolectó la planta. Barrio El Pedregal, San Benito, Petén, Guatemala, con coordenadas 16.926479, –89.915665.	58
9. Fotografías de <i>V. gaumeri</i> recolectadas en San Benito, Petén, Guatemala. La descripción de esta planta se presenta en el Certificado en la página 90.	58
10. Sistema de extracción Soxhlet (izquierda) y de destilación por arrastre de vapor (derecha) utilizados durante la investigación.	59
11. Cromatogramas de la hoja y corteza de <i>V. gaumeri</i> . Las condiciones de la cromatografía se describen en la metodología (página 17).	59
12. Control positivo para la prueba de cloruro férrico en taninos. De izquierda a derecha: positivo para ácido gálico, positivo para pirocatecol y positivo para pirogalol.	60
13. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de diclorometano en hoja. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de cloruro férrico (FeCl_3), 4) blanco	60
14. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de metanol en hoja. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de FeCl_3 , 4) blanco.	61
15. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de diclorometano en corteza. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de FeCl_3 , 4) blanco.	61
16. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de metanol en corteza. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de cloruro férrico FeCl_3 , 4) blanco.	62
17. Comparación entre el color del test de FeCl_3 en extracto metanólico de hoja (izquierda) y corteza (derecha).	62
18. Prueba de esteroides para extracto de diclorometano en hoja. 1) Test de Liebermann–Burchard (L–B), 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.	63
19. Prueba de esteroides para extracto de benceno en hoja. 1) Test de L–B, 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.	63

20. Prueba de esteroides para extracto de metanol en hoja. 1) Test de L–B, 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco. 64
21. Prueba de esteroides para extracto de diclorometano en corteza. 1) Test de L–B, 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco. 64
22. Prueba de esteroides para extracto de benceno en corteza. 1) Test de L–B, 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco. 65
23. Prueba de esteroides para extracto de metanol en corteza. 1) Test de L–B, 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco. 65
24. Pruebas de esteroides bajo luz ultravioleta. A) Muestra de benceno en hoja del test de L–B, B) muestra de metanol en hoja del test de L–B, C) muestra de metanol en hoja del test de L–B para saponinas esteroidales, D) muestra de benceno en hoja del test de Salkowski 66
25. Esquema de los tubos de ensayo para el test de Guignard. 66
26. Test de Guignard para la presencia de glicósidos cianogénicos en hoja. De izquierda a derecha: extracto de benceno, hexano, diclorometano, metanol y planta seca. 67
27. Test de Guignard para la presencia de glicósidos cianogénicos en corteza. De izquierda a derecha: extracto de benceno, hexano, diclorometano, metanol y planta seca. 67
28. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de diclorometano en hoja. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal. 68
29. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de metanol en hoja. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal. 68
30. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de diclorometano en corteza. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal. 69
31. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de metanol en corteza. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal. 69
32. Cromatografía en capa fina (TLC) de la muestra de hoja. De izquierda a derecha: 1) fase móvil de benceno–metanol (9:1) y su observación bajo luz UV, 2) fase móvil de cloroformo–metanol (99:1) y su observación bajo luz UV. 70
33. Cromatografía en capa fina (TLC) de la muestra de corteza. De izquierda a derecha: 1) fase móvil de benceno–metanol (9:1) y su observación bajo luz UV, 2) fase móvil de cloroformo–metanol (99:1) y su observación bajo luz UV. 70
34. Prueba para quinonas en extracto de diclorometano en hoja. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV. 71
35. Prueba para quinonas en extracto de benceno en hoja. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV. 71
36. Prueba para quinonas en extracto de metanol en hoja. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV. 72

37. Prueba para quinonas en extracto de diclorometano en corteza. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersion de acetato de magnesio bajo luz UV. 72
38. Prueba para quinonas en extracto de benceno en corteza. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersion de acetato de magnesio bajo luz UV. 73
39. Prueba para quinonas en extracto de metanol en corteza. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersion de acetato de magnesio bajo luz UV. 73
40. Pruebas para quinonas. De izquierda a derecha: prueba de Bornträger modificado y aspersion de acetato de magnesio para corteza y hoja respectivamente. 1) Extracto de diclorometano, 2) de benceno, 3) de metanol. 74
41. Pruebas para quinonas bajo luz UV. Ejemplo de las distintas coloraciones que tuvieron los resultados. 1) solución verdosa traslúcida, 2) solución brillante, 3) solución verdosa opaca. 74
42. Prueba de L–B para saponinas esteroidales y test de espuma en corteza y hoja. 75
43. TLC de planta seca para detección de saponinas en hoja. Se utilizó una fase móvil de 1) acetona–hexano (4:1) y 2) cloroformo–metanol–agua (13:7:1). Se reveló asperjando A) cloruro de antimonio (III) (SbCl₃) al 20% en cloroformo y B) reactivo de L–B. 75
44. TLC de planta seca para detección de saponinas en corteza. Se utilizó una fase móvil de 1) acetona–hexano (4:1) y 2) cloroformo–metanol–agua (13:7:1). Se reveló asperjando A) SbCl₃ al 20% en cloroformo y B) reactivo de L–B. 76
45. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto de hexano. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después. 76
46. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto de diclorometano. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después. 77
47. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto de benceno. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después. 77
48. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto metanólico. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después. 77
49. Test de Raymond para glicósidos cardiotónicos en extracto de hoja. De izquierda a derecha: extracto en benceno, en diclorometano y en hexano. 78
50. Test de Raymond para glicósidos cardiotónicos en extracto de corteza. De izquierda a derecha: extracto en benceno, en diclorometano y en hexano. 78
51. Pruebas de glicósidos cardiotónicos en extracto metanólico de hoja. 1) Blanco, 2) test de Raymond, 3) test de Baljet, 4) test de Xantidrol. 79

52. Pruebas de glicósidos cardiotónicos en extracto metanólico de corteza. 1) Blanco, 2) test de Raymond, 3) test de Baljet, 4) test de Xantidrol.	79
53. TLC de planta seca para la detección de glucósidos cardiotónicos en hoja. En la placa de la izquierda se utilizó la solución de SbCl ₃ al 20% en diclorometano y en la derecha cloramina T como reveladores.	80
54. TLC de planta seca para la detección de glucósidos cardiotónicos en corteza. En la placa de la izquierda se utilizó la solución de SbCl ₃ al 20% en diclorometano y en la derecha cloramina T como reveladores.	80
55. Pruebas para flavonoides en Morín, un control positivo de flavonoles. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con SbCl ₃ , 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de FeCl ₃ , 7) test de Dimroth.	81
56. Pruebas para flavonoides en extracto de benceno en hoja. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con SbCl ₃ , 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de FeCl ₃ , 7) test de Dimroth.	81
57. Pruebas para flavonoides en extracto metanólico en hoja. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con SbCl ₃ , 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de FeCl ₃ , 7) test de Dimroth.	82
58. Pruebas para flavonoides en extracto de benceno en corteza. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con SbCl ₃ , 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de FeCl ₃ , 7) test de Dimroth.	82
59. Pruebas para flavonoides en extracto metanólico en corteza. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con SbCl ₃ , 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de FeCl ₃ , 7) test de Dimroth.	83
60. Pruebas para alcaloides primarios, secundarios o terciarios en hoja. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.	83
61. Pruebas para alcaloides cuaternarios en hoja. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.	84
62. Pruebas para alcaloides primarios, secundarios o terciarios en corteza. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.	84
63. Pruebas para alcaloides cuaternarios en corteza. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.	85
64. TLC de la planta seca para la detección de alcaloides en hoja con fase móvil de diclorometano-acetona-dietilamina (5:4:1). Las placas fueron reveladas con (A) reactivo de Dragendorff, (B) ácido sulfúrico al 5%(v/v).	85
65. TLC de la planta seca para la detección de alcaloides en corteza con fase móvil de diclorometano-acetona-dietilamina (5:4:1). Las placas fueron reveladas con (A) reactivo de Dragendorff, (B) ácido sulfúrico al 5%(v/v).	86

Resumen

Vitex gaumeri es una planta utilizada en Petén, Guatemala, para tratar las heridas de leishmaniasis cutánea (LC). Estudios corroboran esta información al afirmar que la corteza de *V. gaumeri* sí posee propiedades anti leishmaniasis, mientras que en otras partes de la planta no poseen tal actividad; sin embargo, no se han presentado estudios que realicen un tamizaje completo a la planta o que identifiquen las familias de metabolitos secundarios principales presentes en ella. Con la idea de determinar las principales familias de metabolitos secundarios en hoja y corteza de *V. gaumeri*, se realizó varias pruebas colorimétricas cualitativas para afirmar o negar la presencia de estos metabolitos. Se obtuvo que la hoja presenta taninos derivados del pirogalol, esteroides, quinonas diferentes a antraquinonas, flavonoides de tipo flavona y alcaloides cuaternarios; por otro lado, la corteza presenta taninos derivados del ácido gálico y del pirocatecol, quinonas distintas a antraquinonas, saponinas, flavonoides de tipo flavononas, flavonoles o flavanonoles y posiblemente alcaloides. La diferencia más notoria es la presencia de saponinas, ya que están presentes en la corteza y ausentes en la hoja, por lo que estas son la familia de metabolitos secundarios que se estaba buscando y que poseen la mayor probabilidad de tener actividad anti leishmaniasis. Es necesaria una investigación futura de estas saponinas derivadas de *V. gaumeri* y sus efectos *in vivo* o *in vitro* con *Leishmania* spp. para poder corroborar los resultados de esta investigación.

I. Introducción

En Guatemala, la leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad endémica en los departamentos de Petén y Alta Verapaz, reportándose al menos 772 casos en el 2015 (Vásquez, 2016b). El uso de medicamentos de primera línea, como el Pentostam y el Glucantime, involucra altos costos para los pacientes, además de que estos poseen efectos secundarios severos (Hepburn *et al.*, 1993). El uso de plantas medicinales ha sido una alternativa viable y muy utilizada por los habitantes del país para tratar varias enfermedades, entre las cuales se encuentra *Vitex gaumeri* (Rizzo *et al.*, 1999). La corteza de esta planta es utilizada como unguento sobre las heridas de LC, ya que se ha evidenciado su actividad anti leishmaniasis en promastigotos del parásito (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

No han habido estudios que caractericen los metabolitos de *V. gaumeri* y tampoco se ha realizado una investigación que identifique aquellos metabolitos secundarios principales con la actividad anti leishmaniasis que se caracteriza la corteza; por lo tanto, en esta investigación se identificó las familias de los metabolitos secundarios presentes en la hoja y corteza de esta planta. Como la corteza es el órgano utilizado para tratar la LC y la hoja no posee una actividad significativa (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007), entonces aquellas familias presentes en la corteza y ausentes en la hoja tendrán una mayor probabilidad de ser responsables de la actividad anti leishmaniasis.

Para poder identificar estas familias, se realizaron diferentes análisis colorimétricos cualitativos. Entre los análisis que se realizaron están los necesarios para poder identificar metabolitos volátiles, taninos, esteroides, glicósidos cianogénicos, quinonas, sesquiterpenlactonas, saponinas, glicósidos cardiotónicos, flavonoides y alcaloides. Al poder identificar la presencia o ausencia de estos metabolitos, se puede llegar a la conclusión de cuáles familias están involucradas en la actividad anti leishmaniasis.

Al finalizar la experimentación, se determinó que la hoja posee las siguientes familias de metabolitos secundarios: taninos derivados del pirogalol, esteroides, quinonas que no son antraquinonas, flavonoides de tipo flavona y alcaloides cuaternarios; mientras que la corteza posee taninos derivados del ácido gálico y del pirocatecol, quinonas que no son antraquinonas, saponinas, flavonoides de tipo flavononas, flavonoles o flavanoles y posiblemente alcaloides. Las saponinas son la única familia presente en la corteza y ausente en la hoja, por lo que son la familia que posee la mayor probabilidad de ser el responsable de la actividad anti leishmaniasis. Es necesario realizar experi-

mentos cuantitativos para determinar concentraciones de estos metabolitos en la planta y evaluar la actividad anti leishmaniasis de las saponinas extraídas de la corteza de *V. gaumeri* por métodos *in vivo* o *in vitro* para corroborar los resultados aquí presentados.

II. Objetivos

A. General

Determinar las familias de los metabolitos secundarios principales en hoja y corteza de *Vitex gaumeri* que tienen efecto terapéutico contra el parásito de *Leishmania* spp.

B. Específico

- Identificar las principales familias de los metabolitos secundarios extraídos de *V. gaumeri* por diferentes técnicas de análisis químico cualitativo.
- Comparar las familias de los metabolitos secundarios principales presentes en la corteza y en las hojas de *V. gaumeri*.

III. Justificación

La leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad parasitaria que genera llagas o úlceras en la piel. El parásito que lo causa, *Leishmania* spp., es transmitido por la picadura de la mosca de arena en áreas tropicales y subtropicales. Se ha tratado de controlar la enfermedad al reducir la población del vector, pero no ha sido eficaz debido a la urbanización de áreas rurales y a la perturbación ambiental. Incluso se ha investigado el uso de vacunas para prevenir la LC, pero han presentado resultados poco concluyentes. El único método para tratar la enfermedad es a través del uso de medicamentos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de medicamentos antimoniales pentavalentes para curar la LC, como el Pentostam; no obstante, los precios altos, el poco alcance y la alta toxicidad de estos causan que las personas afectadas busquen otro método para tratarse. El uso de plantas medicinales, como tratamiento alternativo, ha aumentado en los últimos años.

En Guatemala, esta enfermedad es endémica en Petén, siendo principalmente afectados los hombres que trabajan con el campo. Para combatir la enfermedad, los curanderos utilizan una variedad de plantas, principalmente aplicándolo como un emplasto. Se han realizado estudios de estas plantas para corroborar sus propiedades anti leishmaniasis, presentando resultados positivos. Entre las plantas con mejores resultados está la *Vitex gaumeri*.

V. gaumeri, comúnmente llamada yaxnic o jocote de mico en Petén, es una lamiácea presente en México y en Centroamérica, siendo su corteza utilizada como emplasto sobre las heridas de LC. Sin embargo, la planta aún no ha tenido una caracterización fitoquímica, desconociéndose qué metabolitos secundarios le otorgan propiedades anti leishmaniasis.

El presente estudio se enfocó en el análisis e identificación de las principales familias de los metabolitos secundarios de *V. gaumeri* que podrían ser precursores para tratar la LC. Identificarlos en esta planta permitirá el estudio futuro de estas moléculas y la producción de nuevos medicamentos o tratamientos locales que sean más económicos, menos tóxicos y al alcance de miles de afectados con LC.

IV. Marco teórico

A. Leishmaniasis

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias tropicales y subtropicales causadas por el microorganismo *Leishmania* spp., siendo sus principales síntomas dependientes de la especie y de cómo el organismo huésped reacciona ante ella (Grevelink y Lerner, 1996; Martin, 2015). Fue identificada por primera vez en 1903 en India y, hasta el presente, ha sido un problema que ha afectado a 67 países con más de 350 millones de personas en riesgo, con una morbilidad y mortalidad de 400 mil (Grevelink y Lerner, 1996; Ashford *et al.*, 1992) y 20 mil personas anuales respectivamente (Stebut, 2015).

1. Características de los diversos tipos de leishmaniasis.

La enfermedad está dividida en tres categorías principales: la leishmaniasis cutánea (LC), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV). La clasificación depende de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y del parásito causante. El contacto físico con cualquiera de los tipos de leishmaniasis es inofensivo, ya que la transmisión se da por vía intravenosa (Burza *et al.*, 2018).

a) Leishmaniasis cutánea (LC).

La LC es el tipo más común, siendo el 90% de los casos de leishmaniasis a nivel internacional (Stebut, 2015) y afecta principalmente la piel del huésped. Se subdivide en localizada, difusa y reincidente según los síntomas presentes. La LC localizada es endémica en Centroamérica y Suramérica por los parásitos *Leishmania braziliensis* y *L. mexicana*, afectando las partes descubiertas de la piel. Posee un período de incubación de una a tres semanas, presentando pápulas rojas que más adelante se convierten en úlceras circulares con borde morado, costrosas con poca socavación, como se observa en la Figura 1A. Luego de seis a doce meses, la úlcera regresa espontáneamente, dejando una cicatriz permanente (Grevelink y Lerner, 1996).

Los otros dos tipos son menos comunes. La LC difusa, causada por *L. mexicana amazonensis*, se disemina a otras áreas de la piel y la LC reincidente, causada por *L. trópica*, desarrolla nuevas heridas cercanos a las cicatrices de una infección ya curada (Grevelink y Lerner, 1996).

Esta enfermedad es llamada espundia en Europa, Asia y África, mientras que en Latinoamérica es conocida como úlcera del chiclero, ya que afecta principalmente a los hombres recolectores de chicles (Martin, 2015). No suele ser una enfermedad mortal, ya que puede sanar en seis a dieciocho meses luego de la infección (Stebut, 2015).

Figura 1. Leishmaniasis A) cutánea (LC) y B) mucocutánea (LMC).



(Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2017)

b) Leishmaniasis mucocutánea (LMC) y visceral (LV).

Tanto la LMC y la LV son menos comunes en comparación de la LC; sin embargo, estas sí son mortales. La LMC, causado comúnmente por *L. braziliensis braziliensis* y *L. b. panamensis*, empieza como una infección en el tabique nasal, inflamándose y, posteriormente, agujereándose, dejando el área alrededor mutilada por necrosis, como se observa en la Figura 1B (Grevelink y Lerner, 1996). Esta forma de leishmaniasis, así como la LC recurrente y difusa, se presenta como una complicación de la LC al no ser tratada adecuadamente (WHO, 2010).

Por otro lado, la LV afecta varios órganos internos, produciendo hiperpigmentación de la piel e hiperglobulinemia. Es causado por *L. donovani* en la India y en el Este africano, lugares donde lo conocen como kala-azar (Grevelink y Lerner, 1996). En América Latina y en Asia Central, el parásito responsable es *L. infantum*. Sin el tratamiento adecuado, es fatal en menos de dos años debido a la presencia de anemia severa o por una infección bacteriana secundaria. Es necesario incluso realizar una prueba de VIH a los pacientes con LV, ya que sus manifestaciones suelen ser atípicas y más severas (Burza *et al.*, 2018).

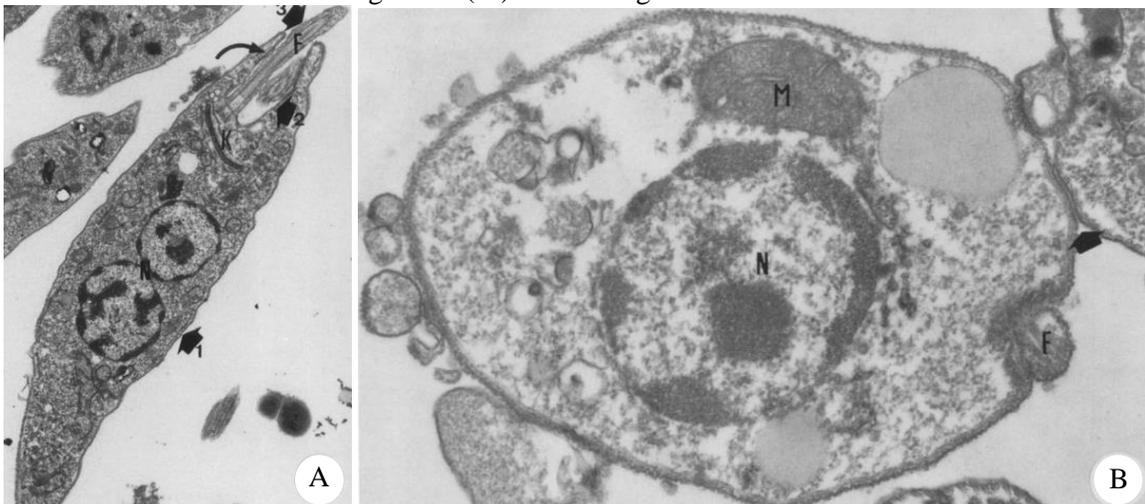
Al recuperarse de LV es común adquirir nuevamente la enfermedad, llamándose post-kala-azar, y es aún más mortal (Grevelink y Lerner, 1996). Esta enfermedad aparece usualmente luego de seis meses o incluso durante el estado activo de la LV (WHO, 2010). Los parásitos sobreviven bajo la piel luego del tratamiento, presentando una mácula hipopigmentada en el tronco o en la boca, el cual se extiende por todo el cuerpo (Burza *et al.*, 2018).

2. El parásito *Leishmania* spp.

El género *Leishmania* es distintiva de los demás parásitos al poseer fisiología diferente estando dentro del vector –llamándose promastigoto– y estando dentro del huésped –llamándose amastigoto–. El parásito es ovalado con órganos internos visibles, como el núcleo y algunos cinetoplastos –los cuales contienen ADN externo– (Herwaldt, 1999).

Los promastigotos son células ovaladas flageladas con 15 a 20 μm de longitud –Figura 2A–. La presencia del flagelo les permite trasladarse del sistema digestivo del vector a su probóscide, facilitando así la transmisión. Por otro lado, los amastigotos son células casi circulares con un diámetro de 3 a 5 μm . Su flagelo está contraído –Figura 2B–, debido a que necesitan recubrirse para protegerse de los fagolisosomas del huésped y garantizar su sobrevivencia (Pace, 2014).

Figura 2. Secciones transversales de A) un promastigoto con aumento de $\times 11000$ y de B) un amastigoto con aumento de $\times 28000$. Se observa el núcleo (N), el cinetoplasto (K), el flagelo (F) y un megasoma (M) –homólogo a un lisosoma–.



(Pimenta y de Souza, 1987)

a) El vector.

La infección se da por el piquete de las moscas de arena hembras –de la familia Psychodidae– infectadas con *Leishmania* spp. En Europa, Asia y África, el vector pertenece al género *Phlebotomus* –Figura 3–, mientras que el género *Lutzomyia* es quien afecta en toda América (Grevelink y Lerner, 1996). Solo estos géneros pueden transmitir el parásito ya que el ambiente interior de su sistema digestivo es indispensable para el ciclo de vida de *Leishmania* y la saliva en su probóscide propicia la transmisión (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987).

Figura 3. Mosca de arena –*Phlebotomus papatasi*–.



(Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2017)

Estas moscas de arena son dípteros pequeños –con alrededor de 2 mm de longitud–, nocturnos y con vuelo de corta distancia. Habitan en ambientes con temperaturas arriba de 10 °C, siendo la razón de que la leishmaniasis afecte zonas tropicales y subtropicales. No obstante, se han dispersado últimamente en regiones europeas debido a la globalización y a cambios climáticos (Stebut, 2015).

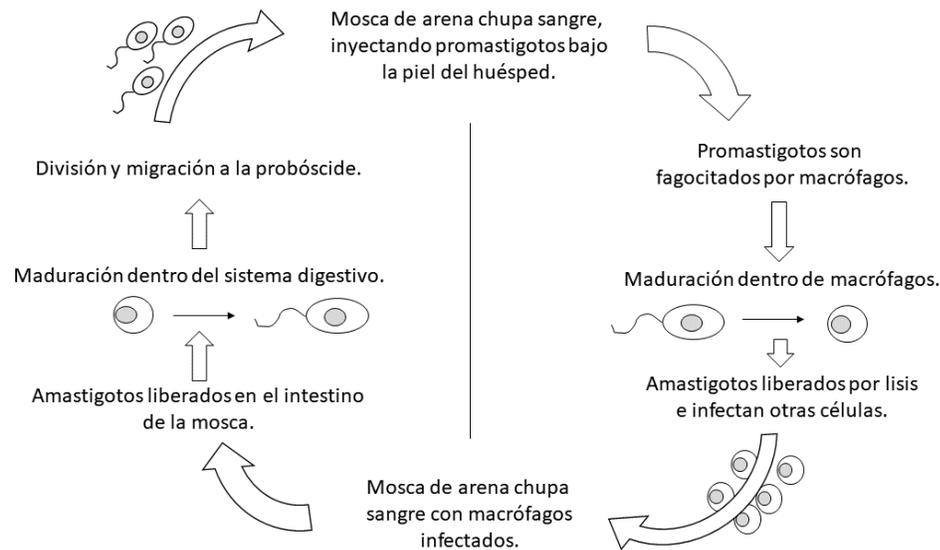
Al ser muy pequeños y no producir sonido, son difíciles de detectar; sin embargo, están activos en épocas cálidas y en ambientes abiertos. Estos dípteros viajan a cortas distancias –alrededor de un metro–, por lo que una forma de evitar el piquete es durmiendo en literas o en lugares altos (Pace, 2014). Debido a su pequeño tamaño, un mosquitero no las puede detener.

b) Ciclo de vida.

La transmisión ocurre a través de la glándula salivar de la mosca de arena durante el piquete. Los promastigotos flagelados viajan a través de la probóscide y llegan a la dermis del huésped durante el piquete. El parásito es fagocitado por los macrófagos dermales y se transforman en amastigotos dentro de ellos, quienes resisten y se adaptan para sobrevivir. Los amastigotos se multiplican y son liberados por la lisis del fagocito. Se repite este ciclo de infección hasta que llega otra mosca de arena y chupa sangre infectada. En el sistema digestivo de la mosca, los amastigotos se transforman nuevamente en promastigotos y se trasladan a la glándula salivar para infectar nuevos huéspedes (Stebut, 2015). En la Figura 4 se resume este ciclo de vida.

A la semana de la infección, ocurre la inflamación de células epiteliales que originan granulomas visibles en la piel. Los humanos son huéspedes incidentales, ya que el objetivo de las moscas de arena son roedores pequeños, perros y, en algunos casos, caballos (Stebut, 2015).

Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.



(Elaboración propia)

3. La enfermedad a nivel internacional.

La incidencia de esta enfermedad ha ido aumentando considerablemente en los últimos años, principalmente en los países en vías de desarrollo. En Brasil, los casos de leishmaniasis han aumentado en un 175% de 1998 a 2003; en Kabul, Afganistán, ha aumentado un 375% los casos de LC de 1994 a 2002; y en Aleppo, Siria, ha aumentado un 61% de 1998 a 2008 (Desjeux, 2004).

El aumento del número de casos ha sido causado por cambios ambientales y de cambios en el comportamiento del vector debido a la intrusión del hombre al bosque primario, la deforestación y la migración de comunidades rurales a áreas urbanas, ayudando a su propagación (Desjeux, 2004). Además, riesgos individuales como la malnutrición y el SIDA favorecen la infección por la incapacidad del cuerpo para contrarrestar la enfermedad (Desjeux y Alvar, 2003).

4. La enfermedad a nivel nacional.

En Guatemala, ha habido un aumento en la tasa de incidencia de leishmaniasis desde 2011 al 2015, último año el cual se reportaron 772 casos, originándose la mayoría en los departamentos de Petén y de Alta Verapaz (Vásquez, 2016b). En 2017 se reportó 712 casos en el Sistema de Información Gerencial en Salud –SIGSA– (OPS, 2018). Estos datos aparentan una disminución en la tasa de morbilidad entre 2015 y 2017; sin embargo, se realizó un estudio y se observó que los datos del Ministerio de Salud están subestimados: la tasa de morbilidad estimada está muy por debajo de

la tasa real (Copeland *et al.*, 1990). La razón de este error se debió a la detección pasiva de la enfermedad.

Los más afectados en el país han sido los jóvenes adultos de entre 20 y 24 años de edad (Vásquez, 2016b) y los hombres sobre las mujeres, siendo un 75% de los casos en 2016 (Vásquez, 2016a). Al ser el vector un organismo con preferencia en épocas calurosas, la mayor tasa de morbilidad ocurre entre mayo y agosto. En general, el 75.5% de los casos han sido de LC, mientras que un 0.4% han sido por LV y LMC. Debido al poco control de registros, el 24.1% de los casos no categorizados se han clasificado como leishmaniasis general o no especificado (Vásquez, 2016a).

5. Tratamientos disponibles.

Es necesario identificar la enfermedad –y la especie del parásito causante– lo más pronto posible, ya sea realizando una diagnosis por cultivo o visualización directa, o realizando una prueba Montenegro. Entre las características visuales están: la observación directa de los parásitos bajo la piel, los nódulos –debido a la mordida de la mosca– que crecen y se transforman en úlceras semanas después, y la presencia de bordes demacrados y levantados (Moore y Lockwood, 2011). La opción más confiable es realizar un PCR para detectar el ADN del parásito (Moore y Lockwood, 2011), una biopsia y un cultivo (Stebut, 2015).

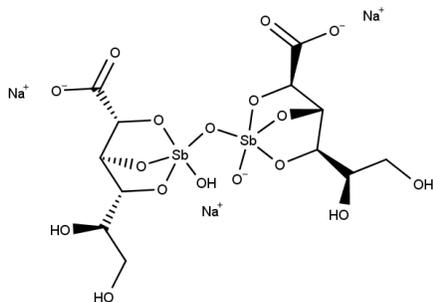
La prueba Montenegro es un marcador de respuesta inmune celular que mide la reacción de hipersensibilidad retardada. Es positiva si luego de 24 o 72 horas se observa un endurecimiento en la piel de al menos 5 mm desde el lugar de la prueba. Una prueba negativa es indicio de presencia de LV (Burza *et al.*, 2018).

Cabe destacar que los amastigotos no se deben confundir con otros organismos con forma de punto que también son detectables al ojo, como *Histoplasma* spp. En caso de obtener un tratamiento, la primera respuesta positiva debe ser un aplanamiento de la herida y una reepitelización (Herwaldt, 1999). En el caso de LC, ha habido casos de una mejora espontánea en el centro de la herida de seis a doce meses luego de haberse iniciado la enfermedad (Momeni, 1996; Morizot *et al.*, 2007).

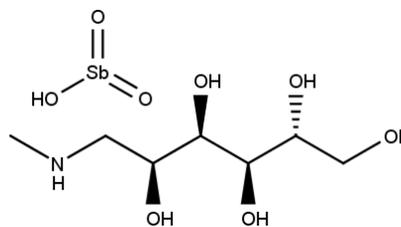
a) Tratamientos de primera y segunda línea.

La primera línea de drogas para tratar la leishmaniasis son las antimoniales pentavalentes, los cuales son administrados vía intravenosa (Martin, 2015). Entre los más utilizados están el Pentostam –estibogluconato de sodio (1)– y el Glucantime –antimoniato de meglumina (2)– (Moore y

Lockwood, 2011). Son de primera línea ya que se ha confirmado que en dosis adecuadas son muy efectivas para tratar diferentes tipos de leishmaniasis.

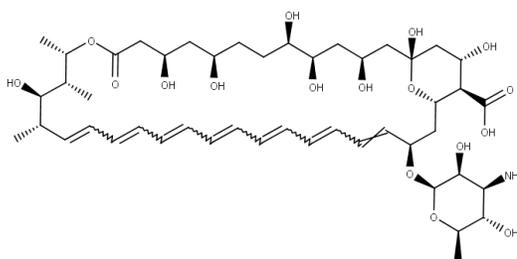


(1)*

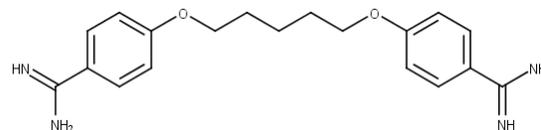


(2)*

Las drogas clasificadas de segunda línea son la anfotericina B (3) y la pentamidina (4). El mecanismo de acción para ambos antiprotozoarios no está bien clara (Cruz *et al.*, 2009). Estos tratamientos, tanto los de primera como los de segunda línea, causan efectos secundarios severos, como hepatotoxicidad (Hepburn *et al.*, 1993) y pancreatitis (Gasser *et al.*, 1994). Además de poseer elevado precio, son difíciles de administrar y poseen poco alcance a las personas de bajo recursos, quienes son los más afectados por estas enfermedades (Cruz *et al.*, 2009). Por esta razón han surgido tratamientos alternos, como el uso de plantas medicinales, y la búsqueda de diferentes formas de administración de los medicamentos para que estos puedan estar al alcance de quienes lo necesitan a un precio adecuado.



(3)*



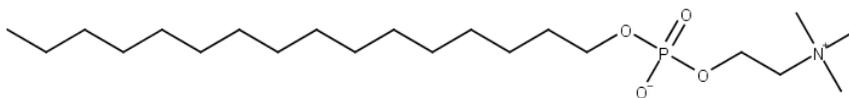
(4)*

b) Tratamientos alternos y en investigación.

En los últimos años se ha reforzado la búsqueda de nuevos tratamientos para curar la leishmaniasis. Para tales propósitos es necesario realizar ensayos con amastigotos intracelulares, ya que posee una buena aproximación a las condiciones del parásito dentro del huésped humano. La caracterización de estas drogas requiere de múltiples protocolos y ensayos similares (Cruz *et al.*, 2009).

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

Entre los tratamientos más modernos se encuentra la miltefosina (5), que es la primera droga oral para tratar la LV. A pesar de ser novedosa, sigue siendo nociva para la salud humana, ya que es categorizada como teratógena (Desjeux, 2004). Por otro lado, se realizó un estudio en Guatemala y se observó que al combinar paramomicina con cloruro de metilbencetonio forma una novedosa y efectiva alternativa para tratar la LC (Arana *et al.*, 2001).



(5)*

Han habido investigaciones al respecto para prevenir la leishmaniasis por medio de vacunas: en lugar de combatir la enfermedad, ya que es mejor prevenirla; no obstante, han habido fallos en la realización de una vacuna preventiva (von Stebut, 2011). Básicamente, la mejor forma para prevenir la leishmaniasis es la prevención de la picadura de la mosca de arena (Pace, 2014). La búsqueda de nuevas drogas son procesos muy costosos y laboriosos (Cruz *et al.*, 2009), por lo que el uso de plantas medicinales reduce estos problemas y otorgan soluciones favorables a los investigadores.

B. Plantas medicinales

El 80% de la población mundial depende del uso de plantas tradicionales para sus tratamientos medicinales, siendo el caso principal en las regiones tropicales debido a su alta diversidad y abundancia de especies. La mayor parte de estos tratamientos involucran a la planta cruda o sus extractos, los cuales son seguros y efectivos para la automedicación. Industrialmente, el uso de estas plantas medicinales es para la obtención de agentes terapéuticos y de materia prima para compuestos más complejos, además de ser modelos para nuevos productos sintéticos y ser marcadores taxonómicos (Akerle, 1993).

Para la Organización Mundial de la Salud –WHO, en sus siglas en inglés– es de importancia la caracterización y el análisis químico de estas plantas medicinales para que puedan ser utilizadas dentro de los servicios de salud (Akerle, 1993). La búsqueda de nuevos agentes anti leishmaniasis derivados de plantas es una excelente alternativa debido a la gran diversidad de plantas, y por ende una gran diversidad química, a que están al alcance de los habitantes locales y a su baja toxicidad al utilizarse en personas (Garcá *et al.*, 2010).

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

2. Flora de Guatemala.

La flora en Guatemala es una de las más diversas y abundantes en Centroamérica, debido a factores geográficos y climáticos (Steyermark, 1950). Por tales razones, los habitantes del país prefieren el uso de plantas locales en lugar de productos importados, además de que son más económicos y fáciles de obtener. El uso de plantas medicinales en países en vías de desarrollo ayuda a reducir la importación de drogas e incrementa la autodependencia económica (Akerle, 1993).

Se han realizado varios estudios con estas plantas para determinar su impacto en las comunidades. En una de ellas, muestran un listado extenso de las plantas utilizadas como remedios medicinales, ya sea para tratar fiebres, aliviar enfermedades gastrointestinales o curar la leishmaniasis. Entre las plantas más conocidas por los habitantes de la región norte del país para curar la LC fueron *Thevetia ahouai*, *Cecropia peltata*, *Psidium guajava*, *Hamelia patens* y *Vitex gaumeri* (Rizzo *et al.*, 1999), siendo este último el menos estudiado.

C. Género *Vitex*

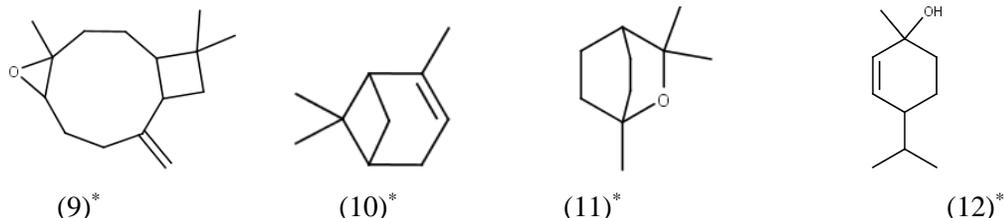
El género *Vitex* incluye aproximadamente 270 especies conocidas, siendo el más extenso de la familia de Lamiaceae, encontradas principalmente en regiones tropicales y subtropicales del planeta (Meena *et al.*, 2011; Rani y Sharma, 2013). Son arbustos o árboles pequeños con hoja caduca, palmeadas de tres a cinco folios con márgenes enteros o dentados, con inflorescencia terminal en racimos de muchas flores o racimos axiales, y con flores bisexuales (Rani y Sharma, 2013; Brendenkamp y Botha, 1996).

Varios estudios han demostrado que el género *Vitex* posee varios compuestos biológicamente activos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobiales, hepatoprotectores, analgésicos y entre otros. Es un género ideal para el desarrollo de nuevas drogas y tratamientos de bajo costo para enfermedades en países en desarrollo (Meena *et al.*, 2011).

1. Importancia.

Este género de plantas suele ser utilizadas en la medicina tradicional asiática, donde al menos se han estudiado 36 de todas ellas, siendo *V. negundo* y *V. agnus-castus* los más reportados e investigados. Su estudio es de gran importancia, ya que poseen un gran potencial farmacológico (Rani y Sharma, 2013). Por ejemplo, *V. trifolia*, otra especie bien estudiada, posee en sus extractos actividad anticancerígena y como inhibidora del apetito de *Spodoptera frugiperda*, una plaga de insectos (Hernández *et al.*, 1999).

En general, se han reportado la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, fenoles, carbohidratos, proteínas (Devika, 2017) e iridoides (Bello *et al.*, 2018) en varias especies de *Vitex*. Entre los compuestos que resaltan en este género están el óxido de cariofinelo (9), p-cimeno, α -pineno (10), linalool, (Z)-3-hexen-1-ol, eucaliptol (11), trans-p-menth-2-en-1-ol (12) y limoneno (Nyiligira *et al.*, 2004).



Se han descrito y elucidado varios compuestos y metabolitos importantes de varias especies del género *Vitex* (Meena *et al.*, 2010); sin embargo, no ha habido una caracterización fitoquímica completa o parcial como los demás con *V. gaumeri*.

2. *Vitex gaumeri*.

V. gaumeri –o yaxnic, nombre común en Petén, Guatemala– es un árbol de hasta treinta metros de altura con corteza café un poco rugosa, con hojas compuestas de cinco folios elípticos y acuminados, con flores moradas y dispuestas en panículas axiales, y frutos verdes redondos que tornan amarillos al madurar, como se observa en la Figura 5 y Figura 6. Se distribuye desde Chiapas, México, hasta Honduras. En Guatemala se presenta en el norte, en los departamentos de El Petén, Alta Verapaz e Izabal (Rizzo *et al.*, 1999).

Figura 5. Árbol y frutos de *Vitex gaumeri*, ubicada en San Benito, El Petén, Guatemala.



(Fotografías por M.A. Isaí Martínez, 2019).

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

Figura 6. Hojas y flores de *Vitex gaumeri*, ubicada en San Benito, El Petén, Guatemala.



(Fotografías por M.A. Isaí Martínez, 2019).

En México, esta planta es empleada para múltiples funciones, como leña, madera, forraje, tratamientos medicinales, dentro de la apicultura y como valor comercial (Rico-Gray *et al.*, 1991). Entre sus propiedades medicinales, el más reconocido es su capacidad de curar la LC al ser pulverizada y untada en la úlcera (Rizzo *et al.*, 1999). En efecto, se ha comprobado su carácter anti leishmaniasis en promastigotos *in vitro* con extractos metanólicos de la corteza, hojas y raíces, logrando obtener una concentración inhibitoria máxima media (IC50) contra promastigotos *in vitro* de *L. mexicana* de 30 mg/kg en corteza –muy buena actividad–, 173 mg/kg en sus raíces –actividad moderada– y 299 mg/kg en hojas –muy baja actividad– (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007). Por esta razón, es necesario caracterizar fitoquímicamente *V. gaumeri* para determinar las familias de metabolitos secundarios principales que la componen y la hacen útil para tratar la LC en Guatemala.

V. Antecedentes

Entre las investigaciones más relevantes que se han realizado sobre la leishmaniasis cutánea (LC) con *Vitex gaumeri* están aquellos realizados por Rizzo *et al.* (1999) y Peraza-Sánchez *et al.* (2007). El estudio de Rizzo se basó en un sondeo sobre plantas medicinales presentes en Petén, Guatemala, y sus usos más comunes para tratar enfermedades. El enfoque principal fue en aquellas utilizadas para tratar la LC, descubriendo que los habitantes emplean *V. gaumeri*, junto con otras plantas, para curar esta enfermedad. El estudio se realizó utilizando extractos etanólicos para evaluar la actividad anti leishmaniasis sin llegar a obtener resultados concluyentes; a pesar de esto, los autores recomiendan investigar a mayor profundidad *V. gaumeri* ya que fue el que mostró un potencial anti leishmaniasis.

El enfoque del estudio de Peraza-Sánchez se basó en el análisis de la actividad anti leishmaniasis de varias plantas nativas de la península de Yucatán, México. Se concluyó que el extracto metanólico de la corteza de *V. gaumeri* sí posee actividad anti leishmaniasis en comparación al extracto de hoja de la misma planta, el cual no presentó una actividad significativa (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007). Existen otros estudios sobre la actividad del género *Vitex*, pero no específicamente de la especie *V. gaumeri*, habiendo poca información acerca de ella.

En esta investigación, no se evaluará la actividad anti leishmaniasis con los extractos de la planta, ya que existe literatura que afirma su potencial, además de que las pruebas y protocolos son costosas y laboriosas (Cruz *et al.*, 2009); sin embargo, se realizará una comparación cualitativa entre los extractos de hoja y corteza de la especie *V. gaumeri* evaluando la presencia o ausencia de los principales metabolitos secundarios por diferentes pruebas colorimétricas. Los metabolitos secundarios presentes en la corteza y ausentes en la hoja serán los posibles agentes potenciales con actividad anti leishmaniasis.

VI. Metodología

A. Sitio de estudio

Las muestras fueron recolectadas en San Benito, Petén, Guatemala y el análisis fitoquímico se realizó en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG).

B. Sujeto de estudio

Los sujetos de estudio son las hojas y corteza de *Vitex gaumeri*.

C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

La investigación posee diseños múltiples. Involucró tanto un diseño no experimental de tipo transversal descriptivo con enfoque cualitativo –para el tamizaje completo de la planta– y un diseño experimental de tipo experimento puro con enfoque cualitativo –para la determinación de los metabolitos principales en el tratamiento de la leishmaniasis–.

D. Tipo y tamaño de muestra

La muestra fue de tipo no probabilístico por conveniencia: se eligió la muestra por cercanía al sitio de estudio. El tamaño de muestra fue unitario debido a la naturaleza de la investigación.

E. Criterio de inclusión y exclusión

El criterio de inclusión fue el de selección de la hoja y corteza de *V. gaumeri* de acuerdo a lo investigado de su uso medicinal, se excluyó otros órganos de la planta debido a la nula información presente en la literatura.

F. Variables

- Independientes cualitativas: órgano de la planta y tipo de solvente.
- Dependiente cualitativa: metabolito presente.
- Interviniente: tipo de suelo y época del año.

G. Hipótesis

Se podrá identificar las familias de los metabolitos secundarios principales –que podrán llegar a un futuro estudio de sus propiedades anti leishmaniasis– de acuerdo a la comparación de los extractos de corteza y hoja de *V. gaumeri* por diferentes técnicas de análisis químico cualitativo.

Instrumentos de medición

Para este estudio no se utilizó ninguna herramienta para la recolección de las muestras, ya que estas se recolectarán por conveniencia debido a la naturaleza de la investigación.

H. Metodología

1. Recolección de la muestra

a. Se recolectó 1.0 kg de hoja fresca y 1.0 kg de corteza fresca de *Vitex gaumeri*, ubicado en San Benito, Petén, Guatemala –con las siguientes coordenadas: 16.926479, -89.915665– el día 27 de abril de 2019.

b. Se cortó tres ramas del árbol con fruto y flor, las cuales fueron herborizadas y guardadas en el Herbario UVAL, ubicada dentro de la Universidad del Valle de Guatemala. El Certificado de identificación taxonómica se muestra en el Anexo (página 98).

c. Se trasladaron las muestras de hojas en bolsas de cierre hermético con sílica gel anhidra y las muestras de corteza en bolsas plásticas de recolecta. Al observarse humedad, las muestras fueron secadas toalla y se cambiaron a una nueva bolsa con sílica gel anhidra.

2. Análisis de los aceites esenciales

a. Se rellenaron tres cuartas partes de un balón de tres bocas de 500 mL con muestra fresca de hoja y se armó un sistema de destilación por arrastre de vapor (Figura 10 del Anexo). Se realizó un sistema idéntico con muestra fresca de corteza.

b. Se realizó una destilación por arrastre de vapor para ambas muestras por dos horas.

c. Se extrajo los aceites esenciales por extracción líquido–líquido con éter dietílico (1:3) y se utilizó 1 mL de solución saturada de cloruro de sodio para separar la fase orgánica de la acuosa.

d. Se repitió con otros dos lavados de mismo volumen de éter dietílico (1:3).

e. Se secó la fase orgánica agregando sulfato de sodio anhidro hasta que se dejó de formar grumos. Se esperó al menos 10 minutos para asegurar la sequedad de la solución.

f. Se decantó la solución y se evaporó el solvente en una cápsula de evaporación dentro de un baño María. Se lavó con 1 mL de éter dietílico el sulfato de sodio y se decantó en la cápsula.

g. Se analizó ambos aceites por cromatografía de gases con detector de masas (CG-EM), utilizando una columna HP-Innowax (con dimensiones 60 m de largo, 0.25 mm de diámetro y con partícula de 0.25 μm de diámetro) por 80 minutos con las siguientes condiciones: una corrida isotérmica de 2 minutos a 60 °C seguido de un aumento de temperatura a 235 °C con 3 °C/min de pendiente y otra corrida isotérmica a 235 °C por 20 minutos. Se inyectó 0.2 μL de muestra con un inyector splitless a 250 °C, una interfase a 280 °C y un flujo de helio a 0.5 mL /min.

h. Se determinó los componentes de los aceites esenciales con los cromatogramas obtenidos y la base de datos del CG-EM. Para esto se utilizó el software Chemstation versión E.02.00.493 y la base de datos de la NIST versión 2.0.

3. Preparación de las muestras para las pruebas fitoquímicas

a. Se secaron las muestras de hoja y corteza en una desecadora a temperatura máxima de 40 °C por una semana.

b. Se molieron a partícula fina las muestras secas, tanto las de corteza como las de hojas.

c. Se guardaron las muestras molidas en frascos de vidrio.

4. Extracción de los metabolitos

a. Se extrajeron los metabolitos por sistema Soxhlet (Figura 10 del Anexo). Se utilizó 82.726 g de hoja y 112.779 g de corteza para la preparación de los sobres de extracción. Se usaron 250 mL de los siguientes solventes en el siguiente orden: hexano, benceno, diclorometano y metanol. Se realizaron las extracciones con los tiempos mostrados en el Cuadro 2 de Resultados.

b. Luego de cada extracción, se redujo el volumen de solvente hasta una tercera parte con rotavapor.

c. Se guardaron los extractos en frascos de vidrio oscuro.

5. Pruebas colorimétricas. Se realizaron múltiples pruebas colorimétricas cualitativas, las cuales se enlistan aquí y están descritas en Metodología complementaria en el Anexo (página 86).

a. Para las muestras secas y molidas se realizaron las siguientes pruebas

i. Glicósidos cianogenéticos

ii. Quinonas

- iii. Saponinas
 - iv. Glicósidos cardiotónicos
 - v. Flavonoides
 - vi. Alcaloides
- b. Para la extracción con hexano se efectuó una prueba para glicósidos cianogenéticos y otra para glicósidos cardiotónicos.
- c. Para la extracción con benceno se llevó a cabo las siguientes pruebas:
- i. Esteroles
 - ii. Glicósidos cianogenéticos
 - iii. Glicósidos cardiotónicos
 - iv. Quinonas
 - v. Saponinas
 - vi. Flavonoides
- d. Para la extracción con diclorometano se hizo las siguientes pruebas:
- i. Taninos
 - ii. Sesquiterpenlactonas
 - iii. Esteroles
 - iv. Glicósidos cianogenéticos
 - v. Glicósidos cardiotónicos
 - vi. Quinonas
 - vii. Saponinas
- e. Para la extracción con metanol se realizó las siguientes pruebas:
- i. Flavonoides
 - ii. Sesquiterpenlactonas
 - iii. Esteroles
 - iv. Glicósidos cardiotónicos

- v. Quinonas
- vi. Taninos
- vii. Saponinas
- viii. Alcaloides
- ix. Glicósidos cianogénicos.

6. Se comparó las familias de los metabolitos secundarios principales identificados en ambos órganos de la planta y se determinó aquellos posibles que ayuden a tratar la leishmaniasis cutánea. Se utilizó el siguiente criterio: las familias de metabolitos secundarios presentes en la corteza y ausentes en la hoja serán los posibles potenciales anti leishmaniasis.

I. Plan de análisis de datos y presentación de resultados

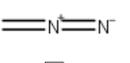
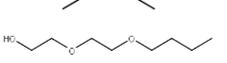
Para la presentación de datos se elaboró un cuadro con todos los metabolitos presentes según al órgano de la planta al que pertenecen y a la familia de metabolitos presentes. Luego se llevó a cabo un cuadro comparativo entre los metabolitos presentes en corteza y hoja para una visualización más clara de las diferencias.

VII. Resultados

Se recolectó 1 kg de hoja y 1 kg de corteza fresca de *Vitex gaumeri* en el Barrio El Pedregal, San Benito, Petén, Guatemala (Figura 8) y fue identificada como tal especie con la ayuda de la comunidad de San Benito junto con la siguiente descripción fisiológica: árbol de hasta 30 metro de altura, con hojas compuestas de cinco folíolos acuminados, flores moradas y fruto globoso amarillo-verde (Figura 9). La identificación fue corroborada con el Herbario UVAL, como lo demuestra el Certificado del Anexo en la página 98.

Como una etapa pre experimental, se realizó una cromatografía de gases con los aceites esenciales de la hoja y corteza de *Vitex gaumeri*. En el Cuadro 1 se presenta un resumen del cromatograma obtenido. De aquí en adelante, cada vez que se mencione hoja y corteza se asumirá de forma implícita que provienen de esta especie de planta.

Cuadro 1. Detección de moléculas volátiles en aceites esenciales por cromatografía de gases con espectrómetro de masas. Los picos descritos se refieren al cromatograma de la Figura 11.

Órgano de la planta	No. pico	t _R (min)	Área (%)	Molécula más probable	Estructura molecular*
Hoja	1	6.551	4.30	Acetona	
	2	8.876	4.10	2-pentanona	
	3	11.873	3.81	3-etoxipentano	
	4	21.730	8.02	Diazometano	
	5	32.347	9.64	Terpinen-4-ol	
	6	43.673	30.17	Butilhidroxitolueno	
	7	46.961	4.91	2,3-dimetiloxirano	
	8	54.289	5.79	2-(2-butoxi)etanol	
	9	58.151	29.25	Éter 18-corona-6	
Corteza	1	5.437	36.23	Pentano	
	2	5.514	41.25	2-metilpentano	
	3	5.623	22.52	Etil éter.	

*Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

Se procedió a realizar una extracción a la hoja y corteza con un sistema Soxhlet y con diferentes solventes. En el Cuadro 2 se presenta el tiempo de extracción que se realizó para cada solvente. La extracción fue clave para las próximas pruebas colorimétricas.

Cuadro 2. Tiempos de extracción del sistema Soxhlet con diferentes solventes.

	Tiempo de extracción (horas)			
	Hexano	Diclorometano	Benceno	Metanol
Hoja	15	10	10	10
Corteza	2	10	3	8

Por medio de varias pruebas colorimétricas se pueden identificar la presencia o ausencia de varias familias de metabolitos secundarios. Muchas de estas pruebas son independientes de otras familias que no están enfocadas a detectar mientras que otras otorgan información de más de una familia de metabolitos secundarios. Del Cuadro 3 en adelante se describen la apariencia de los productos de las diferentes pruebas colorimétricas y muestran si la prueba salió positiva (+) o negativa (-) para el grupo de metabolitos que lo identifica. El blanco en todas las pruebas fue el extracto sin añadirse algún reactivo.

A. Taninos

Cuadro 3. Descripción de los productos de las pruebas para taninos realizadas en los extractos de diclorometano y metanol en hoja y corteza.

	Solvente	Blanco	Test de gelatina	Gelatina con sal	Test de FeCl ₃
Hoja	Diclorometano (Figura 13)	Solución incolora translúcida.	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida color amarillo. (-)
	Metanol (Figura 14)	Solución opaca verde amarillento.	Solución verde amarillento translúcida con precipitado verde. (+)	Igual que el test de gelatina, pero con mayor precipitado. (+)	Solución opaca café profundo. (+)
Corteza	Diclorometano (Figura 15)	Solución incolora translúcida.	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco. (-)	Solución color amarillo. (-)
	Metanol (Figura 16)	Solución amarillenta semi translúcida.	Solución amarillenta opaca con precipitado. (+)	Igual que el test de gelatina, pero más opaca. (+)	Solución café oscuro con precipitado negro. (+)

Para la identificación de taninos, se hicieron tres pruebas diferentes: test de gelatina, test de gelatina con sal y test de cloruro férrico (FeCl_3). Una prueba positiva para el test de gelatina y el de gelatina con sal es la presencia de precipitado, mientras que para el test de cloruro férrico es un cambio de color a verde, azul oscuro o café según el tipo de tanino, ya sea derivado del ácido gálico, del pirocatecol o del pirogalol respectivamente (Figura 12). El Cuadro 3 resume estos resultados. Se observa que se obtuvo resultados positivos en los extractos metanólicos de la hoja y corteza.

B. Esteroles

Cuadro 4. Descripción de los productos de las pruebas para esteroides realizado en los extractos de diclorometano, benceno y metanol.

	Solvente	Blanco	Liebermann– Burchard (L–B)	Test de Salkowski
Hoja	Diclorometano (Figura 18)	Solución incolora translúcida.	Solución incolora opaca con fase inferior marrón. (–)	Solución incolora translúcida con fase inferior amarillo marrón. (–)
	Benceno (Figura 19)	Solución ligeramente color verde translúcida.	Solución translúcida con fase inferior verdoso. Verde fluorescente bajo luz UV. (+)	Solución translúcida con fase inferior color verde fluorescente. Verde fluorescente bajo luz UV. (+)
	Metanol (Figura 20)	Solución amarillenta translúcida.	Solución de igual color que el blanco con fondo marrón oscuro. Verde fluorescente bajo luz UV. (–)	Solución de igual color que el blanco con fondo café amarillo. (–)
Corteza	Diclorometano (Figura 21)	Solución incolora translúcida.	Solución incolora con fase inferior color rosado café. (+)	Solución incolora con fase inferior amarillo. (–)
	Benceno (Figura 22)	Solución incolora translúcida.	Solución incolora semi opaca con fase inferior color rosado café. (+)	Solución incolora, fase inferior color amarillo oliva. (–)
	Metanol (Figura 23)	Solución incolora translúcida.	Solución incolora con fase inferior café rojiza. (+)	Incolora con fase inferior color café amarillo. (–)

Los esteroides pueden ser determinados con las pruebas mostradas en el Cuadro 4: el test de Liebermann–Burchard (L–B) y el Test de Salkowski. Cualquier tipo de esteroide presenta una coloración roja o verde con fluorescencia bajo luz ultravioleta (UV) para la primera prueba y un anillo rojizo para la segunda.

C. Glicósidos cianogenéticos

Los glicósidos cianogenéticos no son fácilmente detectables, ya que son hidrolizados rápidamente, pero, por medio del test de Guignard, el cual utiliza papeles de picrato, se puede comprobar la presencia de estos metabolitos. Se armó un sistema como el mostrado en la Figura 25, donde se colocaron tres papeles de picrato: uno sumergido en la solución –1–, otro suspendido a la mitad del tubo de ensayo –2– y un tercero justo por debajo de la rosca –3–. En las Figura 26 y Figura 27 se muestran las fotografías de los resultados: la tira larga de papel es el –1–, el papel con orificio es el –2– y el que sobra es el –3–. El Cuadro 5 describe con mejor detalle los resultados. Una prueba positiva torna el papel de picrato a un color anaranjado o rojo. Según los resultados, únicamente los extractos metanólicos presentaron un resultado positivo.

Cuadro 5. Prueba de Guignard para confirmar la presencia de glucósidos cianogenéticos.

	Extracto de hexano	Extracto de diclorometano	Extracto de benceno	Extracto de metanol	Planta seca
Hoja (Figura 26)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)	Papel (1) y (2) de picrato con cambio de color aparente. (+)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)
Corteza (Figura 27)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)	Papel (1) y (2) de picrato con cambio de color aparente. (+)	Papeles de picrato sin cambios aparentes. (–)

D. Sesquiterpenlactonas

Las sesquiterpenlactonas son un grupo de la familia de terpenos que poseen quince carbonos y se caracterizan por tener un anillo lactónico. Debido a que las pruebas son específicas para el anillo lactónico, se puede tomar un falso positivo por la presencia de otros metabolitos con anillo lactónico, como es el caso de los glicósidos cardiotónicos. Las pruebas de ambos grupos son entonces complementarias para definir un resultado más concreto. En el Cuadro 6 se presenta el test de Legal,

el cual presenta una coloración roja intensa en caso de ser positivo, y el test de Baljet, presentando un color naranja o rojo en presencia de lactonas. Se obtuvo un resultado positivo únicamente en el extracto de diclorometano en hoja con la prueba de Baljet.

Cuadro 6. Descripción de los productos de las pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de diclorometano y metanol.

	Solvente	Blanco	Legal	Baljet
Hoja	Diclorometano (Figura 28)	Solución translúcida color verde oliva.	Anillo superior naranja con fase inferior café. (-)	Solución opaca con precipitado verde amarillo oscuro y una fase superior café naranja. (+)
	Metanol (Figura 29)	Solución opaca color verde.	Precipitado amarillo con una fase café oscura. (-)	Flóculos amarillos, pero sin cambio de color. (-)
Corteza	Diclorometano (Figura 30)	Solución incolora translúcida.	Anillo superior color naranja con fase inferior incolora translúcida. (-)	Anillo superior color amarillo naranja con fase inferior color amarillo pálido. (-)
	Metanol (Figura 31)	Solución naranja translúcida.	Precipitado amarillo con fase color café opaco. (-)	Solución café con precipitado amarillo. (-)

Para corroborar el resultado positivo obtenido en el extracto de diclorometano en hoja con la prueba de Baljet (Cuadro 6), se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) con las siguientes condiciones: fase estacionaria de sílice con fase móvil de benceno-metanol (9:1) y cloroformo-metanol (99:1). En el Cuadro 7 se presenta los coeficientes de retención (R_f) de los compuestos separados y detectados bajo luz visible (Vis) y luz ultravioleta (UV).

Droždž y Bloszyk (1978) realizaron esta cromatografía y describieron los colores que presenta cada sesquiterpenlactona luego de ser asperjado con una solución reveladora de resorcinol al 2% en metanol con ácido sulfúrico al 2%, mezclados en volúmenes iguales (1:1). Se observa que los colores presentados en el cuadro no coinciden con los presentados por los autores, por lo que no se obtuvo resultados positivos.

Cuadro 7. Cromatografía en capa fina (TLC) de la planta seca. Se utilizó una solución de resorcinol 2% en metanol junto con ácido sulfúrico 2% (1:1) como agente revelador.

	Fase móvil	R _f	Color bajo luz visible (Vis)	Color bajo luz ultravioleta (UV)
Hoja (Figura 32)	benceno–metanol (9:1)	0.898	Verde (-)	Roja–naranja (-)
	cloroformo–metanol (99:1)	0.514	Café opaco (-)	Roja–naranja (-)
		0.751	Café–verde (-)	Roja–naranja (-)
		0.984	Verde (-)	Roja–naranja (-)
Corteza (Figura 33)	benceno–metanol (9:1)	0.391	No visible (-)	Apenas visible (-)
		0.858	No visible (-)	Apenas visible (-)
		0.916	No visible (-)	Apenas visible (-)
		0.967	No visible (-)	Apenas visible (-)
	cloroformo–metanol (99:1)	No presentó	—	—

E. Quinonas

Las antraquinonas, uno de los grupos principales de las quinonas, son fácilmente detectadas con el test de Bornträger y se puede complementar con otras dos pruebas presentadas en el Cuadro 9. En el caso de presentarse quinonas, el test de Bornträger muestra un anillo o una fase de color rosado o rojo, la prueba de solubilidad en hidróxido de sodio (NaOH) puede presentar varios colores y la prueba de aspersion con acetato de magnesio torna a un color violeta, naranja, rosado o amarillo. Bajo luz UV, la prueba con acetato de magnesio puede presentar varios colores, siendo un resultado positivo. En la mayoría de los extractos presentaron una prueba positiva en el test de solubilidad en NaOH, mientras que ninguno presentó positivo en el test de Bornträger.

Cuadro 8. Pruebas de quinonas adicionales. Ver Figura 40.

	Prueba de Bornträger modificado	Resumen de la prueba de aspersion con acetato de magnesio
Hoja	Fase superior incolora opaca, fase inferior incolora translúcida. (-)	No hubo cambios aparentes antes y después de ser asperjados con la solución de acetato de magnesio. (-)
Corteza	Fase superior incolora opaca, fase inferior incolora translúcida. (-)	No hubo cambios aparentes antes y después de ser asperjados con la solución de acetato de magnesio. (-)

Para complementar los resultados del Cuadro 9, se realizó un test de Bornträger modificado, el cual se describe en el Cuadro 8 junto con un resumen de los resultados de la prueba con el acetato de magnesio. Para el test de Bornträger modificado, un resultado positivo es la presencia de un anillo rosado o rojo. En ninguno de los extractos presentó un resultado positivo para ambas pruebas.

Cuadro 9. Descripción de los productos de las pruebas para quinonas en extractos de diclorometano, benceno y metanol.

	Solvente	Bornträger	Solubilidad en NaOH	Aspersión con acetato de magnesio
Hoja	Diclorometano (Figura 34)	Mezcla de dos fases incoloras y translúcidas. (-)	Solución naranja con abundante precipitado verde. (+)	Bajo luz UV, presenta un color rojo. (-)
	Benceno (Figura 35)	Mezcla de dos fases incoloras y translúcidas. (-)	Solución café oscura con fase inferior color amarillo. (-)	Bajo luz UV presenta color café. (-)
	Metanol (Figura 36)	Mezcla de dos fases amarillas y translúcidas. (-)	Solución café oscura con precipitado amarillo. (-)	Bajo luz UV presenta color café con orilla verde.(+)
Corteza	Diclorometano (Figura 37)	Mezcla de dos fases incoloras y translúcidas. (-)	Anillo superior color rojo naranja (+)	No presenta color bajo luz UV. (-)
	Benceno (Figura 38)	Mezcla de dos fases incoloras y translúcidas. (-)	Anillo inferior color naranja. (+)	No presenta color bajo luz UV. (-)
	Metanol (Figura 39)	Mezcla de dos fases incoloras y translúcidas. (-)	Solución naranja roja con precipitado amarillo. (+)	Bajo luz UV presenta color verde fluorescente. (+)

F. Saponinas

Las saponinas son fácilmente detectadas con una prueba de espuma: estas moléculas alteran la tensión superficial del agua y causan espuma luego de ser agitadas. Se puede complementar con un test de L-B modificado para saponinas, el cual presenta un color verde o rojo en caso de ser positivo. Los resultados se resumen en el Cuadro 10 y se observa un resultado positivo en la corteza.

Cuadro 10. Descripción de los productos de las pruebas para saponinas (ver Figura 42).

	Prueba de espuma	Test de L-B en extracto metanólico.
Hoja	Ausencia de espuma. (-)	Solución translúcida color amarillo verde pálido con una fase inferior color café. (-)
Corteza	Presencia de espuma con una altura aproximada de 1 cm. (+)	Solución incolora translúcida con fase inferior color café rojizo. (+)

Para confirmar el resultado positivo de saponinas en corteza se realizó una TLC con las condiciones descritas en el Cuadro 11. Para la solución reveladora (A), las saponinas se detectan con un color rosado o púrpura en luz visible (Vis) y verde o violeta bajo luz UV, y para la solución reveladora (B) se detectan con una coloración oscura bajo luz Vis y fluorescencia verde bajo luz UV. Como se observa en la Figura 44, la placa de TLC 2.A y la placa 2.B sí muestran una coloración positiva para saponinas en corteza.

Cuadro 11. TLC de la planta seca para la separación y detección de saponinas. El revelador (A) es una solución en cloroformo de cloruro de antimonio (III) al 20% y (B) es una solución etanólica de ácido acético al 10% con ácido sulfúrico al 10%.

Órgano de la planta	Fase móvil	Rf	Revelador (A)		Revelador (B)	
			Color Vis	Color UV	Color Vis	Color UV
Hoja (Figura 43)	Acetona-hexano (4:1)	0	Verde (-)	Naranja (-)	—	—
		0.106	—	—	Morado (-)	Naranja (-)
	Cloroformo	0.833	Verde (-)	Violeta (+)	Rojo (-)	Naranja (-)
	-metanol-	0.874	—	—	Amarillo (-)	Naranja (-)
	agua	0.888	—	—	Verde (-)	Naranja (-)
	(13:7:1)	0.913	Amarillo (-)	Verde (+)	Verde oliva (-)	Naranja (-)
	0.984	Verde oscuro (-)	Rojo (-)	—	Café (-)	
Corteza (Figura 44)	Acetona-hexano (4:1)	0	—	Verde (+)	—	—
	Cloroformo	0.510	Naranja azul (+)	Ambos verdes con	Ambos cafés con tonali-	Ambos naranjas con
	-metanol-	0.841	Azul (+)	borde morado (+)	dad morada (+)	borde morado (-)

G. Glicósidos cardiotónicos

El test de Kedde y el de Raymond son específicos para glicósidos cardiotónicos, ya que ambos presentan una coloración violeta o azul en presencia de anillos lactónicos insaturados. De igual forma, el test de Baljet da un color rojo o naranja para el mismo grupo funcional. Como se observa en el Cuadro 12 para el test de Kedde y en el Cuadro 13 para el test de Raymond en extractos diferentes al metanólico, ninguno de los extractos presentó un resultado positivo. En el Cuadro 14 se describe ambas pruebas para el extracto metanólico, que también dieron resultados negativos.

Cuadro 12. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos. (Ver Figura 45 al Figura 48).

Después de ser asperjados con el reactivo de Kedde	
Hoja	No hubo cambio de color. El color fue intensificado únicamente en los extractos metanólicos. (–)
Corteza	No hubo cambio de color. El color fue intensificado únicamente en los extractos metanólicos. (–)

Para confirmar estos resultados, se realizó un test de Xantidrol (Cuadro 14) en el extracto metanólico, el cual es una prueba específica para 2–desoxiazúcares, los cuales se han presentado únicamente en la familia de los glicósidos cardiotónicos. Un color rojo presenta un resultado positivo. No se obtuvo ningún resultado positivo.

Cuadro 13. Test de Raymond para glucósidos cardiotónicos.

	Solvente	Test de Raymond
Hoja (Figura 49)	Hexano	Fase superior color amarillo oliva, una interfase café opaco y una fase inferior verde oliva. (–)
	Diclorometano	Fase superior verde oliva con una fase inferior amarillo. (–)
	Benceno	Fase superior café verde oscuro y una fase inferior verde. (–)
Corteza (Figura 50)	Hexano	Fase superior verde amarillo, interfase naranja y una fase inferior color carmesí. (–)
	Diclorometano	Fase superior amarillo y una fase inferior color carmesí. (–)
	Benceno	Fase superior verde y una fase inferior color amarillo. (–)

Cuadro 14. Descripción de los productos de las pruebas para glicósidos cardiotónicos en extractos metanólicos.

	Blanco	Test de Raymond	Test de Baljet	Test de Xantidrol
Hoja (Figura 51)	Solución opaca color verde.	Solución café oscuro. (-)	Solución café con precipitado amarillo. (-)	Solución translúcida color verde oliva. (-)
Corteza (Figura 52)	Solución naranja translúcida.	Solución café oscuro. (-)	Solución color café naranja con precipitado amarillo. (-)	Solución turquesa que cambió de translúcida a opaca. (-)

Dado que el cloruro de antimonio (III) puede reaccionar con saponinas y glicósidos cardiotónicos, y se había observado una mancha azul en la placa de TLC 2.A en corteza (Figura 44), entonces se corroboró si esta mancha se debe a glicósidos cardiotónicos o a otros metabolitos por medio de otra TLC con cloruro de antimonio (III) como revelador (A) y Cloramina T como revelador (B). El primero da color rosado o púrpura en luz Vis y verde, azul o morado en luz UV para esteroides y triterpenos en general, mientras que la cloramina T da color azul, verde o amarillo bajo luz UV a 365 nm, siendo este específico para glicósidos cardiotónicos. No se observa un resultado positivo para glicósidos cardiotónicos.

Cuadro 15. TLC de la planta seca para la separación y detección de glicósidos cardiotónicos. Se realizó con una fase móvil de diclorometano–metanol–agua (65:35:10) y con revelador (A) de cloruro de antimonio (III) y (B) de cloramina T.

Rf	Revelador (A)		Revelador (B)		
	Color Vis	Color UV	Color Vis	Color UV	
Hoja (Figura 53)	0.903	No visible (-)	Naranja (-)	Verde (-)	No visible (-)
	0.786	—	—	No visible (-)	Naranja (-)
Corteza (Figura 54)	0.887	No visible (-)	Naranja (-)	Azul (-)	No visible (-)

H. Flavonoides

Los flavonoides son una familia compuesta por diferentes grupos de metabolitos, por lo que para cada grupo se presenta una prueba específica. Se realizaron siete pruebas distintas El Cuadro 16 resume todas estas pruebas.

Cuadro 16. Descripción de los productos de las pruebas para flavonoides.

Prueba	Hoja		Corteza	
	Benceno (Figura 56)	Metanol (Figura 57)	Benceno (Figura 58)	Metanol (Figura 59)
Blanco	Solución incolora.	Solución translúcida verde oliva.	Solución incolora.	Solución translúcida amarillo pálido.
Test de Cianidina	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida naranja ámbar. (+)	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida verde jade. Color más fuerte en la fase orgánica. (+)
Test para leucoantocianinas	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida verde. (-)	Igual que el blanco. (-)	Solución opaca azul verdoso. (-)
Test de Shinoda	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida naranja ámbar. (+)	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida verde jade. (+)
Test con $SbCl_3$	Igual que el blanco, con precipitado blanco. (-)	Igual que el blanco, con precipitado blanco. (-)	Igual que el blanco, con precipitado blanco. (-)	Igual que el blanco, con precipitado blanco. (-)
Test con H_2SO_4	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco, pero con un ligero color verde. (-)
Test con $FeCl_3$	Solución del color de la solución de $FeCl_3$. (-)	Solución café oscuro. (+)	Solución del color de la solución de $FeCl_3$. (-)	Solución verde oscuro. (+)
Test de Dimroth	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco. (-)	Igual que el blanco. (-)

El test de Cianidina y el de Shinoda son una prueba general para evidenciar la presencia del esqueleto de los flavonoides, siendo positivo un cambio de color observable. Las leucoantocianinas son detectadas con ácido sulfúrico y calor, siendo positivo cuando la solución se torna un color rojo o violeta. El test con cloruro de antimonio (III) indica presencia de chalconas o flavonas si se observa un precipitado rojo-violeta o amarillo-naranja respectivamente. Si se aplica ácido sulfúrico

sin calor, un cambio de color a amarillo fuerte o a tonalidades de naranja o rojo es positivo para diferentes flavonoides. El test de cloruro férrico indica la presencia de moléculas fenólicas, siendo positivo un cambio de color a verde o azul según lo observado en la prueba para taninos. Por último, el test de Dimroth es específico para 5-hidroxi flavonas. Se obtuvieron resultados positivos para el extracto metanólico en las pruebas de Shinoda, antocianidinas y cloruro férrico, las demás pruebas salieron negativas.

I. Alcaloides

Por último, se realizaron tres pruebas para la detección de alcaloides, ya sea primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios, en la planta seca. El test de Mayer es positivo cuando se produce una solución lechosa o precipitado blanco, en el test de Wagner es positivo cuando se produce flóculos de color café y en el test de Dragendorff cuando se produce una solución naranja marrón. Se observa en el Cuadro 17 que se obtuvieron resultados positivos tanto para la hoja como para la corteza con el test de Dragendorff.

Cuadro 17. Descripción de los productos de las pruebas para alcaloides.

	Alcaloides	Blanco	Test de Mayer	Test de Wagner	Test de Dragendorff
Hoja	Primarios, secundarios o terciarios (Figura 60)	Solución incolora.	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida amarilla. (-)	Solución translúcida naranja marrón. (+)
	Cuaternarios (Figura 61)	Solución translúcida beige claro.	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida amarillo pálido. (-)	Solución translúcida naranja marrón. (+)
Corteza	Primarios, secundarios o terciarios (Figura 62)	Solución incolora.	Igual que el blanco. (-)	Solución translúcida amarillo pálido. (-)	Solución naranja marrón con flóculos naranjas. (+)
	Cuaternarios (Figura 63)	Solución translúcida amarillo ámbar.	Solución amarillo muy pálido. (-)	Solución translúcida amarillo pálido. (-)	Solución translúcida amarillo pálido. (-)

Para corroborar los resultados del test de Dragendorff se realizó una TLC en placas de sílica con fase móvil de diclorometano-acetona-dietilamina (5:4:1) y con revelador (A) de reactivo de Dragendorff y (B) de ácido sulfúrico al 5%(v/v). El primero es positivo si se presenta una coloración naranja oscura o café, mientras que el segundo presenta una coloración azul únicamente bajo luz UV. Se observa en el Cuadro 18 que presentó resultados positivos para todos los alcaloides en la hoja y alcaloides primarios, secundarios o terciarios en la corteza.

Cuadro 18. TLC de la planta seca para la separación y detección de alcaloides. Se realizó con una fase móvil de diclorometano-acetona-dietilamina (5:4:1) y con revelador (A) de reactivo de Dragendorff y (B) de ácido sulfúrico al 5%(v/v).

	Tipo de alcaloide	Rf	Revelador (A)	Revelador (B)
			Color Vis	Color UV
Hoja (Figura 64)	Primario, secundario o terciario	0.079	Rojo intenso (-)	—
		0.926	—	Celeste (+)
		0.957	Franja blanca (-)	—
	Cuaternario	0.126	Naranja oscuro (+)	—
		0.406	Naranja oscuro (+)	—
		0.463	—	Azul (+)
		0.533	Naranja oscuro (+)	Azul (+)
		0.615	Naranja oscuro (+)	—
	0.787	Naranja oscuro (+)	—	
	0.867	—	Azul (+)	
Corteza (Figura 65)	Primario, secundario o terciario	0.580	—	Celeste (+)
		0.943	Franja amarilla blanca. (-)	—
	Cuaternario	No presentó	—	—

VIII. Análisis de resultados

Las muestras de *Vitex gaumeri* fueron recolectadas en San Benito, Petén, y fueron corroboradas con su identificación taxonómica en el Herbario UVAL (ver Certificado del Anexo en la página 98). De forma paralela, se realizó una entrevista a Pablo Axcantí, un curandero de la comunidad de Poptún, Petén. La transcripción de esta entrevista puede ser revisada en Entrevista del Anexo, página 86. En esta entrevista, se destaca el uso insólito de la corteza de *V. gaumeri* para tratar la leishmaniasis: es quemada a ceniza y esta se utiliza como ungüento sobre la piel. Dentro de la metodología no se contempló este paso, ya que esta información fue recabada durante la experimentación y porque el presente trabajo se basó en la actividad anti leishmaniasis que Peralza *et al.* presenta en su trabajo (2007). Por otro lado, Rizzo *et al.* describen también el uso de esta planta como ungüento sobre las heridas de leishmaniasis; sin embargo, no son específicos al momento de describir cómo preparan este ungüento (1999). Queda entonces la tarea para este trabajo de realizar un tamizaje completo a la hoja y corteza de *V. gaumeri* para identificar aquellas familias de metabolitos secundarios que son principales dentro de la actividad anti leishmaniasis según el siguiente criterio: aquellas familias de metabolitos presentes en la corteza y ausentes en la hoja serán los posibles metabolitos con potencial para curar la enfermedad.

De aquí en adelante, cada vez que se mencione hoja y corteza se asumirá de forma implícita que provienen de las muestras de *V. gaumeri* recolectadas.

A. Identificación de las familias

De forma preliminar, se realizó una cromatografía de gases con espectrómetro de masas (CG-EM) para la identificación de metabolitos volátiles en la planta. Se observa en el Cuadro 1 que la corteza no presenta metabolitos volátiles, ya que los identificados en el cromatograma (Figura 11) son parte del éter de petróleo, el cual fue utilizado como solvente para la cromatografía. No obstante, se observa que en la hoja sí presentó moléculas que no provienen del solvente: terpinen-4-ol, butilhidroxitolueno y acetona. Tanto el terpeno como la acetona, son muy comunes dentro de las plantas, siendo las causantes del agradable aroma de las hojas; por otro lado, el butilhidroxitolueno es un compuesto poco tóxico para el humano y se ha encontrado muy rara vez dentro de la naturaleza, encontrándose incluso en el pericarpio del lichi (Jiang *et al.*, 2013). Con estos resultados, no se puede realizar una conclusión robusta acerca de los metabolitos volátiles de la planta, ya

que no se contó con estándares externo necesarios para la identificación de los metabolitos, sino que se utilizó la base de datos que el mismo equipo trae consigo.

Dentro de la experimentación, se realizaron múltiples análisis colorimétricos cualitativos, los cuales ayudaron a evidenciar la presencia o ausencia de ciertas familias de metabolitos. Tales pruebas se basaron en la metodología de varios artículos y libros, los cuales son descritos con mejor detalle en la sección de Metodología Complementaria del Anexo (página 87).

1. Taninos.

Según los resultados del Cuadro 3, tanto la hoja como la corteza presentan taninos dentro de su estructura. El test de gelatina y el de gelatina con sal dan evidencia clara de la familia de los taninos, siendo el test de cloruro férrico el que identifica qué grupo pertenece esos taninos dado al cambio de color. El color no fue completamente visible en los tubos de ensayo, por lo que se dejaron filtrar en un papel toalla y se observa, según la Figura 17, que el extracto metanólico de hoja presenta una coloración similar al control de pirogalol (Figura 12) y el extracto metanólico de corteza presenta una coloración que parece ser la mezcla entre el control de pirocatecol y el ácido gálico. Por lo tanto, la hoja de *V. gaumeri* presenta taninos derivados del pirogalol y la corteza presenta taninos derivados del ácido gálico y del pirocatecol.

2. Esteroles.

Con los resultados del Cuadro 4 se evidencia la presencia de esteroles en el extracto de benceno en hoja y en los extractos de diclorometano, benceno y metanol en corteza. Pese a que se obtuvo resultados negativos en las pruebas de Salkowski en los extractos de corteza, las pruebas de Liebermann–Burchard (L–B) sí dan evidencia de la presencia de esteroles. Si se compara el mecanismo de reacción del test de Salkowski (página 89) con el de L–B (página 88), se observa que en el primer mecanismo ocurre una eliminación seguido de una condensación y en el segundo ocurre una acetilación seguido de una deacetilación. El segundo paso para ambos mecanismos es clave: la condensación entre dos esteroles no se beneficia si existe otra molécula en el medio que lo impida, mientras que la deacetilación no depende de la naturaleza de otras moléculas en el medio.

Una explicación plausible para esto es la presencia de glicósidos esteroidales. En el primer paso del mecanismo para ambas reacciones, el glicósido es separado de la aglicona por efecto de los reactivos; no obstante, la aglicona puede sufrir de una eliminación mas no se puede asegurar que sufra de una condensación con otra aglicona, ya que en el medio estará presente el glicósido libre. El test de Salkowski puede dar un falso negativo si se considera que la condensación no se favorece entre dos esteroides.

Por lo tanto, la hoja de *V. gaumeri* posee metabolitos esteroidales y su corteza posee glicósidos esteroidales.

3. Glicósidos cianogenéticos.

Los glicósidos cianogenéticos no son fácilmente detectables debido a su rápida hidrolización, el cual produce el glicósido y ácido cianhídrico. Esta es una de las pruebas que se debe de realizar al inicio de la experimentación. Según el Cuadro 5, tanto la corteza como la hoja presentan estos metabolitos en el extracto metanólico; sin embargo, este resultado es un falso positivo. Si el extracto metanólico tuviera glicósidos cianogenéticos presentes, también lo tendría la planta seca, ya que el extracto fue obtenido de estas muestras secas. Como se obtuvo un resultado negativo en la muestra de planta seca, entonces existe una contradicción con el resultado positivo en el extracto metanólico. Se puede dar dos afirmaciones: el papel de picrato detectó la presencia de otra familia de moléculas, el cual es posible ya que la prueba es sensible a grupos lactónicos, o los papeles de picrato se contaminaron con el color del extracto. Por lo tanto, la hoja y corteza de *V. gaumeri* no presentan glicósidos cianogenéticos.

4. Sesquiterpenlactonas.

En el Cuadro 6 se observa que únicamente el extracto de diclorometano de hoja obtuvo un resultado positivo en el test de Baljet, indicando la presencia de un grupo lactónico. Como este test no es específico para esta familia de metabolitos, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos y se aplicó una solución reveladora específica para sesquiterpenlactonas según lo descrito por Drożdż y Bloszyk (1978). Según el Cuadro 7, en ninguna de las placas de TLC se obtuvo una coloración positiva. Por lo tanto, la hoja y corteza de *V. gaumeri* no presentan sesquiterpenlactonas, pero sí metabolitos con grupos lactónicos.

5. Quinonas.

La prueba de Bornträger es específica para antraquinonas, mientras que las pruebas con hidróxidos de sodio y acetato de magnesio son para quinonas en general. En el Cuadro 8 y Cuadro 9 se observa que no se obtuvo resultados positivos para el test de Bornträger, por lo que no se presentan antraquinonas en ningún extracto. Los colores en la prueba de hidróxido de sodio indican qué grupo de quinonas está presente en el medio. Según Thomson (1971), un color naranja indica la presencia de 2-hidroxi-naftaquinonas y un color rojo naranja la presencia de 2-hidroxi-antraquinonas; sin embargo, ya se había concluido que los extractos no presentan antraquinonas, por lo que el color rojo naranja se debe a la presencia de más de un tipo de quinona. Ya sea que el extracto tenga 2-hidroxi-naftaquinonas con 3,5-dihidroxi-naftaquinonas o con 2-hidroxi-5-metilbenzoquinonas.

El test de acetato de magnesio fue diseñado en un inicio para determinar la presencia de antraquinonas hidroxiladas (Shibata *et al.*, 1950) pero más adelante se evidenció que determinaba la presencia de quinonas hidroxiladas en general (Thomson, 1971). Para este test, únicamente se obtuvo resultados positivos en los extractos metanólicos de la hoja y corteza, lo cual concuerda con la naturaleza de las quinonas hidroxiladas y su solubilidad en solventes orgánicos polares. En corteza, la prueba de acetato de magnesio se fortalece con la de hidróxido de sodio, evidenciando la presencia de quinonas en este órgano de la planta, pero se presenta una contradicción en el caso de la hoja. Esta contradicción tiene una sencilla explicación: el extracto metanólico de la hoja posee una gran variedad de quinonas que la mezcla de los colores le otorgaron un color café oscuro. Cabe destacar que estas pruebas son cualitativas, por lo que si se presenta mezcla de colores.

Por lo tanto, la hoja y la corteza de *V. gaumeri* presentan quinonas que no pertenecen al grupo de las antraquinonas.

6. Saponinas.

Por medio de la prueba de espuma y del test de L-B modificado para saponinas esteroidales, se evidenció la presencia de saponinas en corteza y su ausencia en hoja, como lo muestra el Cuadro 10. El resultado fue confirmado con una TLC en el Cuadro 11. En la sección de Esteroles (página 42) se había mencionado de un posible glicósido esteroideal presente en los extractos de la corteza. Este glicósido pertenece entonces a la familia de las saponinas, ya que esta familia pertenece a la familia de los glicósidos esteroidales. Por lo tanto, según la evidencia de la sección de Esteroles con la prueba de espuma y L-B, la corteza de *V. gaumeri* presenta saponinas, mientras que la hoja de la misma planta no la presenta.

7. Glicósidos cardiotónicos.

Con las pruebas presentadas en los Cuadros 12 al 15, se observa que tanto la corteza como la hoja no presenta glicósidos cardiotónicos. Estos glicósidos, al igual que las saponinas, pertenecen a la familia de los glicósidos esteroidales, por lo que la ausencia de los glicósidos cardiotónicos refuerza la idea de que los glicósidos esteroidales presentes en los extractos de corteza son de la familia de las saponinas. Por lo tanto, la hoja y corteza de *V. gaumeri* no presentan glicósidos cardiotónicos.

8. Flavonoides.

Los flavonoides son una familia muy extensa de metabolitos, con una alta variedad de estructuras diferentes. Dentro de las siete pruebas colorimétricas distintas que se realizaron (Cuadro 16),

solo se obtuvo resultados positivos en el test de cianidina, de Shinoda y con cloruro férrico. Los test de cianidina y de Shinoda indican la presencia general de flavonoides, por lo que tanto la corteza como la hoja poseen flavonoides, y el color indican qué grupo de flavonoide posee. Como la hoja obtuvo un color naranja ámbar, significa que posee flavonoides de tipo flavona, mientras que la corteza obtuvo un color verde jade, el cual significa que posee flavononas, flavonoles o flavanones. Debido a que los tres grupos poseen estructuras similares, no se puede concluir con certeza si la corteza presenta un solo tipo de flavonoide principal o si es una mezcla de las tres.

Como se había discutido en la sección de Taninos (página 42), el color del test de cloruro férrico es complementario a las demás pruebas, ya que indica la presencia de derivados de pirogalol, pirocatecol y ácido gálico. Al igual que los taninos, los flavonoides presentes en la hoja son derivados del pirogalol y en la corteza son derivados del ácido gálico y del pirocatecol.

Por lo tanto, la hoja y corteza de *V. gaumeri* presentan flavonoides; específicamente, la hoja posee flavonas y la corteza posee flavononas, flavonoles o flavanones.

9. Alcaloides.

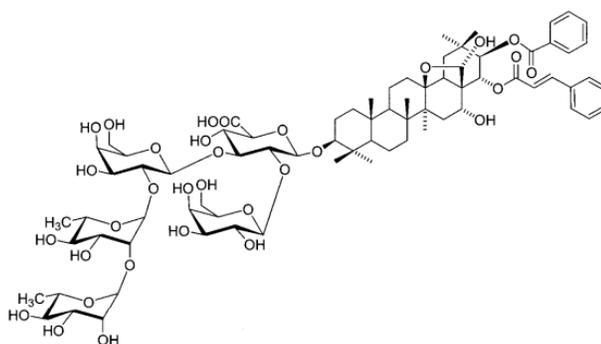
En el Cuadro 17 se presenta los resultados para alcaloides. El test de Dragendorff fue el único que dio positivo para aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias en hoja y únicamente primarias, secundarias o terciarias en corteza. Como se obtuvo resultados negativos en los test de Mayer y Wagner, se corroboró los resultados positivos con una TLC. Los resultados de aminas cuaternarias en hoja (Cuadro 18) son más robustos en comparación de los demás resultados, por lo que no es posible afirmar si existe o no presencia de alcaloides primarios, secundarios o terciarios en hoja y corteza. Por lo tanto, la hoja de *V. gaumeri* presenta al menos alcaloides de tipo cuaternarios, mientras que en la corteza no se puede afirmar si están presentes o no.

B. Comparación entre hoja y corteza

A partir de toda la información obtenida, se puede afirmar que la hoja de *V. gaumeri* posee las siguientes familias de metabolitos secundarios principales: taninos derivados del pirogalol, esteroides, quinonas que no son antraquinonas, flavonoides de tipo flavona y alcaloides cuaternarios; por otro lado, la corteza posee los siguientes: taninos derivados del ácido gálico y del pirocatecol, quinonas que no son antraquinonas, saponinas, flavonoides de tipo flavononas, flavonoles o flavanones y posiblemente alcaloides. Se había mencionado en la sección de sesquiterpenlactonas la presencia de grupos lactónicos distintos a estos terpenos. Como se obtuvo negativo en las pruebas de glicósidos cardiotónicos, estos grupos lactónicos no se pueden identificar ni clasificar a una familia específica, debido a la poca información que se tiene de ellos.

La única familia de metabolitos secundarios principales que están presentes en la corteza y ausentes en la hoja es el de las saponinas. Las saponinas, como la Maesabalide III (13) han sido estudiadas para tratar la leishmaniasis, obteniendo resultados satisfactorios (Germonprez *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2007; Maes *et al.*, 2004). Con esta evidencia, se puede afirmar que las saponinas presentes en la corteza de *V. gaumeri* son la posible familia de metabolitos secundarios principales que poseen potencial anti leishmaniasis.

Para corroborar la conclusión de esta investigación, es necesario realizar experimentos *in vitro* o *in vivo* con *Leishmania* spp.



(13)*

*La estructura presentada es de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

IX. Conclusiones

Por medio de diferentes pruebas colorimétricas cualitativas se pudo realizar una identificación general de las principales familias de los metabolitos secundarios presentes en la hoja y corteza de *Vitex gaumeri*. Se identificó las siguientes familias de metabolitos secundarios en la hoja: taninos derivados del pirogalol, esteroides, quinonas que no son antraquinonas, flavonoides de tipo flavona y alcaloides cuaternarios; y los siguientes en la corteza: taninos derivados del ácido gálico y del pirocatecol, quinonas que no son antraquinonas, saponinas, flavonoides de tipo flavononas, flavonoles o flavanonoles y posiblemente alcaloides. La familia más notoria que está presente en la corteza y ausente en la hoja es la de saponinas.

Las saponinas han sido estudiadas y algunas han sido identificadas por sus propiedades contra la leishmaniasis, como la Maesabalide III, por lo que esta familia es la que posee mayor probabilidad de tener actividad anti leishmaniasis en comparación de las otras familias identificadas. Además, se han realizado estudio con los otros metabolitos presentes en la planta, como flavonoides y quinonas; no obstante, debido al criterio establecido, estas moléculas poseen una menor o nula probabilidad de presentar actividad anti leishmaniasis por estar presente tanto en la hoja como en la corteza de *V. gaumeri*.

X. Recomendaciones

Debido a la naturaleza de la investigación, no se evaluó la actividad anti leishmaniasis de las saponinas identificadas en la corteza de *Vitex gaumeri*, por lo que es necesario realizar experimentos *in vitro* o *in vivo* con *Leishmania* spp para corroborar la conclusión del trabajo. Además, es necesario realizar un análisis cuantitativo de las saponinas y los demás metabolitos secundarios presentes para poder determinar su concentración en la planta.

Con los datos obtenidos en la entrevista, se recomienda realizar una experimentación similar a este trabajo con hojas tiernas recién brotada de las ramas y nuevamente con la corteza, con la diferencia de realizar los análisis colorimétricos después de tratar la hoja y corteza como lo trataría un curandero en Petén; es decir, machacar la hoja y calentarla sobre ceniza caliente y quemar la corteza a ceniza. De esta forma, es posible evaluar e identificar aquellas familias de metabolitos secundarios que se mantienen después de ser tratadas. Esta información, con la presentada en este trabajo, ayudaría a tener un panorama más claro de los metabolitos principales que intervienen en la actividad anti leishmaniasis.

XI. Bibliografía

- Akerele, O. (1993). Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum*, 14(4):390–395. TJ: WORLD HEALTH FORUM.
- Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R., y Kroeger, A. (2001). Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(5):466–470.
- Arana, B. A., Rizzo, N. R., Navin, T. R., Klein, R. E., y Kroeger, A. (2000). Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: people's knowledge, concepts and practices. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 94(8):779–786.
- Ashford, R. W., Desjeux, P., y deRaadt, P. (1992). Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitology Today*, 8(3):104–105.
- Bekhit, A. A., El-Agroudy, E., Helmy, A., Ibrahim, T. M., Shavandi, A., y Bekhit, A. E.-D. A. (2018). Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 160:229–244.
- Bello, M. O., Zaki, A. A., Aloko, S., Fasinu, P. S., Bello, E. O., Ajao, U. L., y Oguntoye, O. S. (2018). The genus *Vitex*: An overview of iridoids as chemotaxonomic marker. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4):414–419.
- Bredenkamp, C. L. y Botha, D. J. (1996). FSA contributions 7: Verbenaceae: *Vitex*. *Bothalia*, 26(2):141–151.
- Burza, S., Croft, S. L., y Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151):951–970.
- CDC (2017). Public Health Image Library (PHIL). Recuperado de <https://phil.cdc.gov/default.aspx>.
- Chen, M., Christensen, S. B., Blom, J., Lemmich, E., Nadelmann, L., Fich, K., Theander, T., y Kharazmi, A. (1993). Licochalcone A, a Novel Antiparasitic Agent with Potent Activity against Human Pathogenic Protozoan Species of *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(12):2550–2556.

- Copeland, H. W., Arana, B. A., y Navin, T. R. (1990). Comparison of active and passive case detection of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 43(3):257–259.
- Cruz, A., de Toledo, J., Falade, M., Terrao, M., Kamchonwongpaisan, S., Kyle, D., y Uthaipibull, C. (2009). Current Treatment and Drug Discovery Against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: A Review. *Current Drug Targets*, 10(3):178–192.
- Desjeux, P. (2004). Focus: Leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9):692–692.
- Desjeux, P. y Alvar, J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(sup1):3–15.
- Devika, R. (2017). A Review on Genus *Vitex*-A Novel Medicinal Plant. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 5(6):1904–1908.
- Droždž, B. y Bloszyk, E. (1978). Selective detection of sesquiterpene lactones by TLC. *Planta Medica*, 33(04):379–384.
- Dutta, A., Ghoshal, A., Mandal, D., Mondal, N. B., Banerjee, S., Sahu, N. P., y Mandal, C. (2007). Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(9):1196–1204.
- Fournet, A., Barrios, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., y Cavé, A. (1992). Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Tropical Medicine and Parasitology*, 43(4):219–222.
- Fournet, A., Barrios, A. A., Munoz, V., Hocquemiller, R., Cave, A., y Bruneton, J. (1993). 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(4):859–863.
- Garcá, M., Monzote, L., Montalvo, A. M., y Scull, R. (2010). Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. *Pharmaceutical Biology*, 48(9):1053–1058.
- Gasser, R. A., Magill, A. J., Oster, C. N., Franke, E. D., Grogl, M., y Berman, J. D. (1994). Pancreatitis Induced by Pentavalent Antimonial Agents During Treatment of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 18(1):83–90.
- Germonprez, N., Maes, L., Puyvelde, L. V., Tri, M. V., Tuan, D. A., y Kimpe, N. D. (2005). In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(1):32–37.

- Grevelink, S. A. y Lerner, E. A. (1996). Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(2):257–272.
- Hepburn, N. C., Siddique, I., Howie, A. F., Beckett, G. J., y Hayes, P. C. (1993). Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. *The Lancet*, 342(8865):238–239.
- Hernández, M. M., Heraso, C., Villarreal, M. L., Vargas-Arispuro, I., y Aranda, E. (1999). Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 67(1):37–44.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, 354(9185):1191–1199.
- Hillis, W. E. (1956). Leucoanthocyanins as the Possible Precursors of Extractives in Woody Tissues. *Australian Journal of Biological Sciences*, 9(2):263–280.
- Jiang, G., Lin, S., Wen, L., Jiang, Y., Zhao, M., Chen, F., Prasad, K. N., Duan, X., y Yang, B. (2013). Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation. *Food Chemistry*, 136(2):563–568.
- Joint Committee of the Pharmaceutical Society and the Society for Analytical Chemistry on Methods for the Evaluation of Drugs (1965). The chemical assay of senna fruit and senna leaf. *The Analyst*, 90(1075):582–588.
- Kar, A. (2007). *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. New Age International (P) Ltd, New Delhi.
- Maes, L., Germonprez, N., Quirijnen, L., Puyvelde, L. V., Cos, P., y Berghe, D. V. (2004). Comparative Activities of the Triterpene Saponin Maesabalide III and Liposomal Amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania donovani* in Hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6):2056–2060.
- Marini-Bettòlo, G. B., Nicoletti, M., Patamia, M., Galeffi, C., y Messana, I. (1981). Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *Journal of Chromatography A*, 213(1):113–127.
- Martin, E. A. (2015). *Concise medical dictionary*. Oxford University Press, Oxford England.
- Martín-Quintal, Z., del Rosario García-Miss, M., Mut-Martín, M., Matus-Moo, A., Torres-Tapia, L. W., y Peraza-Sánchez, S. R. (2009). The leishmanicidal effect of (3S)-16,17-didehydrofalcarninol, an oxylipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of NO production. *Phytotherapy Research*, 24:1004–1008.

- Meena, A., S. Niranjana, U., Meda, M., M. Padhi, M., y Babu, R. (2011). A review of the important chemical constituents and medicinal uses of *Vitex* genus. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 6(2):54–60.
- Meena, A., Singh, U., Yadav, A., Singh, B., y Rao, M. (2010). Pharmacological and phytochemical evidences for the extracts from plants of the genus *Vitex* - a review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2(1):1–9.
- Mir, M. A., Parihar, K., Tabasum, U., y Kumari, E. (2016). Estimation of alkaloid, saponin and flavonoid, content in various extracts of *Crocus sativa*. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(5):171–174.
- Mittra, B., Saha, A., Chowdhury, A. R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., y Majumder, H. K. (2000). Luteolin, an Abundant Dietary Component is a Potent Anti-leishmanial Agent that Acts by Inducing Topoisomerase II-mediated Kinetoplast DNA Cleavage Leading to Apoptosis. *Molecular Medicine*, 6(6):527–541.
- Molyneux, D. y Killick-Kendrick, R. (1987). Morphology, ultrastructure, and life cycles. En Peters, W. y Killick-Kendrick, R., editores, *The Leishmaniasis in biology and medicine*, pp. 121–176. Academic Press, London Orlando.
- Momeni, A. Z. (1996). Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Itraconazole. *Archives of Dermatology*, 132(7):784.
- Moore, E. M. y Lockwood, D. N. (2011). Leishmaniasis. *Clinical Medicine*, 11(5):492–497.
- Morales, J. F. (2009). La familia Apocynaceae (Apocynoideae, Rauvolfioideae) en Guatemala. *Darwiniana*, 47(1):140–184.
- Morizot, G., Pratlong, F., Buffet, P. A., Caumes, E., Sarfati, C., Laffitte, E., Delgiudice, P., Dupuy, A., Salah, A. B., Darie, H., y *et al.* (2007). Healing of old world cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(1):48–52.
- Mroczek, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry (Chromatographic Science Series)*, capítulo TLC of Tropane Alkaloids, pp. 685–699. CRC Press.
- Nyiligira, E., Viljoen, A. M., Baser, K. H. C., Ozek, T., van Vuuren, S. F., y Houghton, P. J. (2004). Essential oil composition and in vitro antimicrobial and anti-inflammatory activity of South African *Vitex* species. *South African Journal of Botany*, 70(4):611–617.

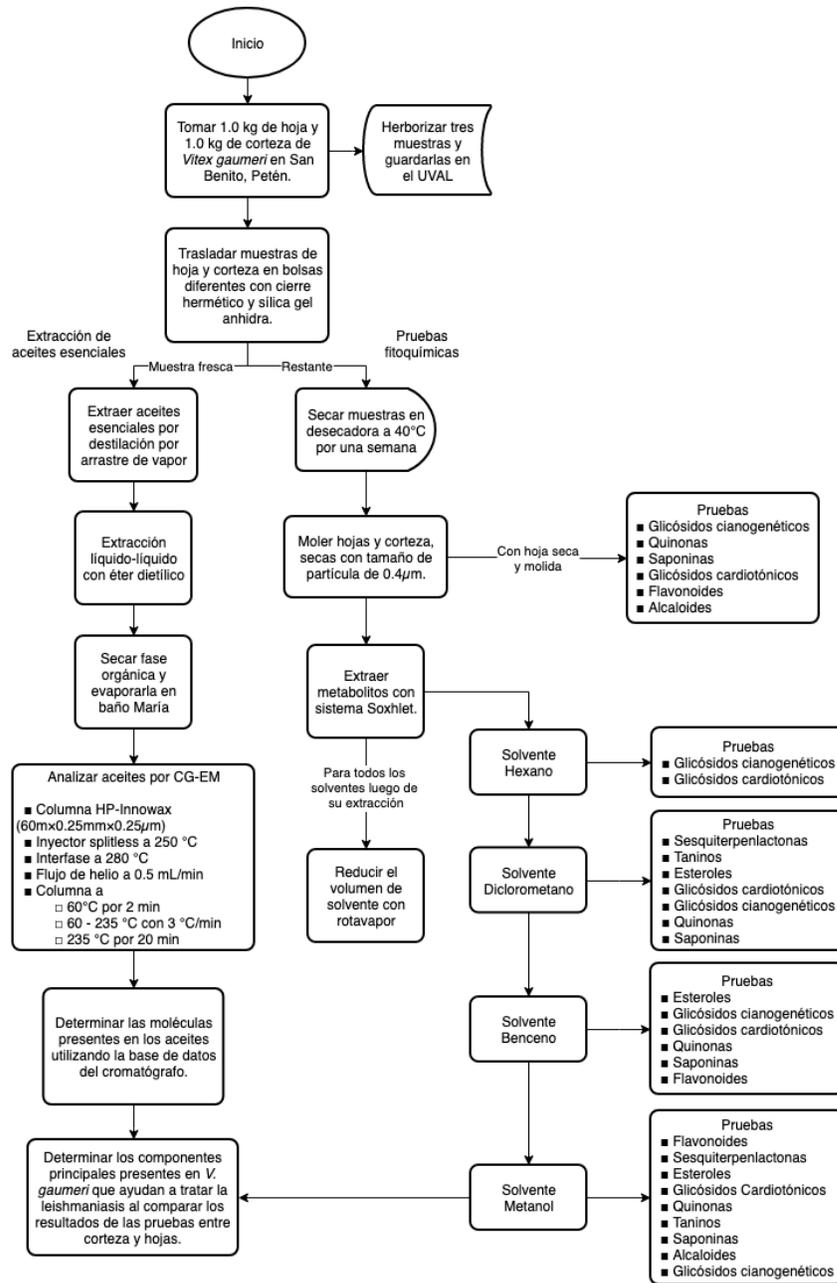
- Oleszek, W., Kapusta, I., y Stochmal, A. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry (Chromatographic Science Series)*, capítulo TLC of Triterpenes (Including Saponins), pp. 519–541. CRC Press.
- OPS (2018). Misión resalta avances de Proyecto de Leishmaniasis en Guatemala. Recuperado de https://www.paho.org/gut/index.php?option=com_content&view=article&id=1074:mision-resalta-avances-de-proyecto-de-leishmaniasis-en-guatemala&Itemid=441.
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69:S10–S18.
- Peraza-Sánchez, S. R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., Garcá-Miss, M. R., y Mut-Martn, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78(4):315–318.
- Pimenta, P. F. P. y de Souza, W. (1987). *Leishmania mexicana*: Distribution of intramembranous particles and filipin sterol complexes in amastigotes and promastigotes. *Experimental Parasitology*, 63(2):117–135.
- Rani, A. y Sharma, A. (2013). The genus *Vitex*: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14):188–198.
- Rico-Gray, V., Chemás, A., y Mandujano, S. (1991). Uses of tropical deciduous forest species by the Yucatecan Maya. *Agroforestry Systems*, 14(2):149–161.
- Rizzo, N., de MacVean, A., López, B., Poll, E., y Arana, B. (1999). Uso de Plantas Medicinales en el Tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea en Guatemala. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
- Rufai, Y., Isah, Y., e Isyaka, M. S. (2016). Comparative Phyto-Constituents Analysis from the Root Bark and Root Core Extractives of *Cassia ferruginea* (Schrad D. C) Plant. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 3(4):275–283.
- Shibata, S., Takito, M., y Tanaka, O. (1950). Paper Chromatography of Anthraquinone Pigments. *Journal of the American Chemical Society*, 72(6):2789–2790.
- Silva, G. L., Lee, I.-S., y Kinghorn, A. D. (1998). *Natural Product Isolation (Methods in Biotechnology)*, capítulo Special Problems with the Extraction of Plants, pp. 343–363. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Stebut, E. V. (2015). Leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 13(3):191–201.

- Steyermark, J. A. (1950). Flora of Guatemala. *Ecology*, 31(3):368–372.
- Svendsen, A. B. y Verpoorte, R. (1983). Chapter 2: Detection of Alkaloids in TLC. En *Chromatography of alkaloids - Part A: thin-layer chromatography*, pp. 11–18. Elsevier.
- Thomson, R. H. (1971). *Naturally occurring quinones*. Academic Press.
- Torres-Santos, E. C., Moreira, D. L., Kaplan, M. A. C., Meirelles, M. N., y Rossi-Bergmann, B. (1999). Selective Effect of 2',6'-Dihydroxy-4'-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5):1234–1241.
- Vásquez, E. C. (2016a). Leishmaniasis Guatemala, 2016. Recuperado de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202017/Malaria/Leishmaniasis%202016.pdf>.
- Vásquez, E. C. (2016b). Situación epidemiológica de Malaria, Chagas, Leishmaniasis, y Oncocercosis, Guatemala 2015. Recuperado de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202016/Salas%20Situacionales/Situaci%C3%B3n%20epidemiol%C3%B3gica%20de%20Malaria,%20Chagas,%20Leishmaniasis,%20y%20Oncocercosis.pdf>.
- Venkataraman, K. (1959). *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Progrès Dans La Chimie Des Substances Organiques Naturelles XVIII*, capítulo Flavones and isoflavones, pp. 1–69. Springer-Verlag.
- von Stebut, E. (2011). Research in practice: Different dendritic cell types in skin with various functions - important implications for intradermal vaccines. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(7):506–509.
- Weigel, M. M., Armijos, R. X., Racines, R. J., Zurita, C., Izurieta, R., Herrera, E., y Hinojsa, E. (1994). Cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador: popular perceptions, knowledge, and treatment. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 28:142–155. TJ: BULLETIN OF THE PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION.
- Whitby, G. S. (1923). Some new reactions for the detection of sterols. *Biochemical Journal*, 17(1):5–12.
- WHO (2010). *Control of the leishmaniasis*. World Health Organization, Geneva.
- Wójciak-Kosior, M. y Oniszczyk, A. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry (Chromatographic Science Series)*, capítulo Sample Preparation and TLC Analysis of Phenolic Acids, pp. 331–364. CRC Press.

XII. Anexo

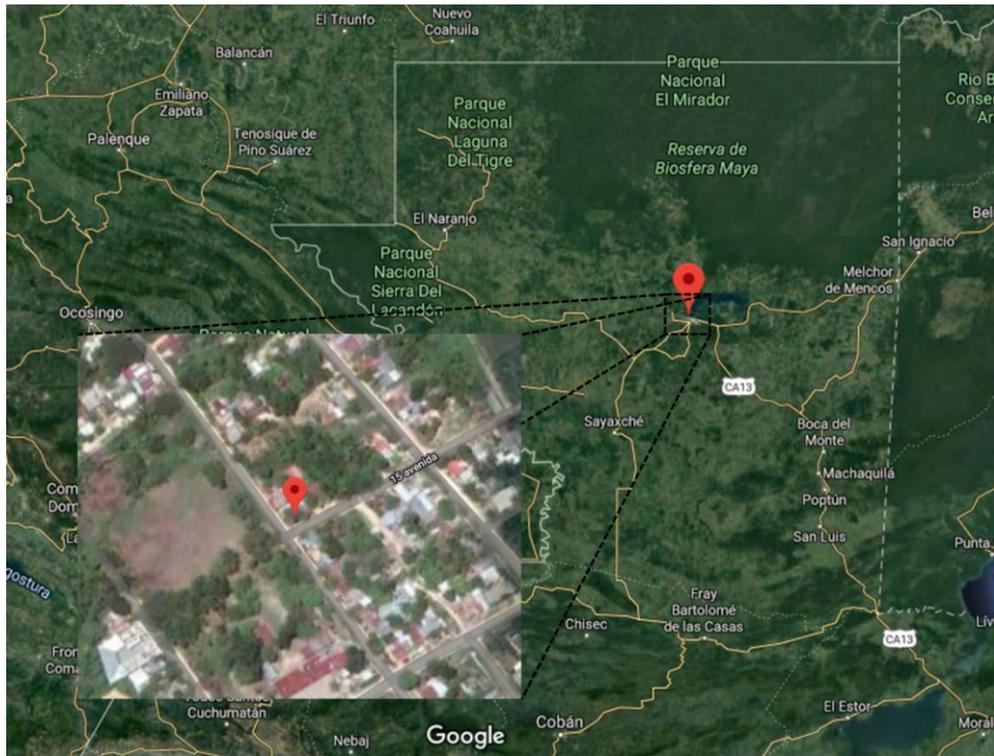
A. Figuras adicionales

Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología



(Elaboración propia)

Figura 8. Mapa del lugar en donde se recolectó la planta. Barrio El Pedregal, San Benito, Petén, Guatemala, con coordenadas 16.926479, -89.915665.



(Imágenes tomadas de Google Maps, 2019)

Figura 9. Fotografías de *V. gaumeri* recolectadas en San Benito, Petén, Guatemala. La descripción de esta planta se presenta en el Certificado en la página 98.



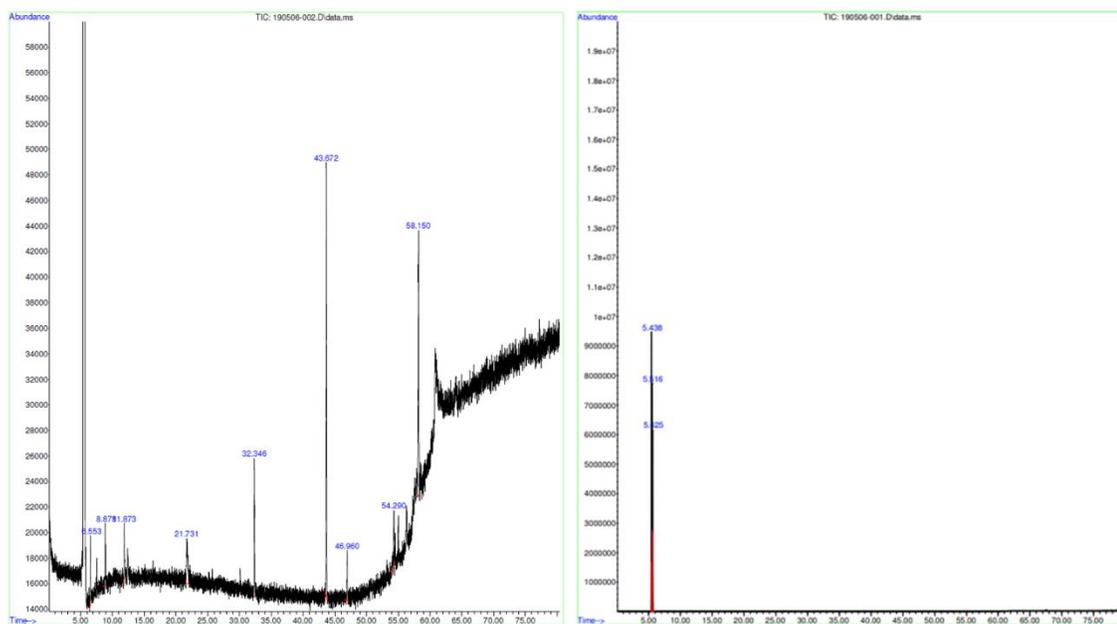
(Fotografías por Lic. María Renée Álvarez, 2019)

Figura 10. Sistema de extracción Soxhlet (izquierda) y de destilación por arrastre de vapor (derecha) utilizados durante la investigación.



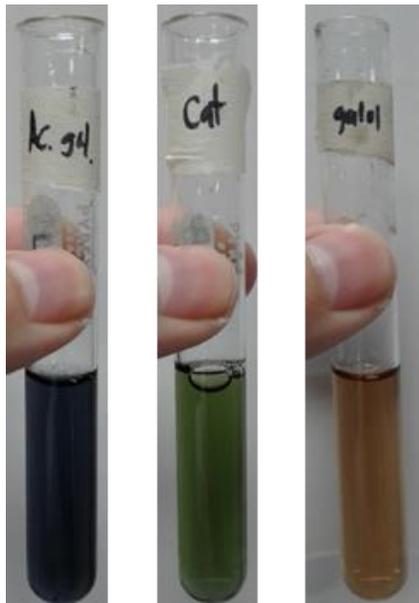
(Elaboración propia)

Figura 11. Cromatogramas de la hoja y corteza de *V. gaumeri*. Las condiciones de la cromatografía se describen en la metodología (página 22).



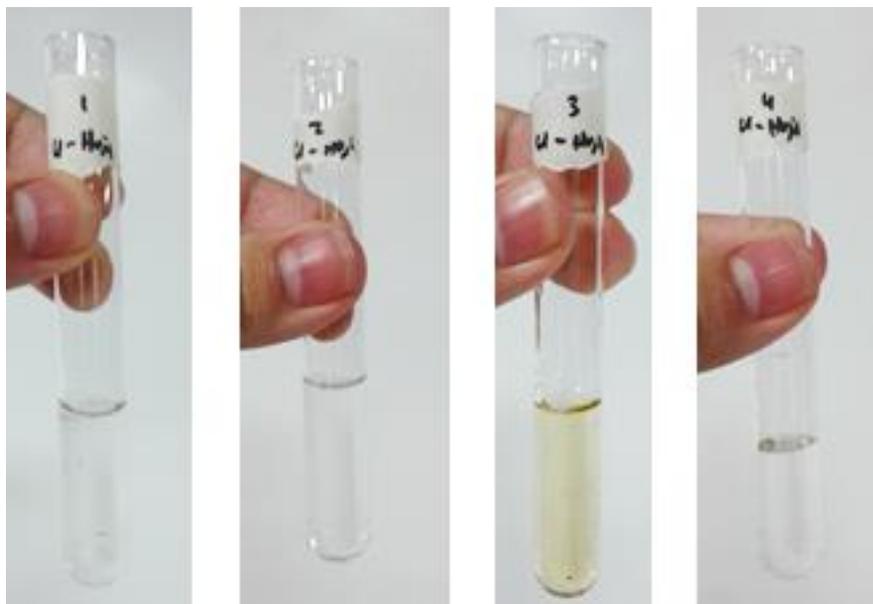
(Elaboración propia)

Figura 12. Control positivo para la prueba de cloruro férrico en taninos. De izquierda a derecha: positivo para ácido gálico, positivo para pirocatecol y positivo para pirogálico.



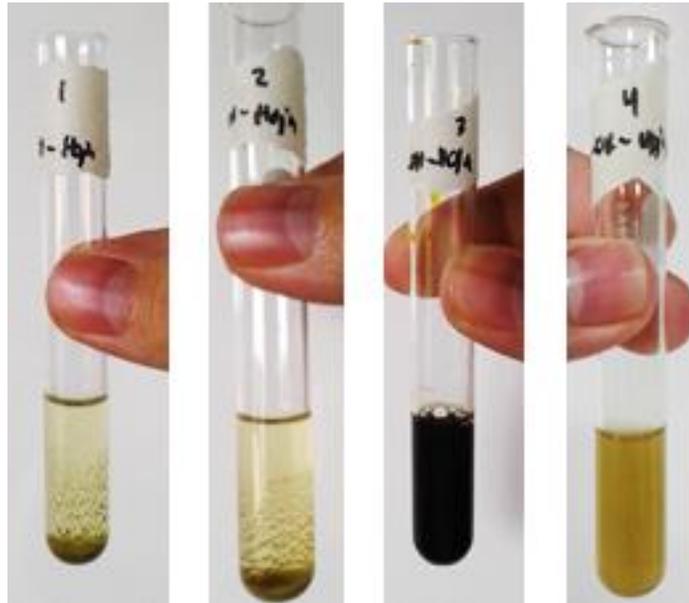
(Elaboración propia)

Figura 13. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de diclorometano en hoja. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de cloruro férrico (FeCl_3), 4) blanco



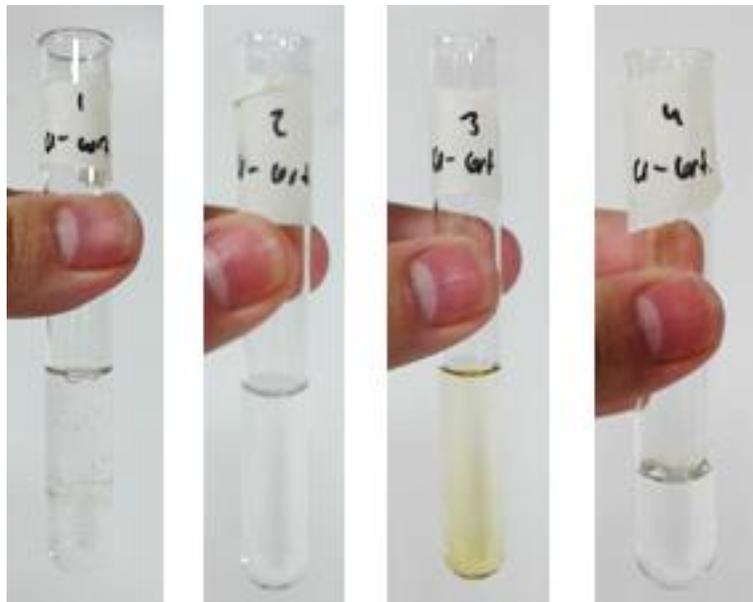
(Elaboración propia)

Figura 14. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de metanol en hoja. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de FeCl_3 , 4) blanco.



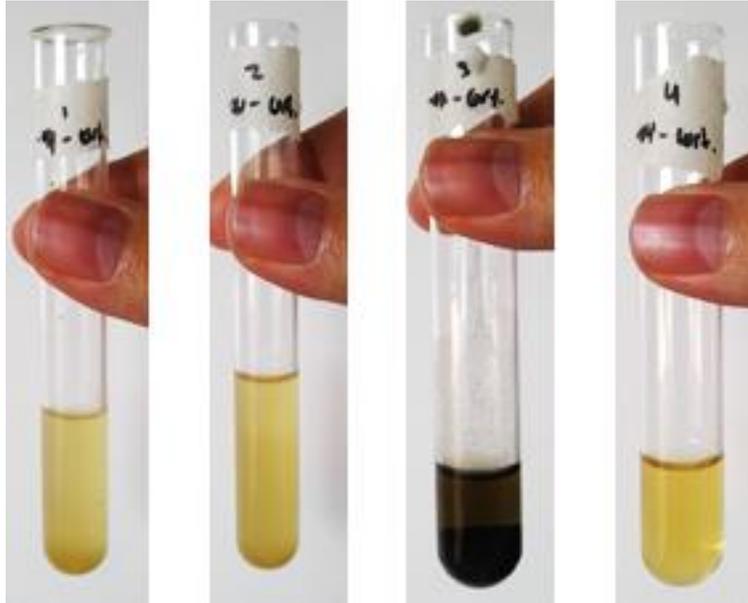
(Elaboración propia)

Figura 15. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de diclorometano en corteza. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de FeCl_3 , 4) blanco.



(Elaboración propia)

Figura 16. Fotos de las pruebas para taninos en extracto de metanol en corteza. 1) Test de gelatina, 2) test de gelatina con sal, 3) test de cloruro férrico FeCl_3 , 4) blanco.



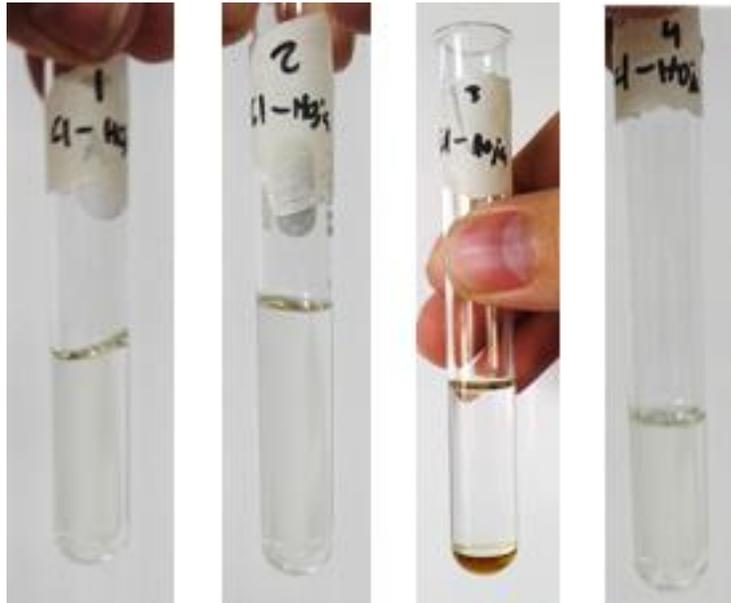
(Elaboración propia)

Figura 17. Comparación entre el color del test de FeCl_3 en extracto metanólico de hoja (izquierda) y corteza (derecha).



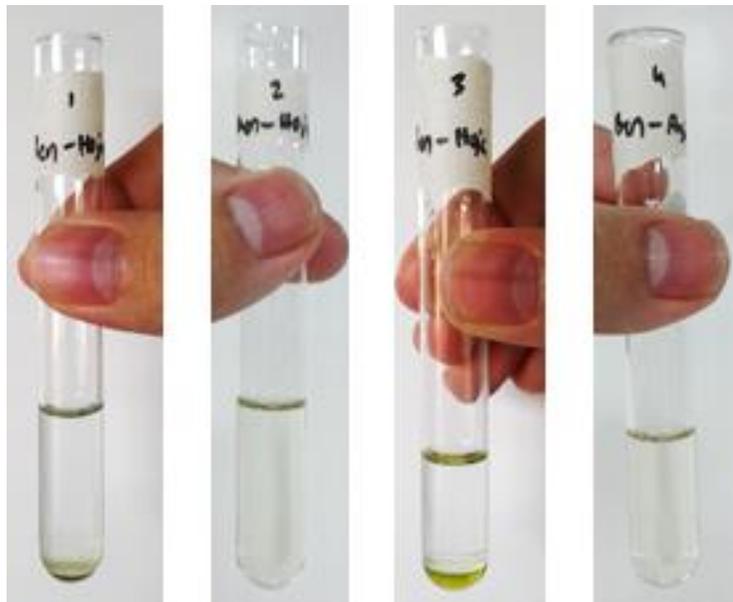
(Elaboración propia)

Figura 18. Prueba de esteroides para extracto de diclorometano en hoja. 1) Test de Liebermann–Burchard (L–B), 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.



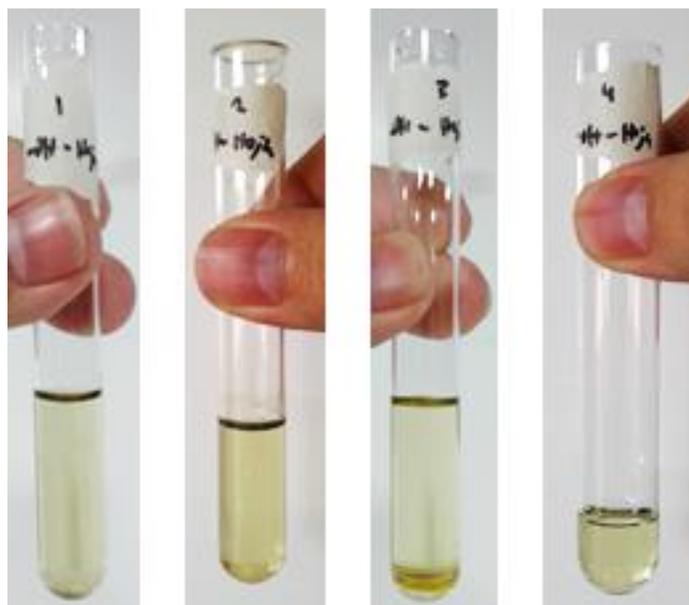
(Elaboración propia)

Figura 19. Prueba de esteroides para extracto de benceno en hoja. 1) Test de L–B, 2) Test de L–B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.



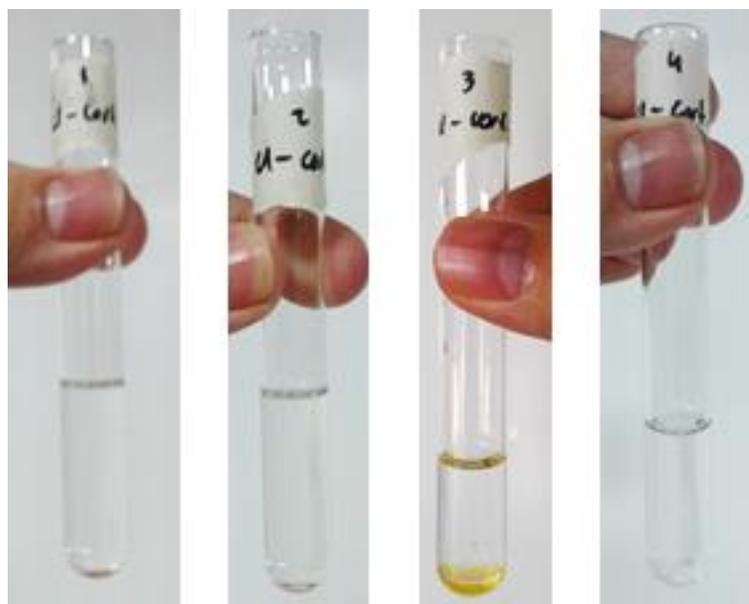
(Elaboración propia)

Figura 20. Prueba de esteroides para extracto de metanol en hoja. 1) Test de L-B, 2) Test de L-B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.



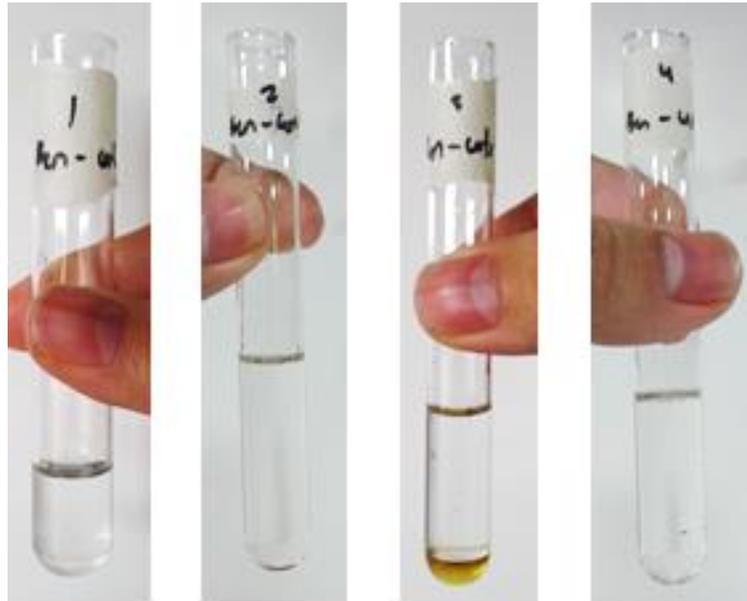
(Elaboración propia)

Figura 21. Prueba de esteroides para extracto de diclorometano en corteza. 1) Test de L-B, 2) Test de L-B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.



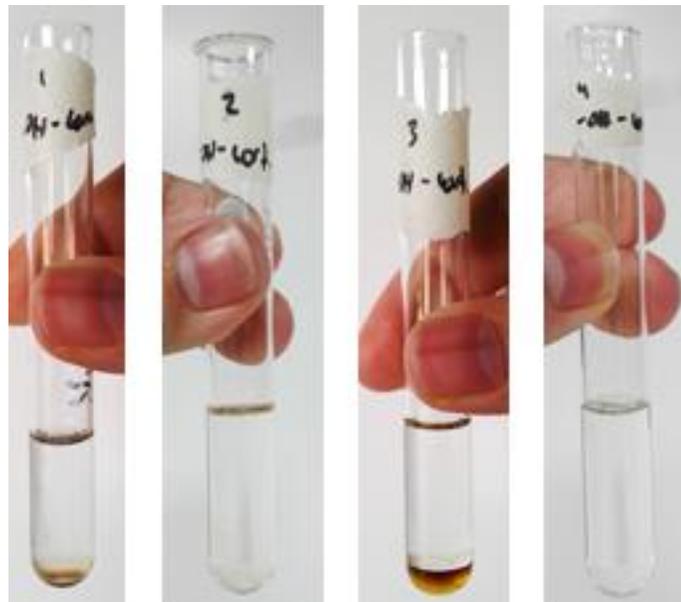
(Elaboración propia)

Figura 22. Prueba de esteroides para extracto de benceno en corteza. 1) Test de L-B, 2) Test de L-B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.



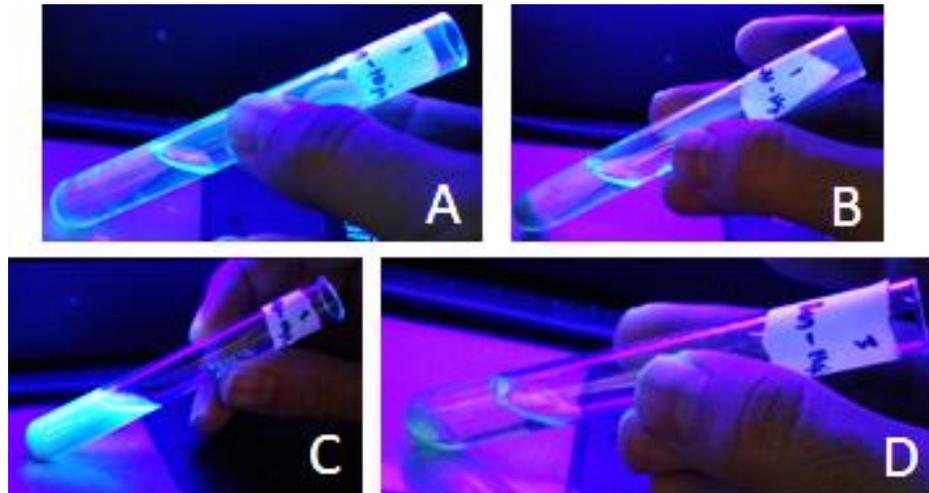
(Elaboración propia)

Figura 23. Prueba de esteroides para extracto de metanol en corteza. 1) Test de L-B, 2) Test de L-B para saponinas esteroidales, 3) test de Salkowski, 4) blanco.



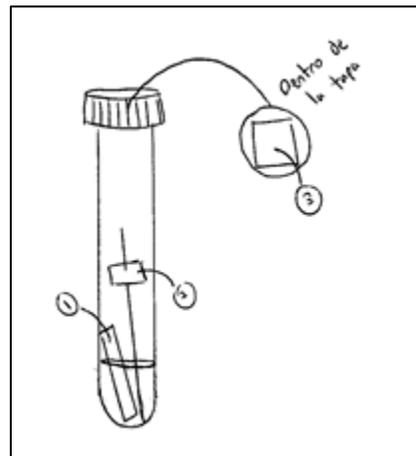
(Elaboración propia)

Figura 24. Pruebas de esteroides bajo luz ultravioleta. A) Muestra de benceno en hoja del test de L-B, B) muestra de metanol en hoja del test de L-B, C) muestra de metanol en hoja del test de L-B para saponinas esteroidales, D) muestra de benceno en hoja del test de Salkowski



(Elaboración propia)

Figura 25. Esquema de los tubos de ensayo para el test de Guignard. Imagen de elaboración propia.



(Elaboración propia)

Figura 26. Test de Guignard para la presencia de glicósidos cianogénicos en hoja. De izquierda a derecha: extracto de benceno, hexano, diclorometano, metanol y planta seca.



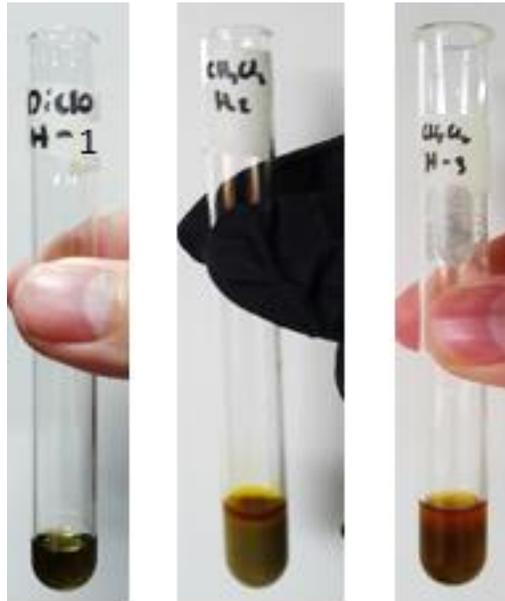
(Elaboración propia)

Figura 27. Test de Guignard para la presencia de glicósidos cianogénicos en corteza. De izquierda a derecha: extracto de benceno, hexano, diclorometano, metanol y planta seca.



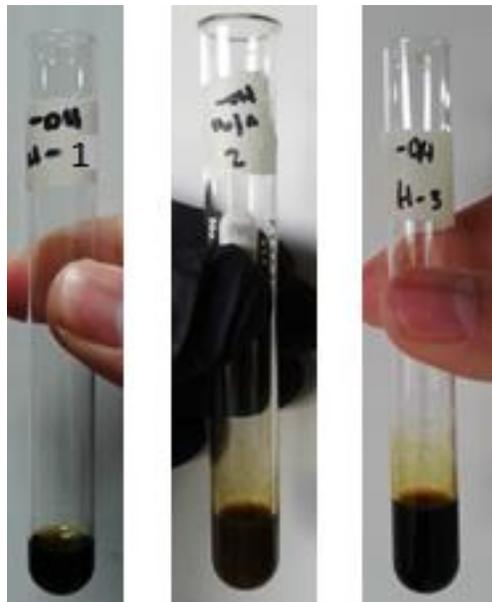
(Elaboración propia)

Figura 28. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de diclorometano en hoja. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal.



(Elaboración propia)

Figura 29. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de metanol en hoja. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal.



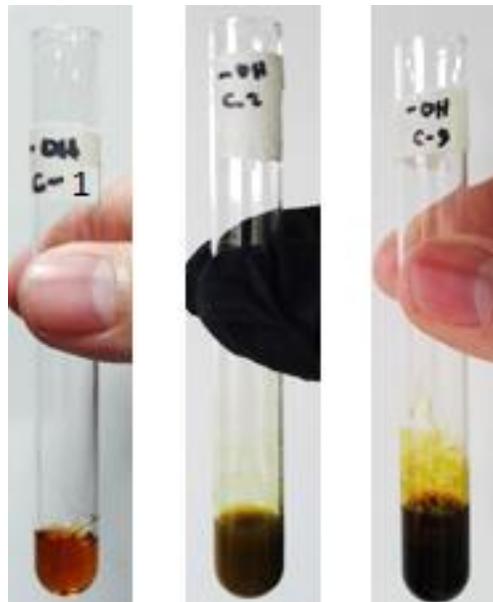
(Elaboración propia)

Figura 30. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de diclorometano en corteza. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal.



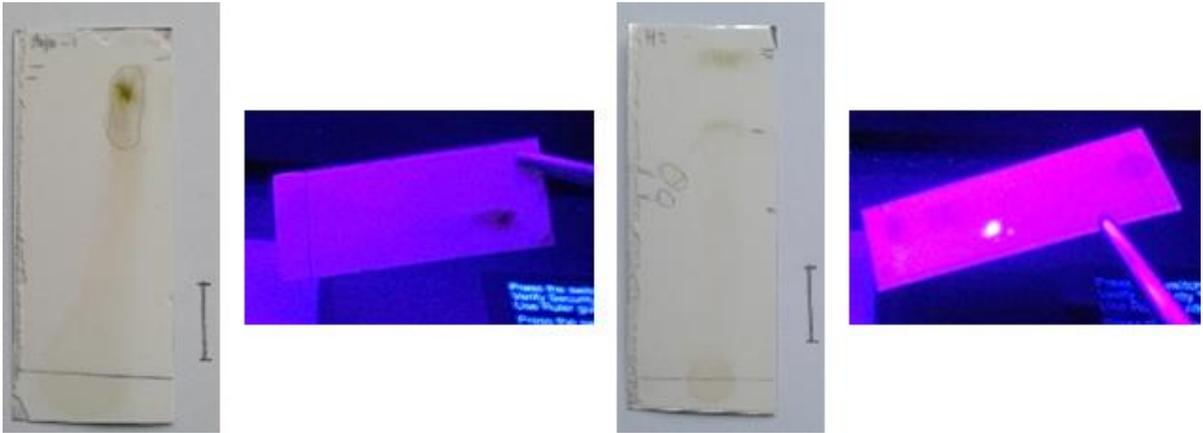
(Elaboración propia)

Figura 31. Pruebas para sesquiterpenlactonas en extracto de metanol en corteza. 1) Blanco, 2) Test de Baljet, 3) Test de Legal.



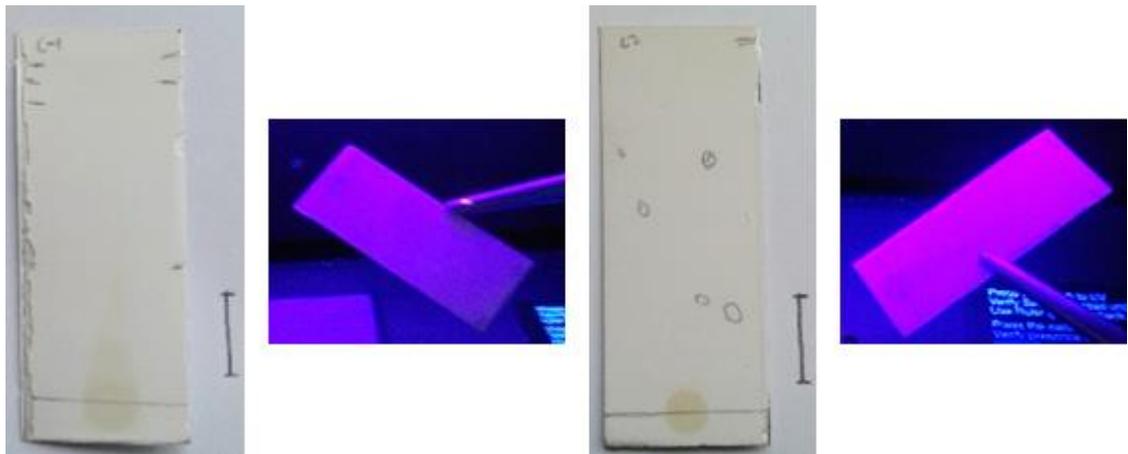
(Elaboración propia)

Figura 32. Cromatografía en capa fina (TLC) de la muestra de hoja. De izquierda a derecha: 1) fase móvil de benceno–metanol (9:1) y su observación bajo luz UV, 2) fase móvil de cloroformo–metanol (99:1) y su observación bajo luz UV.



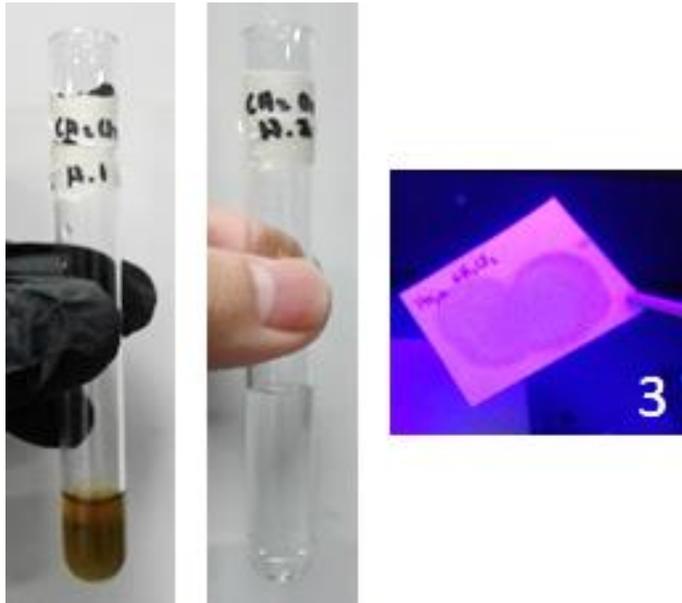
(Elaboración propia)

Figura 33. Cromatografía en capa fina (TLC) de la muestra de corteza. De izquierda a derecha: 1) fase móvil de benceno–metanol (9:1) y su observación bajo luz UV, 2) fase móvil de cloroformo–metanol (99:1) y su observación bajo luz UV.



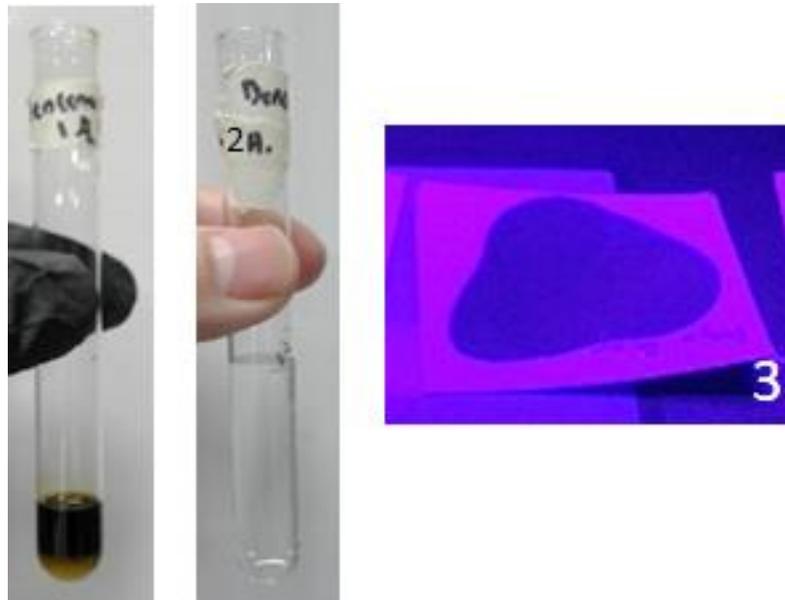
(Elaboración propia)

Figura 34. Prueba para quinonas en extracto de diclorometano en hoja. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Borntträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV.



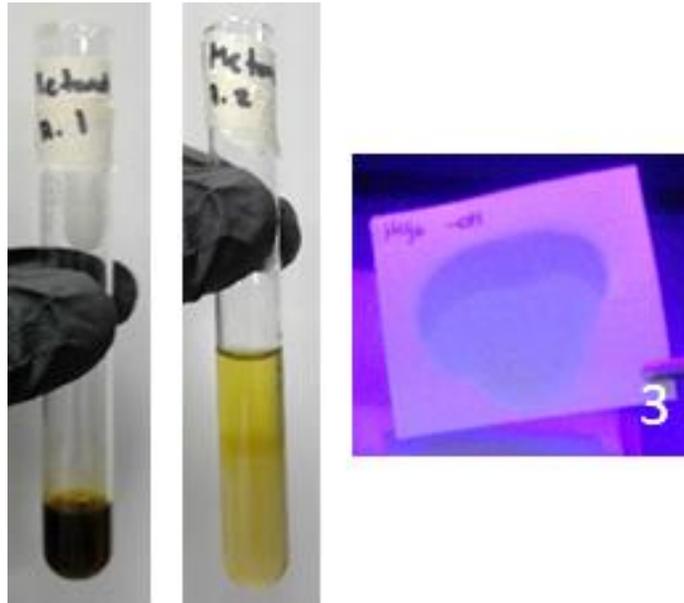
(Elaboración propia)

Figura 35. Prueba para quinonas en extracto de benceno en hoja. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Borntträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV.



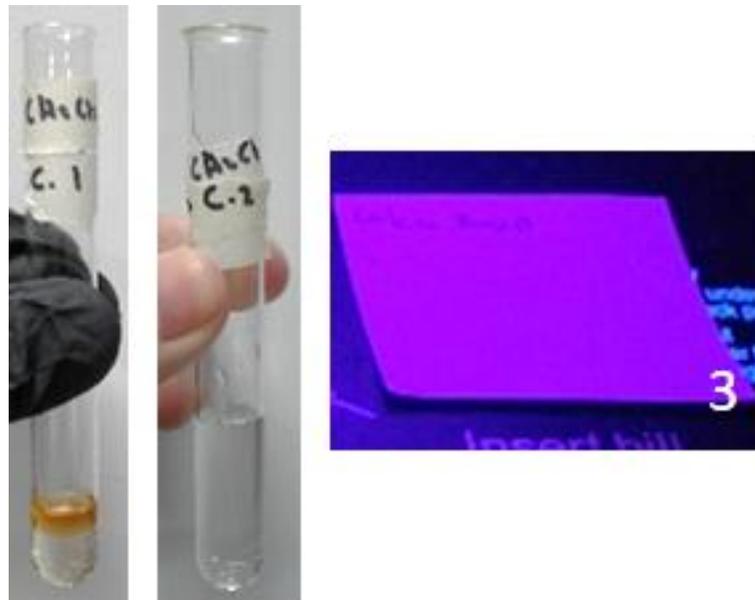
(Elaboración propia)

Figura 36. Prueba para quinonas en extracto de metanol en hoja. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV.



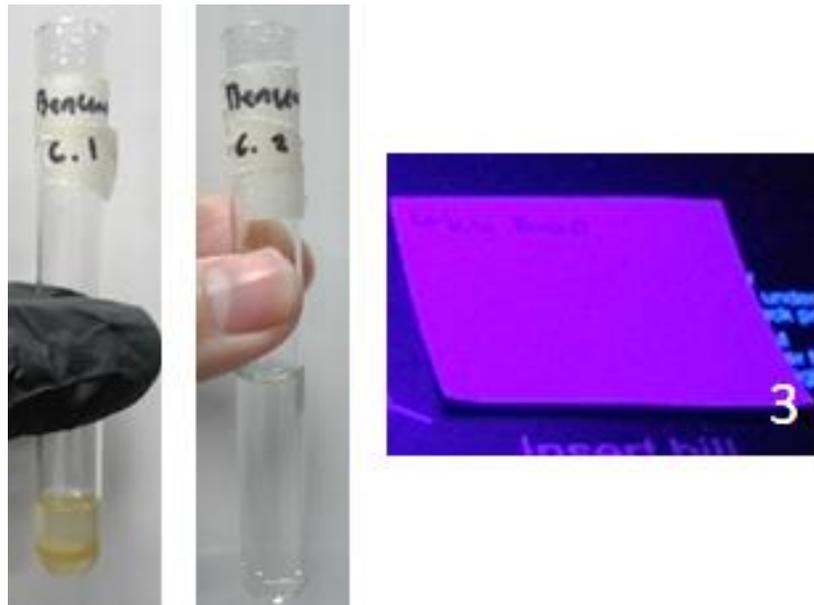
(Elaboración propia)

Figura 37. Prueba para quinonas en extracto de diclorometano en corteza. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV.



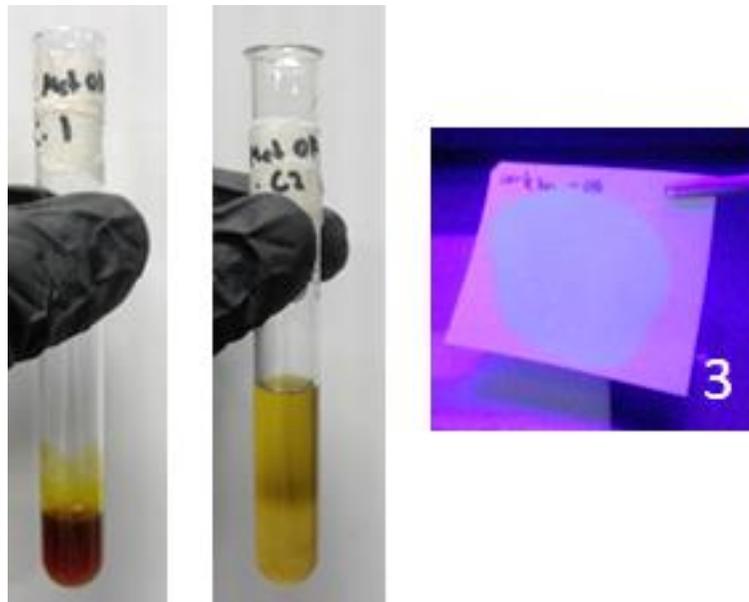
(Elaboración propia)

Figura 38. Prueba para quinonas en extracto de benceno en corteza. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV.



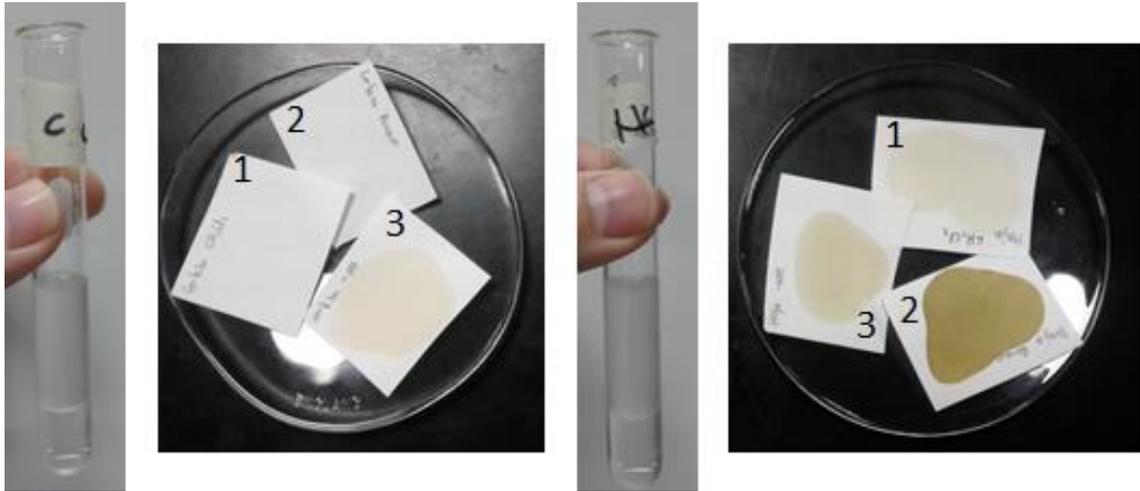
(Elaboración propia)

Figura 39. Prueba para quinonas en extracto de metanol en corteza. 1) Prueba de solubilidad en NaOH, 2) test de Bornträger, 3) aspersión de acetato de magnesio bajo luz UV.



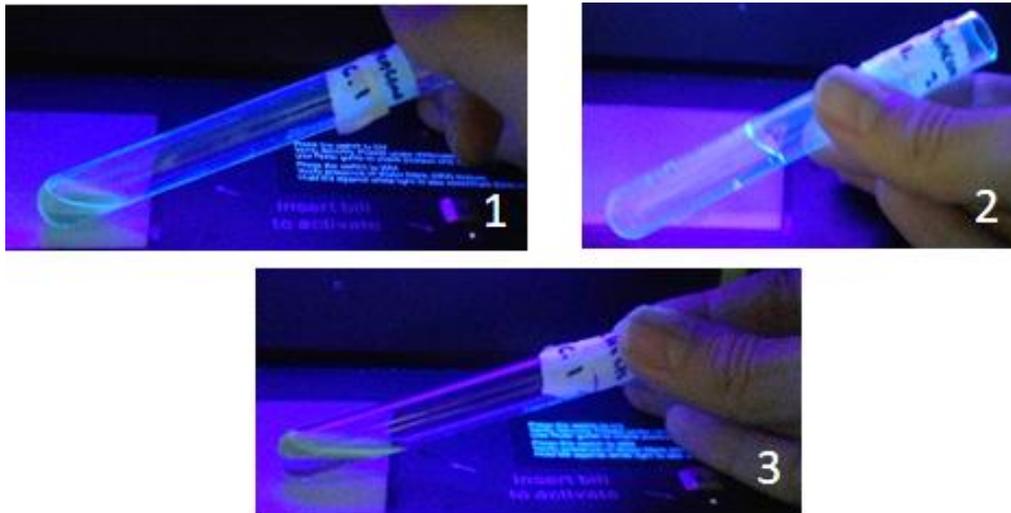
(Elaboración propia)

Figura 40. Pruebas para quinonas. De izquierda a derecha: prueba de Bornträger modificada y aspersión de acetato de magnesio para corteza y hoja respectivamente. 1) Extracto de diclorometano, 2) de benceno, 3) de metanol.



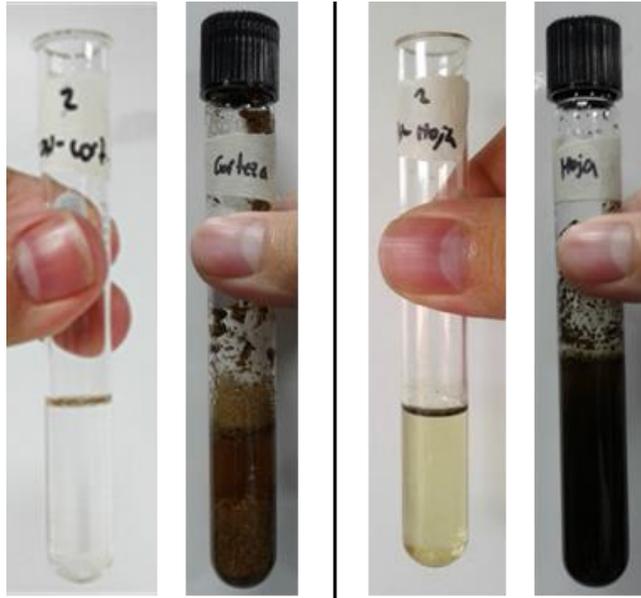
(Elaboración propia)

Figura 41. Pruebas para quinonas bajo luz UV. Ejemplo de las distintas coloraciones que tuvieron los resultados. 1) solución verdosa traslúcida, 2) solución brillante, 3) solución verdosa opaca.



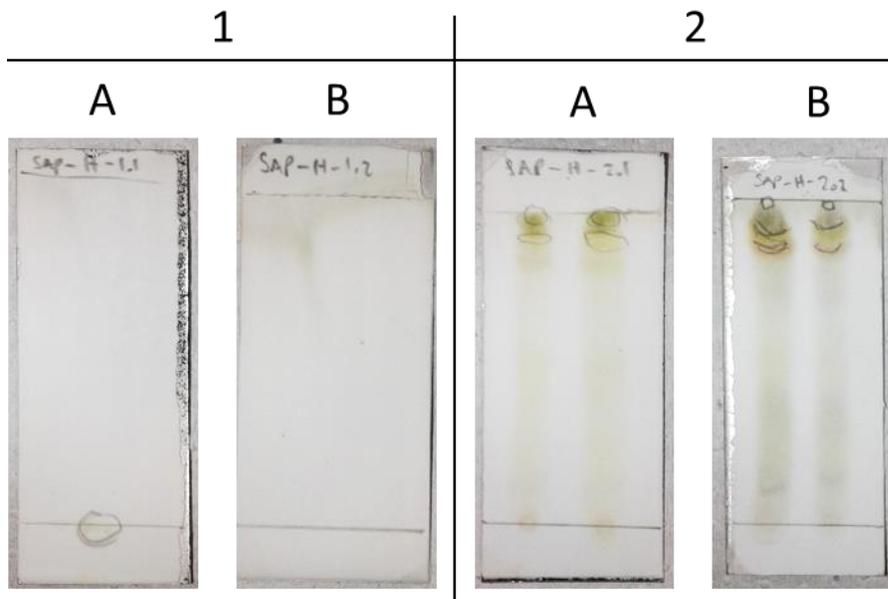
(Elaboración propia)

Figura 42. Prueba de L-B para saponinas esteroidales y test de espuma en corteza y hoja.



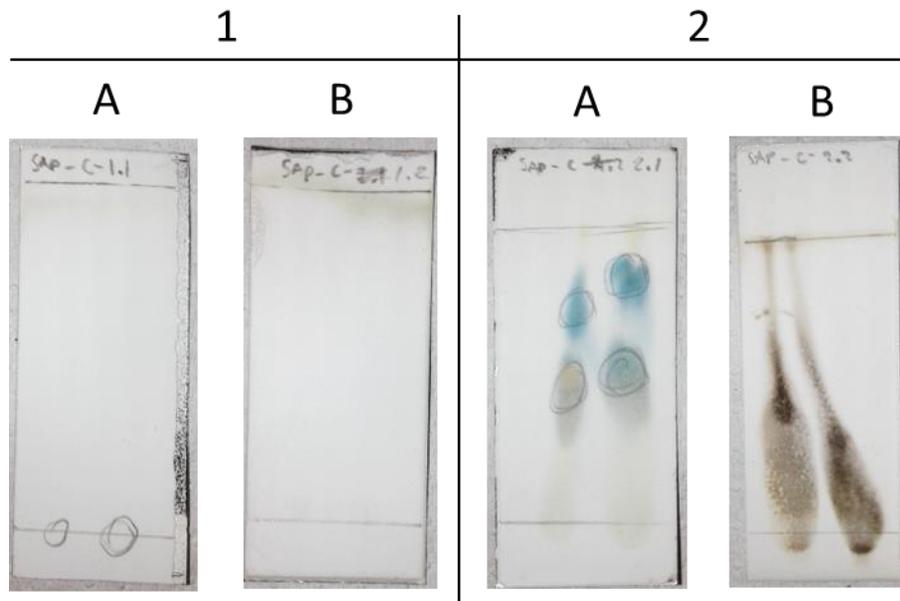
(Elaboración propia)

Figura 43. TLC de planta seca para detección de saponinas en hoja. Se utilizó una fase móvil de 1) acetona-hexano (4:1) y 2) cloroformo-metanol-agua (13:7:1). Se reveló asperjando A) cloruro de antimonio (III) (SbCl_3) al 20% en cloroformo y B) reactivo de L-B.



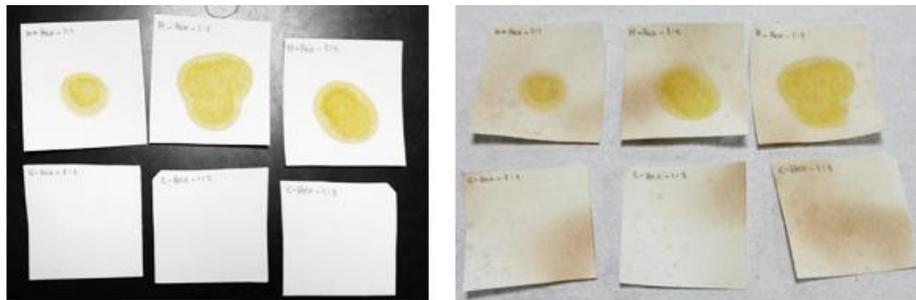
(Elaboración propia)

Figura 44. TLC de planta seca para detección de saponinas en corteza. Se utilizó una fase móvil de 1) acetona–hexano (4:1) y 2) cloroformo–metanol–agua (13:7:1). Se reveló asperjando A) $SbCl_3$ al 20% en cloroformo y B) reactivo de L–B.



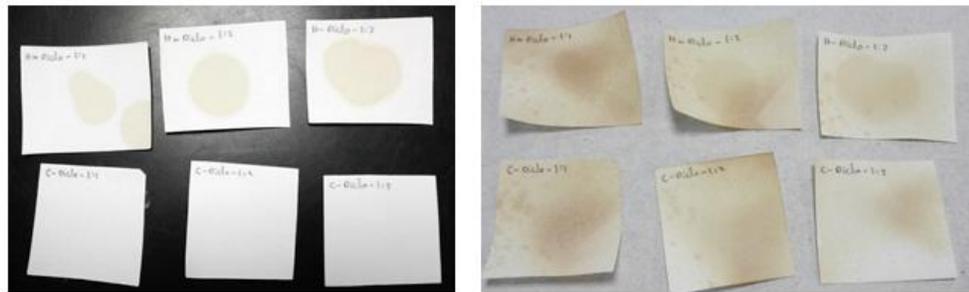
(Elaboración propia)

Figura 45. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto de hexano. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después.



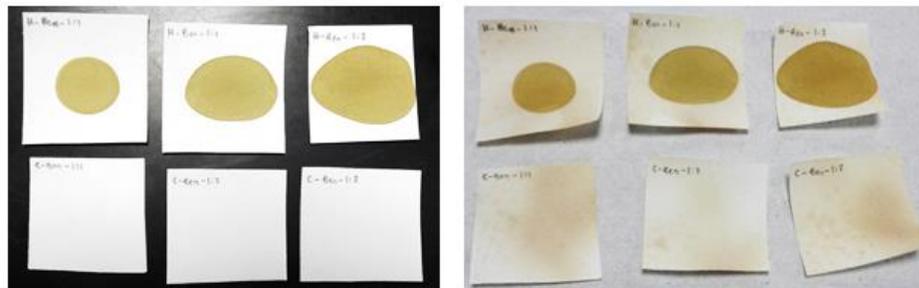
(Elaboración propia)

Figura 46. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto de diclorometano. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después.



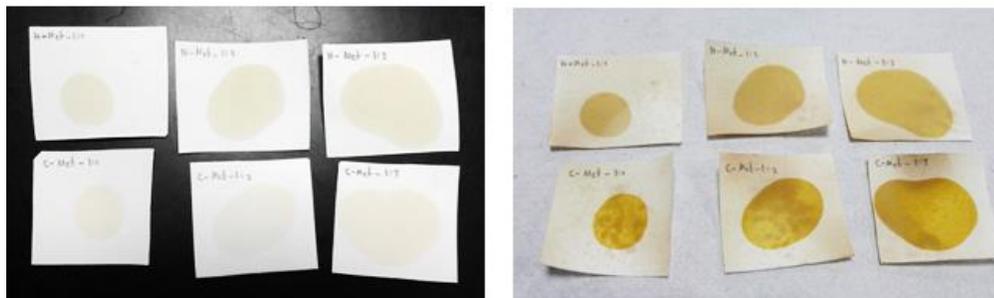
(Elaboración propia)

Figura 47. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto de benceno. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después.



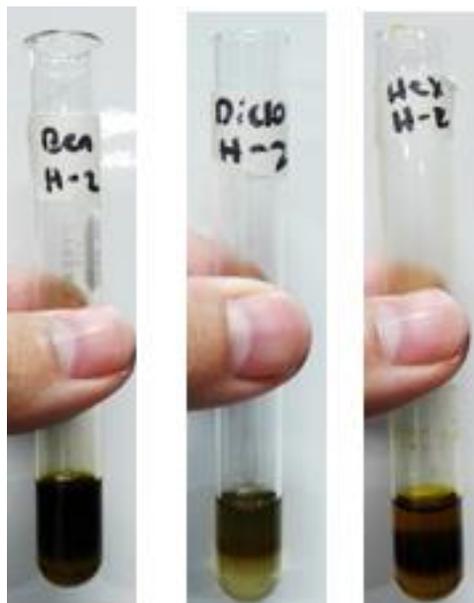
(Elaboración propia)

Figura 48. Test de Kedde para glicósidos cardiotónicos en extracto metanólico. Primera fila corresponde al extracto en hoja y la segunda fila al extracto en corteza. Las fotografías con fondo negro son antes de ser asperjadas con el reactivo de Kedde y las de fondo blanco son después.



(Elaboración propia)

Figura 49. Test de Raymond para glicósidos cardiotónicos en extracto de hoja. De izquierda a derecha: extracto en benceno, en diclorometano y en hexano.



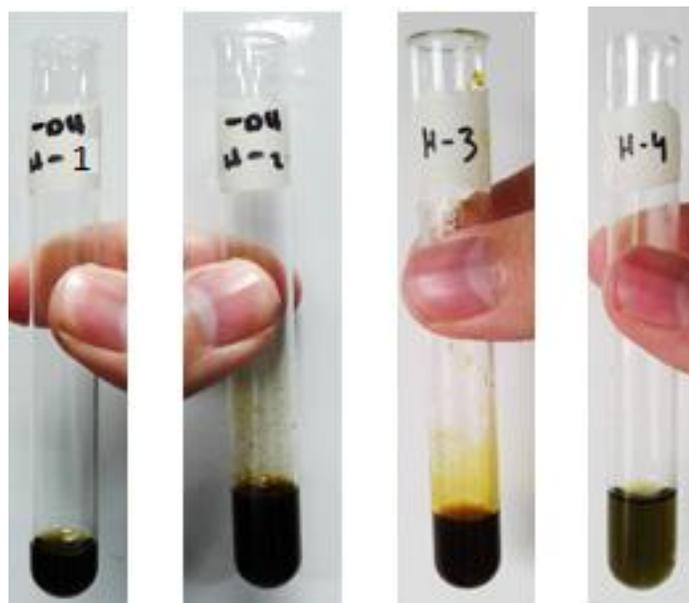
(Elaboración propia)

Figura 50. Test de Raymond para glicósidos cardiotónicos en extracto de corteza. De izquierda a derecha: extracto en benceno, en diclorometano y en hexano.



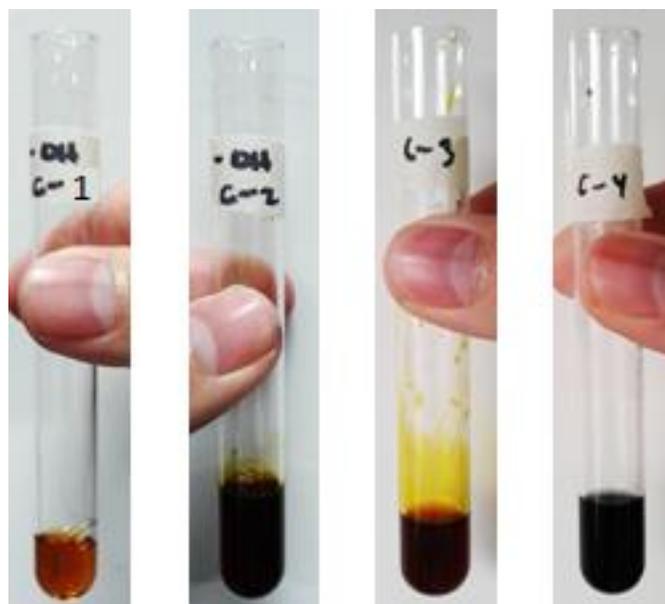
(Elaboración propia)

Figura 51. Pruebas de glicósidos cardiotónicos en extracto metanólico de hoja. 1) Blanco, 2) test de Raymond, 3) test de Baljet, 4) test de Xantidrol.



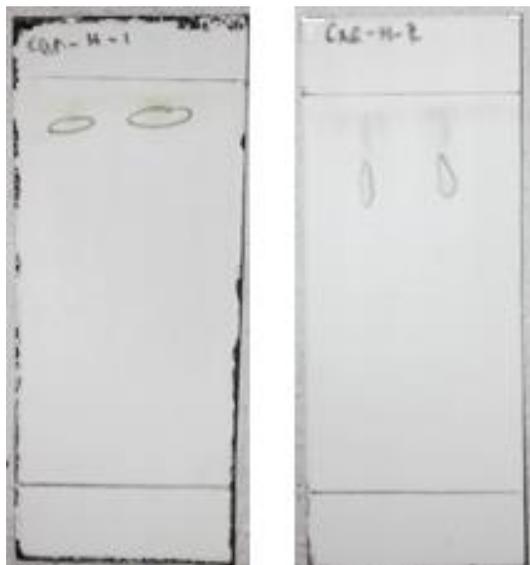
(Elaboración propia)

Figura 52. Pruebas de glicósidos cardiotónicos en extracto metanólico de corteza. 1) Blanco, 2) test de Raymond, 3) test de Baljet, 4) test de Xantidrol.



(Elaboración propia)

Figura 53. TLC de planta seca para la detección de glucósidos cardiotónicos en hoja. En la placa de la izquierda se utilizó la solución de $SbCl_3$ al 20% en diclorometano y en la derecha cloramina T como reveladores.



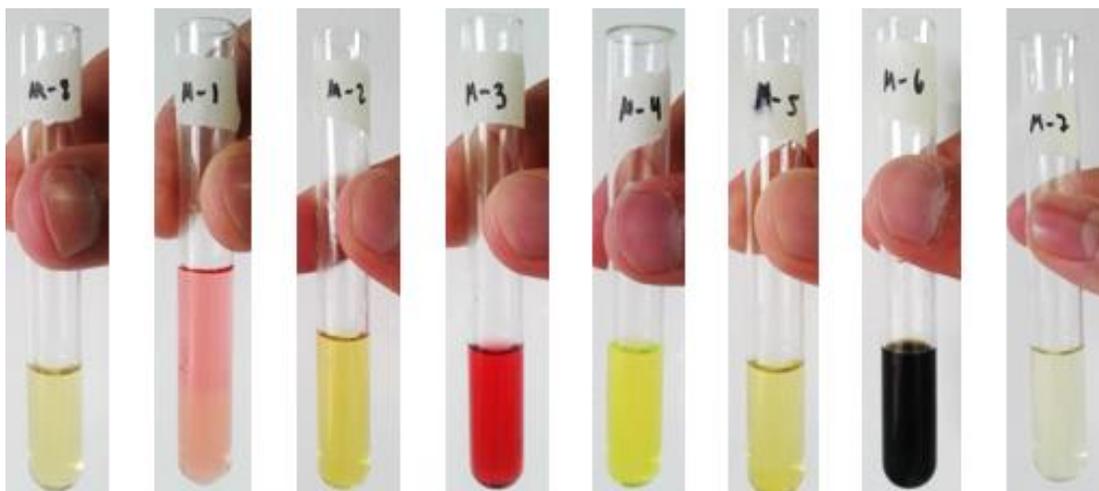
(Elaboración propia)

Figura 54. TLC de planta seca para la detección de glucósidos cardiotónicos en corteza. En la placa de la izquierda se utilizó la solución de $SbCl_3$ al 20% en diclorometano y en la derecha cloramina T como reveladores.



(Elaboración propia)

Figura 55. Pruebas para flavonoides en Morín, un control positivo de flavonoles. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con $SbCl_3$, 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de $FeCl_3$, 7) test de Dimroth.



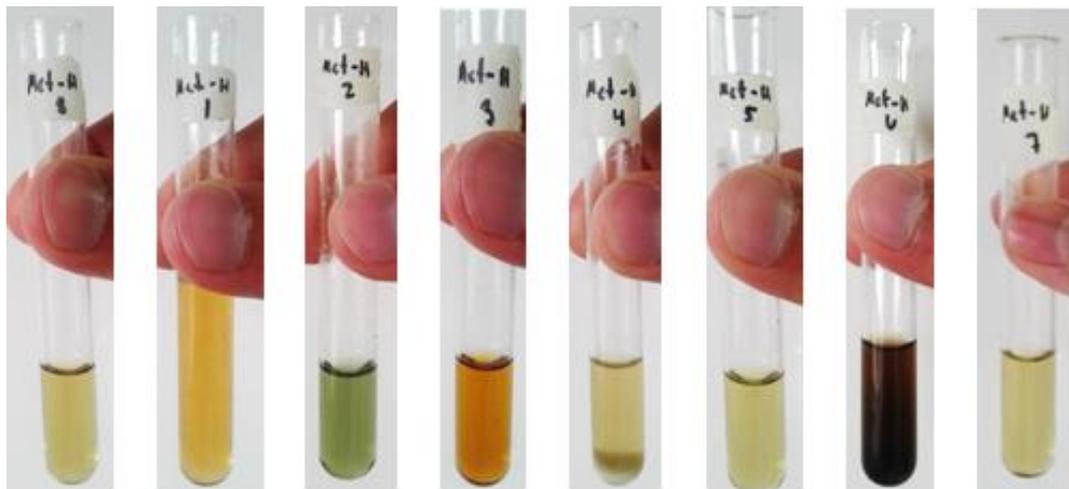
(Elaboración propia)

Figura 56. Pruebas para flavonoides en extracto de benceno en hoja. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con $SbCl_3$, 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de $FeCl_3$, 7) test de Dimroth.



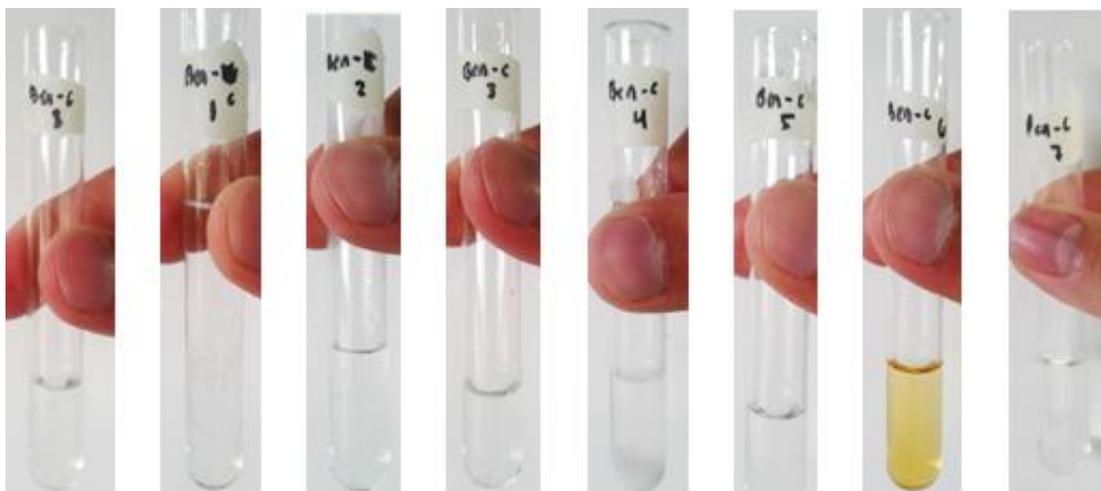
(Elaboración propia)

Figura 57. Pruebas para flavonoides en extracto metanólico en hoja. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con $SbCl_3$, 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de $FeCl_3$, 7) test de Dimroth.



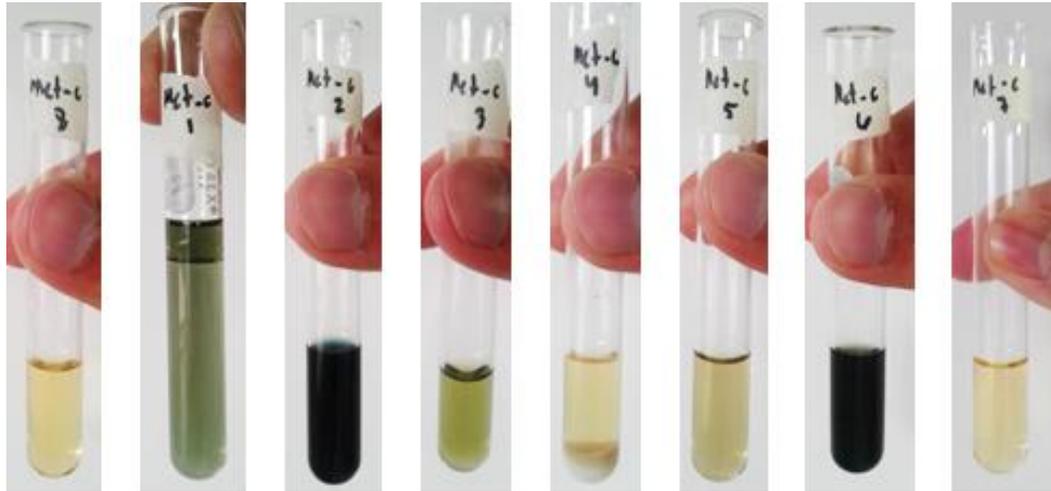
(Elaboración propia)

Figura 58. Pruebas para flavonoides en extracto de benceno en corteza. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con $SbCl_3$, 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de $FeCl_3$, 7) test de Dimroth.



(Elaboración propia)

Figura 59. Pruebas para flavonoides en extracto metanólico en corteza. 8) Blanco, 1) test de cianidina, 2) test para leucoantocianinas, 3) test de Shinoda, 4) test con $SbCl_3$, 5) test con ácido sulfúrico, 6) test de $FeCl_3$, 7) test de Dimroth.



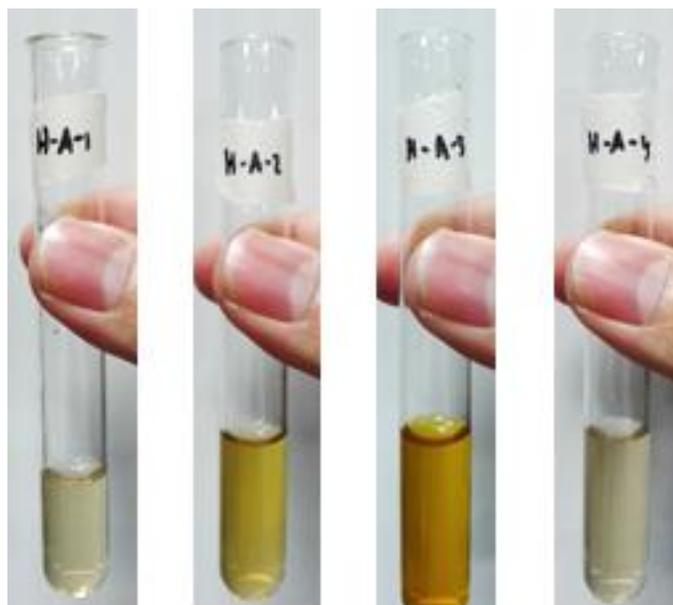
(Elaboración propia)

Figura 60. Pruebas para alcaloides primarios, secundarios o terciarios en hoja. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.



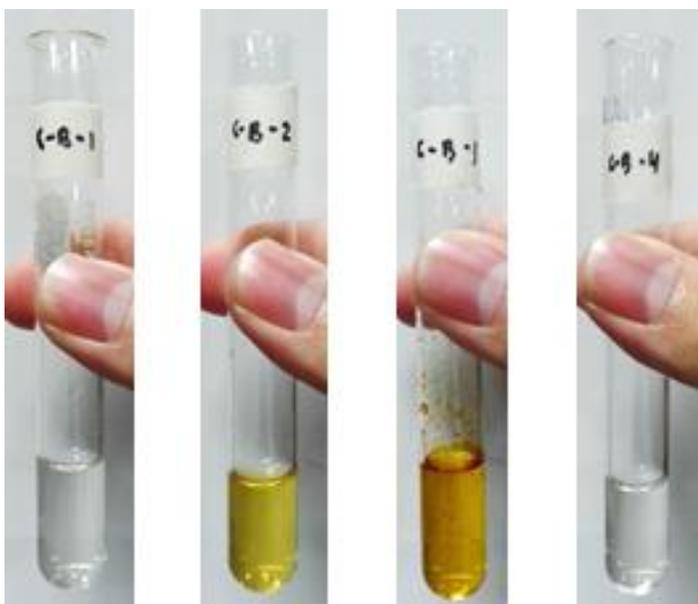
(Elaboración propia)

Figura 61. Pruebas para alcaloides cuaternarios en hoja. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.



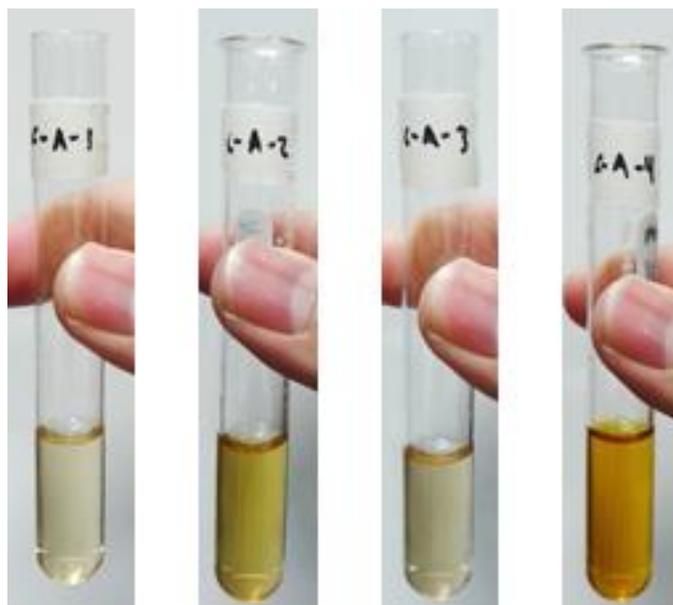
(Elaboración propia)

Figura 62. Pruebas para alcaloides primarios, secundarios o terciarios en corteza. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.



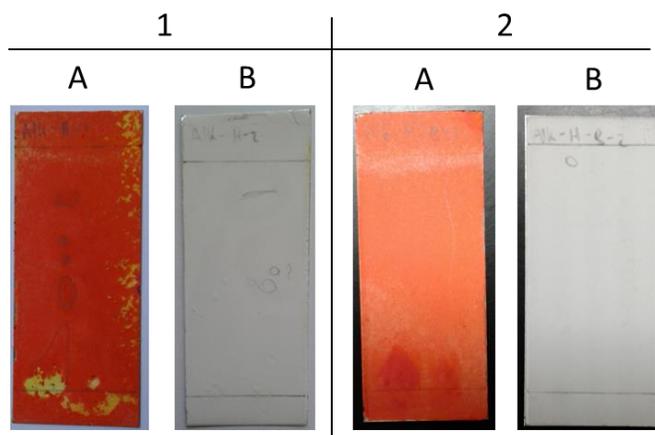
(Elaboración propia)

Figura 63. Pruebas para alcaloides cuaternarios en corteza. 1) Test de Mayer, 2) Test de Wagner, 3) Test de Dragendorff, 4) blanco.



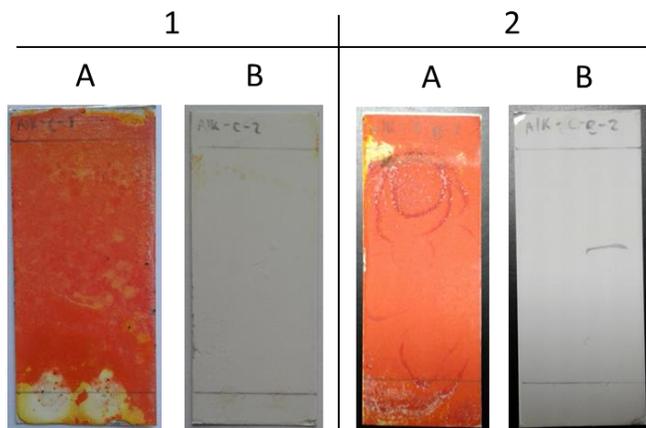
(Elaboración propia)

Figura 64. TLC de la planta seca para la detección de alcaloides en hoja con fase móvil de diclorometano-acetona-dietilamina (5:4:1). Las placas fueron reveladas con (A) reactivo de Dragendorff, (B) ácido sulfúrico al 5% (v/v).



(Elaboración propia)

Figura 65. TLC de la planta seca para la detección de alcaloides en corteza con fase móvil de diclorometano-acetona-dietilamina (5:4:1). Las placas fueron reveladas con (A) reactivo de Dragendorff, (B) ácido sulfúrico al 5% (v/v).



(Elaboración propia)

B. Entrevista

Se realizó una entrevista a Pablo Axcantí, un curandero de Poptún, Petén. Las preguntas fueron enfocadas a los síntomas de leishmaniasis cutánea –conocida como enfermedad del chiclero–, a cómo era tratada y el uso de *Vitex gaumeri* –o jocote de mico– como tratamiento. Fue una entrevista rápida debido a varios contratiempos que ocurrieron durante el viaje a Petén, pero la información recaudada es vital para futuras investigaciones.

P: ¿Qué características presenta la enfermedad del chiclero?

R: La enfermedad inicia como una bombita roja con picazón, reventándose y dejando una marca como hoyo. Se observa como ojo de pescado luego de quince días a un mes. Si sale pus, se le conoce como chiclera húmeda, de lo contrario se le conoce como chiclera seca. En ésta última sólo saca costra, pero genera mayor picazón. El borde de la herida presenta una gran cantidad de yemas. Al rascarse se contamina y se contagia más, creciendo la herida. En este momento es cuando se conoce si es húmeda o no. La enfermedad no es infecciosa, solo se transmite por la mosca del chiclero [mosca de arena]. La misma mosca no puede infectar dos áreas del cuerpo, pero puede existir una segunda infección por otra mosca.

P: ¿Qué hacen las personas para tratar esta enfermedad?

R: Actualmente se usan plantas medicinales. Antes, se usaban ampollas de Glucantime ya que se había perdido información de las plantas. Se retomó el uso de plantas, se volvió más útil y económico. Dentro de las plantas que más se utiliza está el Pa'ulul, el Ixcanan y el Yaxnic. El Pa'ulul

[no posee otro nombre común y no se mostró foto o muestra alguna de esta planta, por lo que se desconoce su nombre científico] es una planta que nace de las piedras, es pequeña con 15 cm de altura, de hoja redonda con tres a cuatro flores. El Ixcanan, chichipín o *Hamelia patens* es una planta con flor naranja y común de observarla en los caminos. El Yaxnic o *Vitex gaumeri* es un árbol alto con flores moradas.

P: ¿Cómo utilizan estas plantas?

R: En el caso del Pa'ulul se utiliza tanto la hoja como el tallo para hacer un tamalito y se calienta sobre ceniza de fogata. Luego de unos minutos se saca de las cenizas y se aplica caliente sobre la llaga del chiclero. En el caso de Ixcanan, se tuesta en el comal y se aplica sobre la herida como polvo. La corteza del Yaxnic es quemada y se utiliza la ceniza caliente para aplicarla sobre la herida seca. Es de una sola vez y en siete a quince días se cae la costra, de lo contrario se repite el procedimiento. Algunas veces se utiliza la hoja tierna recién brotada de las ramas, la cual es machacada y se hace tamalito con hoja de Moxhyan [*Calathea lutea?*], el cual es utilizado comúnmente para envolver tamales. Se pone el tamalito sobre ceniza caliente y se aplica el tamalito caliente sobre la llaga. Se retira luego de media hora y se lava bien con agua. Se aplica tres veces al día. No se pone mucho tiempo sobre la herida porque es tóxico. Estos brotes no se ingieren, ya que produce convulsiones y vómitos, al igual que la cáscara y la corteza. Tanto el Pa'ulul como el Yaxnic son equivalentes en la hora de escoger un tratamiento.

C. Metodología complementaria

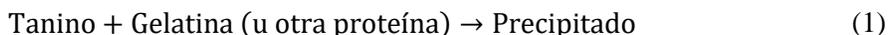
Se describen a continuación los procedimientos de cada una de las pruebas realizadas en este trabajo de graduación. Cada una está basada en literatura y en algunas se muestran las reacciones químicas que ocurren en los experimentos.

1. Pruebas para taninos.

Para las pruebas de gelatina y gelatina con sal se basaron en el artículo de Marini-Bettòlo *et al.* (1981) y el test de cloruro férrico en el de Wójciak-Kosior y Oniszczyk (2008). Se evaporaron 5 mL de extracto de diclorometano y metanólico a sequedad en un baño de vapor, se agregó 25 mL de agua caliente y se agitó hasta disolver. Al enfriarse, se agregaron cuatro gotas de cloruro sódico al 10%(p/v) y se filtró al vacío. El sólido fue desechado y la solución se repartió en cuatro tubos de ensayo. Los primeros tres tubos se utilizaron para las siguientes pruebas mientras que el cuarto sirvió de blanco.

a) Test de gelatina.

Se agregaron 5 gotas de solución de gelatina al 5%(p/v) y se dejó reposar por diez minutos.

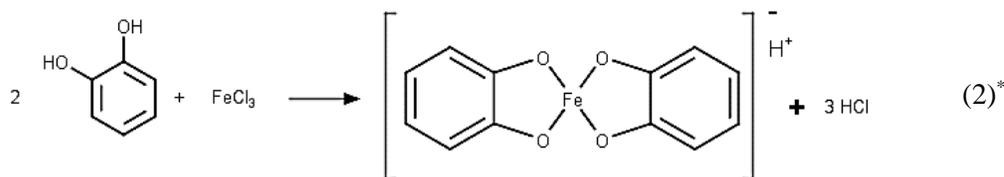


b) Test de gelatina con sal.

Se agregaron 5 gotas de solución de gelatina al 5%(p/v) con 5 gotas de sal al 10%(p/v). Se dejó reposar por diez minutos. La reacción de este test se describe en (1).

c) Test de cloruro férrico (FeCl_3).

Se agregaron 4 gotas de FeCl_3 al 9%(p/v) y se dejó reposar por diez minutos. La reacción (2) es un ejemplo del pirocatecol reaccionando con el cloruro férrico.

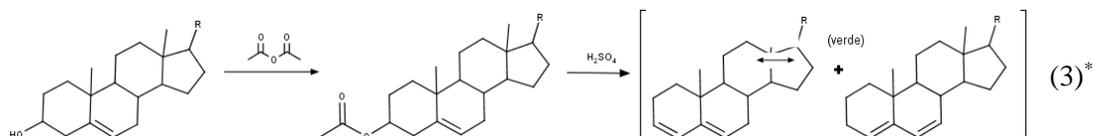


2. Pruebas para esteroides.

Las pruebas para esteroides están basadas en el artículo de Whitby (1923). Se evaporaron 5 mL de extracto de benceno, de diclorometano y metanólico hasta sequedad en un baño de vapor. Se decoloró el extracto seco con varias porciones de 10 mL de dietil éter y, luego de que el lavado de éter quedara incoloro, se agregó 20 mL de benceno. Se filtró al vacío y se repartió en cuatro tubos de ensayo. El cuarto tubo fungió como blanco.

a) Test de Liebermann-Burchard.

Se agregaron 3 gotas de anhídrido acético al tubo de ensayo y una gota de ácido sulfúrico. Se agitó suavemente y se dejó reposar por una hora.



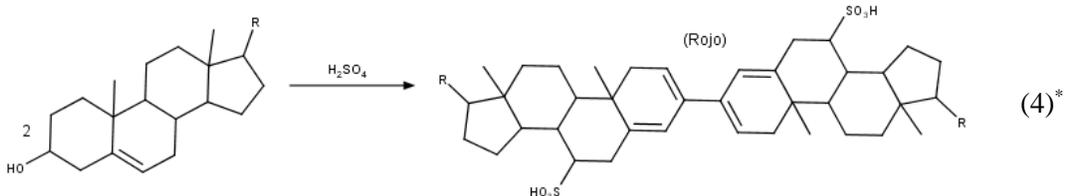
b) Test de Liebermann-Burchard para saponinas esteroidales.

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

Se agregaron 19 gotas de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico. Se agitó suavemente y se dejó reposar por una hora. La reacción para este test es similar a (3).

c) Test de Salkowski.

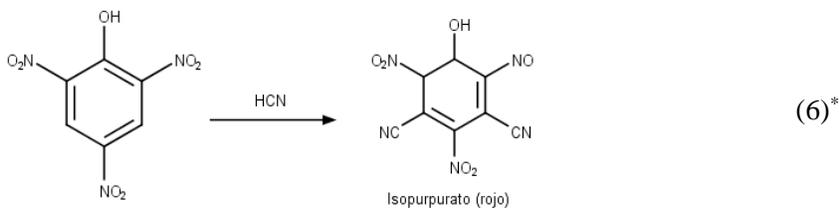
Se agregó lentamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se dejó reposar por una hora.



3. Pruebas para glicósidos cianogenéticos.

La siguiente prueba está basado en el test de Guignard descrito en el trabajo de Kar (2007). Se recortaron rectángulos de papel filtro con dimensiones de 1cm×3cm, se sumergieron en una solución de ácido pícrico 1%(p/v), se secaron en un horno a 40 °C por tres minutos, se sumergieron en una solución de carbonato de sodio 10%(p/v) y nuevamente se secaron en el horno.

En diferentes tubos de ensayo con rosca se agregaron 3 mL de cada uno de los extractos realizados y en otro tubo de ensayo se agregó 100 mg de la planta molida. A cada uno se agregó 1 mL de agua y un par de gotas de tolueno. Se trituró suavemente con una varilla de vidrio y se colocaron los papeles de picrato según la Figura 25. Se taparon los tubos de ensayo y se dejaron reposar en el horno a 40 °C por dos horas.



4. Pruebas para sesquiterpenlactonas.

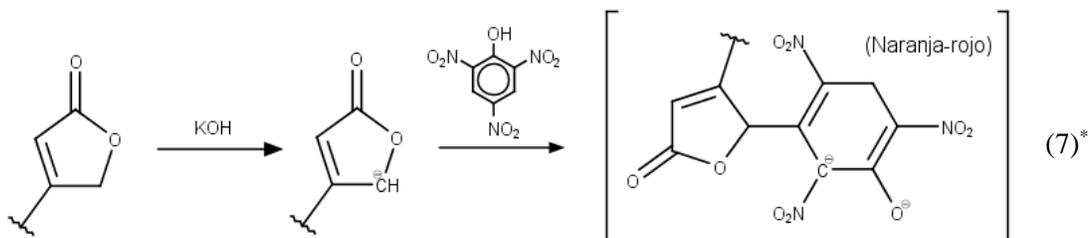
Las dos pruebas colorimétricas están basadas en trabajo de Silva, Lee y Kinghorn (1998), mientras que la cromatografía en capa fina (TLC) está basada en el artículo de Droždž y Bloszyk (1978).

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

En tres tubos de ensayo diferentes se agregaron 3 mL del extracto de diclorometano y metanólico, usándose el primer tubo como blanco.

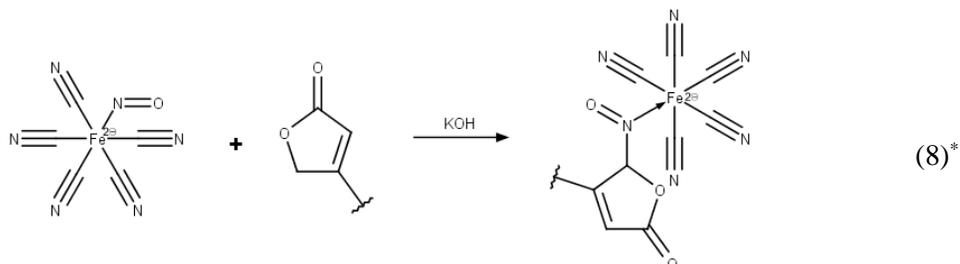
a) Test de Baljet.

Se agregó 5 gotas de una solución preparada con volúmenes iguales de ácido pícrico 1%(p/v) e hidróxido de sodio 10%(p/v). Se dejó reposar por 10 minutos.



b) Test de Legal.

Se agregó 5 gotas de piridina, una gota de nitroprusiato de sodio 5%(p/v) y cinco gotas de hidróxido de sodio 2N. Se dejó reposar por 10 minutos.



c) TLC.

Se molió 5 g de la planta seca con 20 mL de cloroformo. Se filtró al vacío, se descartó sólido y la solución fue almacenada con 25 mL de etanol al 95%(v/v) y 25 mL de acetato de plomo 4%(p/v) por 24 horas a 4 °C. Se filtró al vacío, descartándose el sólido, y la solución fue extraída con tres volúmenes de 10 mL de cloroformo. Se concentraron los extractos de cloroformo y se cromatografió en placas de sílica en dos fases móviles diferentes (benceno-metanol (9:1) y cloroformo-metanol (99:1)) y fueron asperjadas con una solución preparada con volúmenes iguales de resorcinol al 2%(p/v) en metanol y ácido sulfúrico al 2%(v/v). Las placas se calentaron en un horno a 100 °C

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

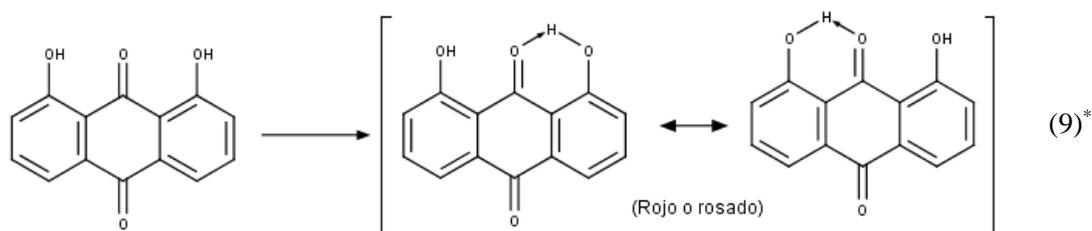
por 5 minutos luego de ser asperjadas y se observaron bajo luz visible (Vis) y bajo luz ultravioleta (UV).

5. Pruebas para quinonas.

Para la detección de quinonas hidroxiladas se presenta dos pruebas diferentes: el test de Bornträger, que se puede dividir en tres pruebas diferentes: con hidróxido de amonio, con hidróxido de sodio y el modificado; y el test con acetato de magnesio. El método realizado se basa en lo descrito en Rufai, Isah e Isyaka (2016), Thomson (1971), Joint Committee of the Pharmaceutical Society and the Society for Analytical Chemistry on Methods for the Evaluation of Drugs (1965) y Shibata, Takito y Tanaka (1950) respectivamente. Para las pruebas de Bornträger y de acetato de magnesio se utilizó los extractos de benceno, diclorometano y metanólico, mientras que la prueba de Bornträger modificado se utilizó la planta seca y molida.

a) Test de Bornträger (hidróxido de amonio).

Se evaporó 3 mL de extracto a sequedad en un baño de vapor, se dejó enfriar y se agregó 30 mL de agua destilada. Se filtró, se descartó el sólido y la solución se extrajo con 10 mL de benceno. La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se colocó en un tubo de ensayo. Se agregó 2 mL de hidróxido de amonio, se mezcló y se dejó reposar por 20 minutos.



b) Test de Bornträger (hidróxido de sodio).

Se colocó en un tubo de ensayo 3 mL de extracto, 4 gotas de etanol y 8 gotas de hidróxido de sodio 5%(p/v). Se dejó reposar por 20 minutos. La reacción va a depender del tipo de quinona presente en el extracto.

c) Test de Bornträger modificado.

Se calentó 0.5 g de planta seca con 10 mL de hidróxido de potasio 0.5 N en un baño de vapor por 30 minutos. Se dejó enfriar y se filtró al vacío, descartándose el sólido. La solución se acidificó

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

con 10 gotas de ácido acético glacial y se agregó 1 mL de peróxido de hidrógeno 3%. Se dejó reposar por cinco minutos y se extrajo con 10 mL de benceno. La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica se colocó en un tubo de ensayo. Se agregó 2 mL de hidróxido de sodio y se dejó reposar por 20 minutos. La reacción de la prueba es similar a (9).

d) Test con acetato de magnesio.

Se recortaron cuadrados de papel filtro con dimensiones de 2.5cm×2.5cm y se colocó una gota de extracto en cada cuadrado de papel filtro. Se esperó a que el solvente se evaporara del papel filtro y se asperjó con acetato de magnesio al 0.5%(p/v) disuelta en metanol. Se secó dentro de un horno a 90 °C por 5 minutos. No se presenta una reacción precisa para esta prueba.

6. Pruebas para saponinas.

Las saponinas son identificadas con una prueba de espuma y con un test de L–B descrita en las pruebas de esteroides. Se realizó la prueba de espuma según lo descrito en Mir, Parihar, Tabasum y Kumari (2016) y se realizó un TLC en placas de sílica de acuerdo a varios autores mencionados más adelante.

a) Prueba de espuma.

Se colocó 100 mg de la planta seca dentro de un tubo de ensayo con rosca y se agregó un volumen igual de agua destilada. Se tapó y se agitó vigorosamente por 40 segundos. Se dejó reposar por 30 minutos. Esta prueba no presenta una reacción.

b) TLC.

Se agregó a 500 mg de planta seca 20 mL de ácido clorhídrico 1 M y se dejó reposar por 2 horas. Se realizó una extracción con 20 mL de éter dietílico y se descartó la fase acuosa. La fase orgánica se llevó a sequedad en un baño de vapor y se redisolvió con 20 mL de cloroformo. La solución fue concentrada y se realizó su TLC en placas de sílica con fase móvil de acetona-hexano (4:1) según Oleszek, Kapusta y Stochmal (2008). Las saponinas fueron reveladas asperjando las placas con una solución en cloroformo de cloruro de antimonio (III) al 20%(p/v) según Oleszek *et al.*(2008). y una solución preparada con volúmenes iguales de ácido acético 10%(v/v) y anhídrido acético (v/v) en etanol según Marini-Bettòlo *et al.* (1981). En ambos casos, las placas fueron calentadas dentro de un horno a 100 °C por cinco minutos luego de ser asperjadas con el revelador.

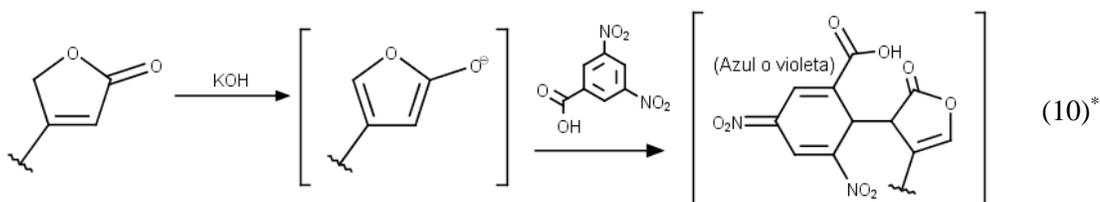
Se realizó otra TLC en placas de sílice con el extracto metanólico de la planta de forma directa. Se utilizó una fase móvil de cloroformo-metanol-agua (13:7:1) según según Oleszek *et al.* (2008) y con los mismos reveladores ya descritos.

7. Pruebas para glicósidos cardiotónicos.

Los test de Kedde, Raymond y Baljet sirven para la detección del anillo lactónico de la aglicona y el test de Xantidrol determina la presencia de 2-desoxiazúcares. Para el test de Kedde y Raymond se utilizaron todos los extractos y para los test de Baljet y Xantidrol se utilizaron los extractos metanólicos. El procedimiento está basado en lo descrito en Kar (2007). Además, se realizó un TLC con las condiciones descritas en Oleszek *et al.*(2008).

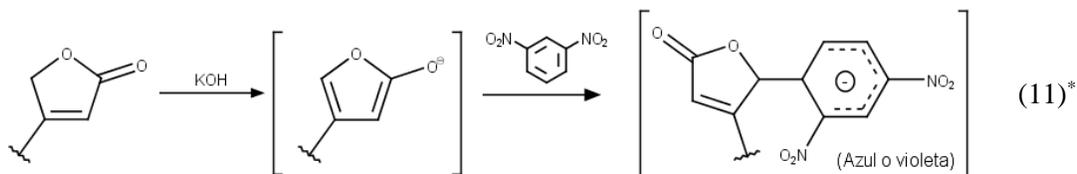
a) Test de Kedde.

Se recortaron cuadrados de papel filtro con dimensiones 2.5cm×2.5cm y en cada uno se colocó 1 gota, 2 gotas y 3 gotas del extracto. Se dejó evaporar los solventes y los papeles fueron asperjados con una preparada con volúmenes iguales de una solución de ácido 3,5-dinitrobenzoico al 3%(p/v) en etanol y una solución acuosa de hidróxido de sodio al 8%(p/v). Se secaron dentro de un horno a 100 °C por 5 minutos.



b) Test de Raymond.

Se colocaron 3 mL del extracto en un tubo de ensayo y se agregó 2 gotas de una solución de m-dinitrobenzoceno al 1%(p/v) en etanol y 3 gotas de hidróxido de sodio al 20%(p/v). Se dejó reposar por 20 minutos.



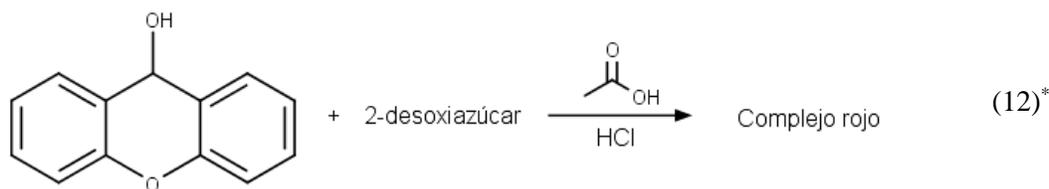
* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

c) Test de Baljet.

Se colocaron 3 mL del extracto en un tubo de ensayo y se agregó 5 gotas de una solución preparada en volúmenes iguales de ácido pícrico al 1%(p/v) e hidróxido de sodio al 10%(p/v). Se dejó reposar por 20 minutos. Presenta la misma reacción que ((7)).

d) Test de Xantidrol.

Se evaporó 5 mL del extracto en un baño de vapor hasta sequedad. El extracto seco fue lavado con porciones de 10 mL de éter dietílico hasta que el lavado de éter quedara incoloro. Se añadió 3 mL de metanol y se trasvasó a un tubo de ensayo, donde se agregó 10 gotas de una solución de xantidrol al 0.125%(p/v) en ácido acético glacial con 1% de ácido clorhídrico concentrado. Se dejó reposar por 20 minutos.



e) TLC.

En un Erlenmeyer se colocó 1 g de la planta seca junto con 20 mL de etanol al 50%(v/v) y 10 mL de acetato de plomo al 10%(p/v) y se dejó reflujar por 15 minutos en una plancha térmica. Se dejó enfriar y se filtró al vacío, descartando el sólido. La solución fue acidificada con 4 mL de ácido acético y se realizó una extracción líquido-líquido con tres lavados de 15 mL de diclorometano. La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica fue secada con sulfato de sodio. Se realizó un TLC en placa de sílica con fase móvil de diclorometano-metanol-agua (65:35:10) y se reveló con una solución de cloruro de antimonio (III) al 20%(p/v) en cloroformo y con una solución de cloramina T. Para esta solución se mezcló 10 mL de cloramina T al 3%(p/v) con 25 mL de ácido tricloroacético al 25%(v/v) en etanol. Las placas, luego de ser asperjadas, fueron colocadas dentro de un horno a 100 °C por 5 minutos.

8. Pruebas para flavonoides.

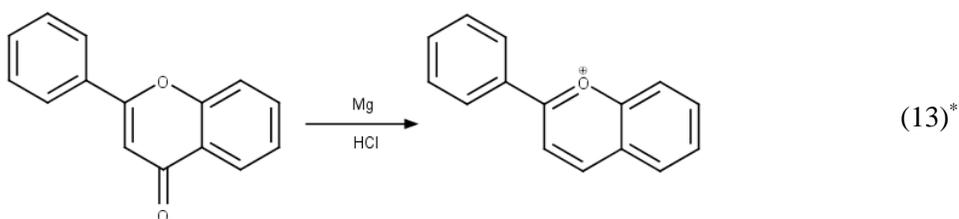
Se secó 1 g de extracto metanólico y de benceno en un baño de vapor. Se lavó con porciones de 10 mL de éter dietílico hasta que el lavado quedara incoloro. Los lavados fueron descartados. Se

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

agregó 30 mL de etanol al 80% (v/v) y se filtró al vacío. La fase sólida se descartó y la fase acuosa se repartió en ocho tubos de ensayo, donde el octavo fungió como blanco. Los test de cianidina, Shinoda y ácido sulfúrico fueron preparados según Silva *et al.* (1998), los de cloruro férrico (III) y Dimroth según Venkataraman (1959) y el de leucoantocianinas según Hillis (1956).

a) Test de cianidina.

Se agregó 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado y 5 virutas de magnesio al tubo de ensayo. Se dejó reposar por 10 minutos y se agregó un volumen igual de agua destilada junto con 1 mL de octanol. Se dejó reposar por 20 minutos.



b) Test de Shinoda.

Se agregó 5 virutas de magnesio y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado al tubo de ensayo. Se dejó reposar por 20 minutos. La reacción es similar a (13).

c) Test de Leucoantocianinas.

Se agregó 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado al tubo de ensayo y se dejó reposar por cinco minutos dentro de un baño María. Se sacó del baño y se dejó reposar por una hora. La prueba no presenta una reacción conocida.

d) Test de cloruro de antimonio (III).

Al tubo de ensayo se agregó 3 gotas de cloruro de antimonio al 20% (p/v) en cloroformo. Se dejó reposar por 20 minutos. La prueba no presenta una reacción conocida.

e) Test de cloruro de hierro (III).

Al tubo de ensayo se agregó 2 gotas de cloruro de hierro (III) al 1% (p/v). Se dejó reposar por 20 minutos. La prueba no presenta una reacción conocida.

* Las estructuras presentadas son de elaboración propia, utilizando el software MarvinSketch v.17.29.

f) Test de ácido sulfúrico.

Al tubo de ensayo se agregó 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó reposar por 20 minutos. La prueba no presenta una reacción conocida.

g) Test de Dimroth.

Al tubo de ensayo se agregó 5 gotas de ácido bórico al 3%(p/v) en anhídrido acético. Se dejó reposar por 20 minutos. La prueba no presenta una reacción conocida.

9. Pruebas para alcaloides.

Se maceró 1 g de planta seca con 20 mL de etanol al 80%(v/v) y se filtró, descartando la fase sólida. Se evaporó a sequedad dentro de un baño de vapor y se añadió 15 mL de ácido clorhídrico 2 N. Se agitó y se mantuvo dentro del baño de vapor por 20 minutos. Luego de enfriarse, se agregó 1 g de Celite y se filtró. Se descartó la fase sólida y la fase acuosa fue alcalinizada con suficiente hidróxido de amonio hasta llegar a un pH de 8 o 9. La solución se extrajo con 10 mL de cloroformo. A la fase acuosa se le agregó suficiente ácido clorhídrico 2 N para disminuir el pH a 1 y se filtró. La fase sólida fue descartada y la acuosa se repartió en cinco tubos de ensayo, siendo el cuarto tubo el blanco y el quinto tubo para un análisis posterior en TLC. La fase orgánica de cloroformo se evaporó a sequedad en un baño de vapor y se agregó 10 mL de ácido clorhídrico 2 N. Se agitó y se filtró, descartándose la fase sólida y la fase acuosa fue distribuida en cinco tubos de ensayo, de la misma forma en que se realizó con la fase acuosa. Las siguientes pruebas colorimétricas fueron preparadas según lo descrito en Kar (2007) y la TLC con las condiciones descritas en Mroczek (2008) y reveladores según Svendsen y Verpoorte (1983).

a) Test de Mayer.

Al tubo de ensayo se agregó cuatro gotas de una solución preparada con 0.136 g de cloruro de mercurio (II) y 0.30 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Se dejó reposar por 20 minutos. La prueba no presenta una reacción conocida.

b) Test de Wagner.

Al tubo de ensayo se agregó cuatro gotas de una solución preparada con 0.13 g de yodo sublimado y 0.2 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Se dejó reposar por 20 minutos. La prueba no presenta una reacción conocida.

c) Test de Dragendorff.

Al tubo de ensayo se agregó cuatro gotas de una solución preparada con 4 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 10 mL de ácido nítrico al 30% con 13.6 g de yoduro de potasio en 25 mL de agua. Se dejó reposar por 20 minutos. La prueba no presenta una reacción conocida.

d) TLC.

Se realizó la cromatografía en una placa de sílica con una fase móvil de cloroformo-acetona-dietilamina (5:4:1). Se asperjó con la solución preparada en el test de Dragendorff y con una solución de ácido sulfúrico al 5% (p/v).

D. Certificado



HERBARIO UVAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

18 Av. 11-95, Zona 15, V.H. III
Apartado Postal No. 82, 01901
Guatemala, Guatemala, C.A.

PBX: 2369-0791 al 95
2364-0336 al 40
2364-0492 al 97

Ext. 528

Guatemala, 27 de septiembre de 2019

A quien corresponda:

Por este medio certifico que recibí en abril del presente año, de manos de Felipe Ramírez, una planta proveniente de San Benito, Petén, para confirmar la identificación de la especie. La planta fue identificada e ingresada a la colección del Herbario UVAL. El número de registro es 20,959 para posteriores consultas.

La especie de la muestra recibida corresponde a:

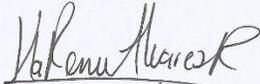
Familia: Lamiaceae

Especie: *Vitex gaumeri* Greenm

Nombres comunes: Jocote de mico

Descripción corta: árboles de hasta 30 metros; hojas palmaticompuestas, opuestas con 5 foliolos; foliolos elípticos de 6 a 22 cm de largo, enteros, ápice agudo a acuminado, base obtusa a redondeada; inflorescencia axilar, en panículas de 8 a 30 cm de largo; flores pubescentes con corola azul, tubo de 4 a 5 mm de largo y 2 a 3 mm de ancho; fruto globoso, amarillo, de 12 a 20 mm de diámetro.

Atentamente, quedo a sus servicios,


Licda. María Renée Álvarez Ruano
Curadora Herbario UVAL
Instituto de Investigaciones
Universidad del Valle de Guatemala

