

Tamizaje Fitoquímico y Evaluación De
Bioactividad en Hojas de *Phoradendron*
Annulatum

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Tamizaje Fitoquímico y Evaluación De Bioactividad en
Hojas de
Phoradendron annulatum

Trabajo de Investigación presentado por
Irma Patricia Orellana Catalan
para optar al grado académico de
Licenciada en Química

Guatemala

2006

Vo.Bo:

(f) _____
Lda. Lucia Nitsch

Tribunal:

(f) _____
Dr. Adrián Gil

(f) _____
Lda. Lucia Nitsch

(f) _____
Lic. Sergio Ortiz

Fecha de Aprobación: 14 de Noviembre 2006

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE ILUSTRACIONES.....	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
A. Descripción de <i>Phoradendrum annulatum</i>	2
1. Nombre científico	
2. Sinónimos	
3. Nombres comunes	
4. Clasificación	
5. Descripción de la especie	
6. Distribución y hábitat	
7. Condiciones de crecimiento	
8. Propagación	
B. Investigaciones fitoquímicas previas	6
C. Loranthaceae utilizada como medicina alternativa contra el cáncer.....	7
D. Actividad antioxidante.....	8
1. Definiciones	
2. Ensayos para la detección de radicales de vida corta	
3. Actividad antioxidante y cáncer	
III. MARCO CONCEPTUAL.....	11
A. Justificación	11
B. Hipótesis	12
C. Objetivos.....	12

IV. MARCO METODOLÓGICO.....	13
A. Metodología general.....	13
1. Colecta	
2. Secado y molido	
3. Tamizaje fitoquímico	
4. Bioensayo con <i>Artemia Salina</i>	
5. Actividad antioxidante, ensayo ABTS	
6. Análisis instrumental	
5. Cronograma de actividades	
V. RESULTADOS.....	20
A. Resultados del tamizaje fitoquímico.....	20
B. Cromatografía de capa fina.....	21
1. Fases móviles	
2. RF para los extractos	
3.CCF Extracto etérico	
C. Resultados de las pruebas de actividad antioxidante.....	22
D. Resultados de ensayo <i>Artemia Salina</i>	23
E. Análisis instrumental de las fracciones del extracto etérico.....	24
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	29
VII. CONCLUSIONES.....	34
VIII. RECOMENDACIONES.....	35
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	37
X. ANEXOS.....	41
A. Cálculos.....	41
1.Equivalentes de vitamina C	

2. Datos originales de la curva de calibración	
B. Fotografías de las pruebas químicas.....	42
C. Fotografías de las placas de CCF.....	48

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Usos y componentes de las Plantas de la familia <i>Lorantaceae Senso lato</i>	6
Cuadro 2: Investigaciones que sustentan la teoría de que el consumo de antioxidantes reduce el daño a las células causado por los radicales libres	10
Cuadro 3: Cronograma de actividades.....	19
Cuadro 4: Porcentajes de rendimiento de la extracción de 25g de material vegetal	20
Cuadro 5: Grupos de metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta <i>P. annulatum</i>	20
Cuadro 6: Fases móviles utilizadas para los tres diferentes extractos	21
Cuadro 7: Valores RF para las manchas separadas con la fase móvil óptima en cada extracto	21
Cuadro 8: Diferentes reveladores para el extracto etérico, utilizando la fase móvil óptima	22
Cuadro 9: Recta de mejor ajuste que relaciona, disminución de la absorbancia del radical libre ABTS con la concentración presente de vitamina C.....	22

Cuadro 10: Capacidades antioxidantes calculadas para cada extracto.....	22
Cuadro 11: Capacidades antioxidantes calculadas para las fracciones del extracto etérico.....	23
Cuadro 12: Dosis letal 50% (LD50) para las fracciones del extracto etérico, obtenidas con ensayo de <i>Artemia salina</i>	23
Cuadro 13: Comparación de composición de la fracción No. 3 con el resto de fracciones.....	28
Cuadro 14: Datos de la curva de calibración que relaciona la disminución de absorbancia del radical ABTS ^{•+} contra la concentración de vitamina C.....	40
Cuadro 15: Fotografías de las pruebas químicas del tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de <i>P. annulatum</i>	41
Cuadro 16: Fases móviles utilizadas para cada extracto, y fase móvil que mostró mejor separación.....	46

LISTA DE ILUSTRACIONES

	Página
Figura 1: <i>Phoradendron annulatum</i> utilizado en este estudio.....	3
Figura 2: Fruto de <i>Phoradendron annulatum</i> utilizado en este estudio.....	3
Figura 3: Mapa de distribución de la familia de las Lorantaceas a nivel mundial.....	5
Figura 4: Mapa de Distribución del género <i>Phoradendron</i> en Guatemala, indicando el número de especies del género por departamento, (número de especies/número de especies endémicas).....	5
Figura 5: Molécula del radical libre ABTS.....	9
Figura 6: Diagrama de flujo de la metodología general de esta investigación	13
Figura 7: Diagrama de flujo del tamizaje fitoquímico (Ortiz,2003)	15
Figura 8: Diagrama de flujo del procedimiento de dilución para el bioensayo con <i>Artemia salina</i>	18
Figura 9: Espectro IR de la fracción No.1 del extracto etérico.....	24

Figura 10: Espectro UV-Vis de la fracción No.1 del extracto etérico.....	24
Figura 11: Cromatograma de la fracción No.1 del extracto etérico obtenido en columna C-18, con fase móvil metanol agua 80:20.....	24
Figura 12: Espectro IR de la fracción No. 2 del extracto etérico.....	25
Figura 13: Espectro UV-Vis de la fracción No. 2 del extracto etérico.....	25
Figura 14: Cromatograma de la fracción No. 2 del extracto etérico obtenido en columna C-18, con fase móvil metanol agua 80:20.....	25
Figura 15: Espectro IR de la fracción No. 3 del extracto etérico.....	26
Figura 16: Espectro UV-Vis de la fracción No. 3 del extracto etérico.....	26
Figura 17: Cromatograma de la fracción No. 3 del extracto etérico obtenido en columna C-18, con fase móvil metanol agua 80:20.....	26
Figura 18: Espectro IR de la fracción No. 4 del extracto etérico.....	27
Figura 19: Espectro UV-Vis de la fracción No. 4 del extracto etérico.....	27

Figura 20: Cromatograma de la fracción No. 4 del extracto etérico
obtenido en columna C-18, con fase móvil metanol agua 80:20.....

27

RESUMEN

En esta investigación se buscaba detectar, identificar y aislar compuestos con actividad biológica y/o antioxidante de las hojas de *P. annultum*. Se obtuvo en extracto etérico, en el cual se detectaron flavonoides, alcaloides esteroidales o terpenoides, carotenoides y triterpenos. La actividad antioxidante para este extracto fue 0.377mg de vitamina C/100ml equivalentes a un mg de extracto/100mL. De este extracto se separaron cuatro fracciones. La fracción No. 3 del extracto etérico fue la que mayor actividad antioxidante presentó (0.4055mg vit C/100ml). La LD50 determinada con *Artemia salina* fue 150.81ppm. El espectro IR reveló que la capacidad antioxidante de la fracción No. 3 no se debe a un polifenol ni a un flavonoide, sino que podría ser un alqueno conjugado o un posible aldehído. También se obtuvo el extracto acuoso y alcohólico, se detectó una saponina como compuesto mayoritario en ambos extractos.

I. INTRODUCCIÓN

La familia de las Loranthaceas tiene potencial como posibles plantas medicinales. El *Viscum album*, es un ejemplo de este potencial, ya que el mismo ha sido ampliamente utilizado para tratar el cáncer. El motivo de esta investigación es aislar sustancias antioxidantes que podrían tener efecto anticáncer. Por ello se realizó una marcha sistemática de identificación y extracción de componentes activos en las hojas de la planta *Phoradendron annulatum*. Se logró obtener por medio de separación en columna una fracción en el extracto etéreo con actividad biológica y actividad antioxidante significativas.

Cabe mencionar que este trabajo de investigación forma parte del proyecto de investigación “Aislamiento e identificación de compuestos antioxidantes a partir de 5 especies del género *Phoradendron*”, dirigido por Dr. Adrián Gil, director del departamento de química de la Universidad del Valle de Guatemala.

II. MARCO TEÓRICO

A. Descripción de *Phoradendrum annulatum*

1. Nombre científico: *Phoradendron annulatum*
2. Sinónimos: En Guatemala, ha sido reportado como *Phoradendron Rubrum* Griseb.
3. Nombres comunes: Liga, Liga de Pájaro, Matapalo.
4. Clasificación:
 - Reino: Plantae
 - Clase: Dicotiledóneas
 - Filo: MAGNOLIOPHYTA
 - Clase: Magnoliópsida
 - Orden: Santales
 - Familia: Loranthaceae
 - Subfamilia: Viscaceae
 - Género: *Phoradendron*
 - Especie: *annulatum*

5. Descripción de la especie: Arbusto hemiparásito aéreo, bastante ramificado y formando grandes masas erigidas o pendientes del tallo. Las ramas con solamente un catáfilo basal. Hojas con pecíolo corto y delgado. Hojas lineares lanceoladas con un tamaño de 10-18cm de largo y 1-4cm de ancho, palmati nervadas. Las flores son de color amarillo-naranja con espigas de 3-4cm de longitud. Las frutas son globulares de 3-4mm de diámetro color rojizo, ver figura 1 y 2 para fotos del *P. annulatum* utilizado en este estudio (Standley, 1946).

Figura 1: *Phoradendrum annulatum* utilizado en este estudio.



Figura 2: Fruto del *Phoradendrum annulatum* utilizado en este estudio.



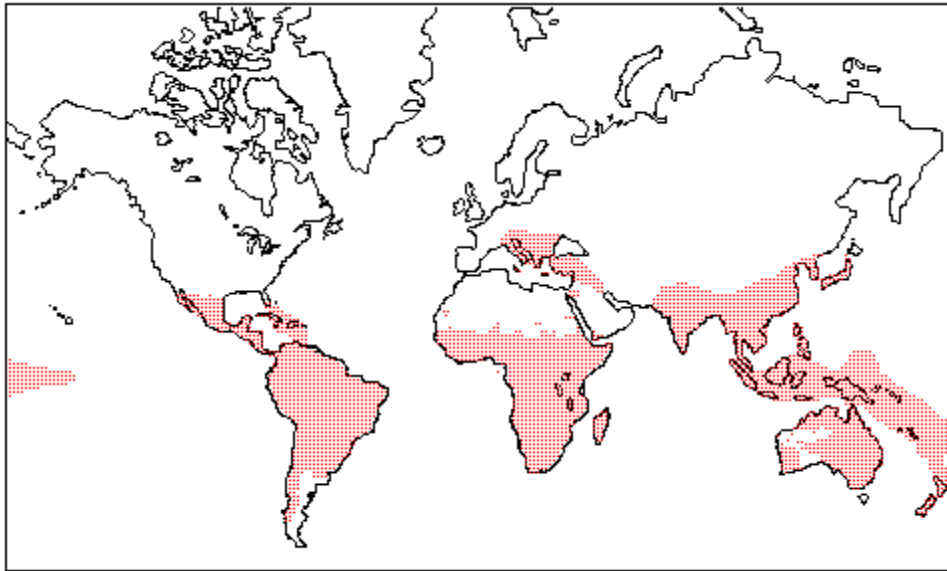
6. Distribución y hábitat: Se han reportado 77 géneros y aproximadamente 959 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en los trópicos. El género menos especializado de las Loranthaceae crece en Sur América, Nueva Zelanda y Australia (ver figura 3) (KEW,2006).

La especie *P. annulatum*, crece en altitudes entre 1200-2400 metros sobre el nivel del mar. En la República de Guatemala se encuentra en los siguientes departamentos: Alta Verapaz, Guatemala, Sacatepéquez, Quetzaltenango, y San Marcos (Ver figura 4). También se encuentra en la república de Costa Rica (Standley,1946).

7. Propagación: La polinización de esta familia de plantas se lleva a cabo por medio de flores modificadas. Las cuales poseen mecanismos crecientemente especializados donde sólo los pájaros pueden manipularlos, donde éstos generan varias señales para atraerlos selectivamente. En muchos casos, las corolas permanecen bajo tensión con bandas contrastantes de colores y generalmente es el pico del pájaro el que ocasiona la apertura explosiva de las flores, empolvando la cabeza del pájaro con polen (KEW, 2006).

La propagación de las semillas del género *Phoradendron*, también es por dispersión con aves. Un estudio realizado por Aukema (2004), utilizando análisis de varianza y variogramas, describe que esta distribución consiste de parches erráticos en los bosques, y la superposición de estos parches, donde la distribución es un resultado de la dispersión por medio de aves. Un hecho de este tipo de dispersión, es que los árboles con mayor probabilidad de ser poblados con estas plantas son aquellos que ya tienen plantas en ellos, es por ello que este tipo de planta puede incluso llegar a matar a su hospedero (Aukema,2004).

Figura 3: Mapa de distribución de Loranthaceae en el Mundo



(SIUC,2006)

Figura 4: Mapa de distribución de *Phoradendron* en Guatemala, indicando el número de especies del género *Phoradendron* por departamento (número de especies/número de especies endémicas).



(Pöll,2006)

B. Investigaciones fitoquímicas previas

La investigación fitoquímica propia de la especie *P. annulatum* es muy poca. A continuación se presentan resultados de investigaciones realizadas en otras especies del mismo género. Con esto se desea probar que es de suma importancia investigar la especie *P. annulatum* ya que tiene altas posibilidades de tener compuestos de interés, pero hay muy poco estudiado de la especie.

Cuadro 1: Usos y componentes investigados de plantas de la familia *Lorentaceae* *sensu lato*.

Especie	Usos	Componentes investigados
<i>Phoradendron</i> sp	Contra verrugas, sarampión, marasmo; estimula el músculo liso; aumenta la presión sanguínea y contracciones intestinales y uterinas. Antitumoral, antiséptica, astringente, cardíaca, cardiotónica, digestiva, diurética, emética, emanagoga, emoliente, espasmolítica, estimulante, hipotensora, lactogoga, narcótica, purgante, vasodilatadora. Carminativo, espasmolítico, hipotensor, laxante, lactagoga y sedante (Cáceres, 1999).	Reportados según la especie
<i>Phoradendron liga</i>	Disminuir presión alta (Varela, 2004)	flavonoides, C-glicosilflavonas, 3-desoxyproantocianidinas, proteínas similares a las de <i>viscum album</i> , lectina específica de galactosa (L-PhL), que son compuestos con potencial como inmunomoduladores (Varela, 2004).
<i>P. robustissimum</i>	Actividad antibacteriana, tóxico a peces (<i>Mollinesia</i> sp) (Cáceres, 1999).	Glicósidos saponinos, taninos (Cáceres, 1999).
<i>P. crassifolium</i>	Actividad protectora de células del tejido gástrico (González <i>et al</i> , 2000)	Taninos, saponinas, flavonoides y cumarinas (González <i>et al</i> , 2000)
<i>P. gregii</i>	NR	Ácido oleanólico (Domínguez <i>et al</i> , 1971)
<i>P. latifolium</i>	Contracción de vasos deferentes de ratas (Queiroz y Melito, 1990).	ácido c-aminobutírico (Queiroz <i>et al</i> , 1986).
<i>P. serotinum</i>	Actividad insecticida (Cáceres, 1999).	NR
<i>P. tomentosum</i>	NR	C-glicósidos de flavona (Fidahusseini <i>et al</i> , 1983).
<i>Psittacanthus cucullaris</i>	Favorece formación de glicosoaminoglicanos en células ováricas de hamster chino (Sinha <i>et al</i> , 1999).	Xilósido fenólico, taninos (Sinha <i>et al</i> , 1999)

C. Loranthaceae utilizada como medicina alternativa contra el cáncer

El Muerdago (*Viscum Album*) es una planta parásita que ha sido utilizada desde la antigüedad por sus propiedades medicinales. Se ha reportado que para los griegos y los druidas era una panacea (cura de todo). En el siglo 16 se usó para curar la hipertensión, dolor de cabeza, síntomas de la menopausia, infertilidad, artritis y reumatismo. Aunque, el interés en el muerdago como una droga anticáncer, inició hasta 1920. Sus extractos han demostrado la capacidad de matar células cancerosas y estimular el sistema inmune en experimentos de laboratorio con animales. Estudios de laboratorio han establecido que el muerdago puede mejorar la actividad del sistema inmune e incrementar la liberación de químicos dañinos para las células tumorosas. Extractos de *Viscum album L.* han exhibido efectos citotóxicos contra una gran variedad de células cancerosas de ratones de laboratorio. Existe evidencia que el extracto de muérdago crecido en árboles de manzana es específicamente citotóxico para células cancerígenas sin causar daño al sistema inmune. Aunque, también se han obtenido resultados mezclados, dependiendo del método de administración, el tipo de cáncer evaluado, y la dosis. A pesar de su amplio uso en Europa y Asia, sólo pocos ensayos médicos se han realizado para documentar su efecto anticáncer (CAM,2001).

Los tres componentes que se han encontrado son lectinas, alcaloides y viscotoxinas, estos podrían ser los responsables de sus efectos biológicos. Las hojas y frutos son tóxicos para los humanos. Los extractos comerciales son soluciones acuosas o alcohólicas, y el muerdago para estos extractos es cultivado en árboles de manzana, pino o roble (CAM,2001).

D. Actividad antioxidante y radicales libres

1. Definiciones: Los radicales libres son átomos o grupo de átomos con un número impar de electrones y pueden ser formados cuando el oxígeno interacciona con ciertas moléculas. Una vez formados, estas moléculas pueden iniciar una reacción en cadena. Su peligrosidad radica en que pueden reaccionar con componentes celulares importantes como el ADN o la membrana celular. Cada vez más, se está aceptando su papel como generadores de enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Aunque es difícil llevar a cabo estudios ya que la detección de los radicales libres dentro del organismo es difícil por sus vidas cortas. Para prevenir el daño que produce un radical libre, el cuerpo es capaz de producir sustancias antioxidantes (Suzen, 2006).

Las sustancias antioxidantes, son aquellas capaces de estabilizar un radical libre, una definición más amplia, sería: son aquellas sustancias que en pequeñas cantidades son capaces de prevenir o retardar en sobremanera la oxidación de materiales fácilmente oxidables. Otra definición es: cualquier sustancia que presente en pequeñas concentraciones comparada con las de un sustrato oxidable, retarda significativamente la oxidación del sustrato. Con estas definiciones, para la situación *in vivo*, no se confina la actividad antioxidante a ningún grupo específico de moléculas y es por ello que el concepto se ha ampliado a incluir enzimas, proteínas, o cualquier otro compuesto (Miquel, 2004).

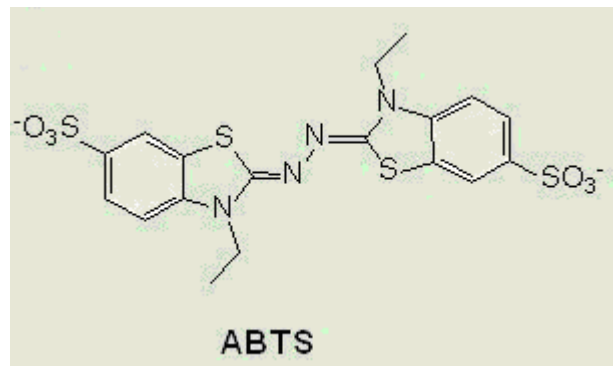
También vale la pena mencionar los conceptos de sinergismo, antagonismo, co-antioxidantes y oxidación. El sinergismo está definido como el fenómeno en el cual un grupo de compuestos cuando están presentes juntos en el mismo sistema, tiene un efecto más pronunciado que el derivado del simple concepto de adicción. El concepto de antagonismo es análogo a éste, pero en lugar de tener un efecto más pronunciado, se tiene un efecto menos pronunciado. Y por último,

los co-antioxidantes son aquellos que tienen la misma actividad de la suma cada uno por separado que cuando están juntos (Miquel, 2004).

2. Ensayos para la detección de radicales de vida corta: Este tipo de métodos se basa en la detección de radicales libre altamente reactivos, y su objetivo es cuantificar la disminución de la concertación de radical debido a la presencia de una sustancia antioxidante. La ventaja de este método es que simula la situación *in vivo*, ya que dentro del organismo los radicales generados son del tipo hidroxil y peroxil y aparecen como intermediarios en el proceso oxidativo. Aunque esto no significa necesariamente que este tipo de ensayo sea una réplica de lo que en realidad ocurre (Miquel,2004).

En este trabajo se utilizó el ensayo con radical libre $ABTS^{\cdot-}$, que corresponde a un radical de vida corta (Ver procedimiento del ensayo en anexo) pero siempre vale la pena recordar que este tipo de radical no existe dentro del organismo.

Figura 5: Estructura molecular del radical libre ABTS



(Vogel,2006)

3. Actividad antioxidante y cáncer: El estrés oxidativo está implicado en el inicio de ciertas enfermedades como lo son el cáncer, Parkinson, la enfermedad de Huntingtons, epilepsia, y el envejecimiento. Se ha encontrado que en personas en tratamiento para curar el cáncer, radioterapia, el estrés oxidativo se

agrava aún más, lo que deteriora significativamente la calidad de vida de las personas (Narchonai,2006).

También se sabe que los antioxidantes están íntimamente relacionados en la prevención de daño celular, cáncer, envejecimiento y una gran variedad de enfermedades, pero esto no ha sido confirmado con estudios clínicos. Las investigaciones sugieren que el consumo de comidas ricas en antioxidantes reduce el daño a las células causado por los radicales libres. Esto puede retrasar, prevenir o hasta retroceder algunas enfermedades, como el cáncer (Suzen, 2006).

A continuación se presentan algunas de estas investigaciones que sustentan esta teoría, no se pretende presentar una lista exhaustiva de las investigaciones, mas sólo se pretende ilustrar lo dicho en el párrafo anterior.

Cuadro 2: Investigaciones que sustentan la teoría de consumo de antioxidantes reducen el daño a las células causado por los radicales libres

Sustancia	Propiedades	Enfermedad relacionada
Extractos de alga marina Espirulina	Significativamente protegió la CP-inducida nefrotoxina a través de su actividad antioxidante (Mohan,2006)	Cáncer de ovario e hígado (Mohan,2006).
Selenio	La propiedad antioxidante del selenio representa una protección a las células del estrés oxidativo en pacientes en tratamiento de cáncer (Elango,2006).	Cáncer bucal (Elango,2006)
Extractos de Jengibre	Propiedades antioxidante y antimutagénicas (Vaiyapuri,2006).	Inhibe el inicio de cáncer químico (Vaiyapuri,2006).
Aceite de oliva virgen	Antioxidante, debido a los compuestos fenólicos presentes (Hillestrom,2006).	Reduce el riesgo de cáncer, de enfermedades coronarias y el daño oxidativo al ADN (Hillestrom,2006).
Extracto Ganoderma Lucidum	Actividad antimutagénica, Inhibidor de la peroxidación lipídica, restablece la defensa antioxidante del organismo (Lakshmi,2006)	Previene daño hepático (Lakshmi,2006)
Ácido Gálico	Antioxidante fuerte (Prasad,2006)	Previene cáncer (Prasad, 2006)
Melatonina	Capacidad de neutralizar radicales libres, antioxidante (Murch,2006) (Suzen,2006).	Previene estrés oxidativo (Murch, 2006) (Suzen,2006)
Extractos de Garcinia Pedunculata	Antioxidante y antimutagénico (Jayaorakasha,2006)	Previene mutagénesis (cancer) (Jayaorakasha,2006).

III. MARCO CONCEPTUAL

A. Justificación

Basándose en investigaciones previas (Cuadro 1) se puede decir que la familia de las Loranthaceas tiene un gran potencial como posibles plantas medicinales. El *Viscum album*, es un ejemplo de este potencial, ya que el mismo ha sido ampliamente utilizado para tratar el cáncer. En Guatemala el clima y los bosques han favorecido la propagación de esta familia, y específicamente del género *Phoradendron*. En los bosques de Guatemala crece una cantidad bastante grande de especies pertenecientes a este género y muchas de ellas son endémicas.

La especie *P. annulatum* crece en varias partes de Guatemala, y existe muy poca información acerca de los metabolitos que la componen, su actividad biológica o de cualquier tipo de información. Es por ello que se considera importante contribuir a su investigación. Y especialmente importante, buscar metabolitos que pudieran tener una acción anticáncer.

El enfoque en los metabolitos con posible acción anticáncer se basa en que es necesario buscar nuevas alternativas para tratar dicha enfermedad ya que es una de las principales causas de mortalidad (American Cancer Society). Además, los tratamientos actuales contra el cáncer suelen tener serios efectos secundarios, y disminuir en gran manera la calidad de vida del enfermo (Medical Library, 2003). Actualmente se está estudiando la existencia de compuestos medicinales provenientes de plantas capaces de prevenir o curar el cáncer. Los compuestos con capacidad antioxidante son los más prometedores en este sentido, es por ello el interés de identificarlos y aislarlos.

Por otro lado, encontrar un fármaco de interés en una planta endémica de Guatemala, serviría como un incentivo para su comercialización. Dicha empresa sería una buena fuente de trabajo en un país agrícola como lo es Guatemala y también sería una buena estrategia para la protección de los bosques Guatemaltecos.

B. Hipótesis

La capacidad antioxidante del extracto etérico de las hojas de la planta *P. annulatum* se debe a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos.

C. Objetivos

1. General: Determinar la capacidad antioxidante del extracto etérico y separar los compuestos que tengan actividad biológica y/o antioxidante de las hojas de la planta *Phoradendrum annulatum*.

2. Específicos

- Obtener los extractos etérico, alcohólico y acuoso de las hojas de la planta *Phoradendrum annulatum*.

- Determinar que familias de metabolitos secundarios están presentes en las hojas de *Phoradendrum annulatum* a través de un tamizaje fitoquímico.

- Determinar la actividad biológica utilizando bioensayo de *Artemia Salina* con el extracto etérico de las hojas de la planta *Phoradendrom annulatum*.

- Determinar si alguno de los extractos de las hojas de la planta *Phoradendrum annulatum* tiene actividad antioxidante, por medio del ensayo ABTS.

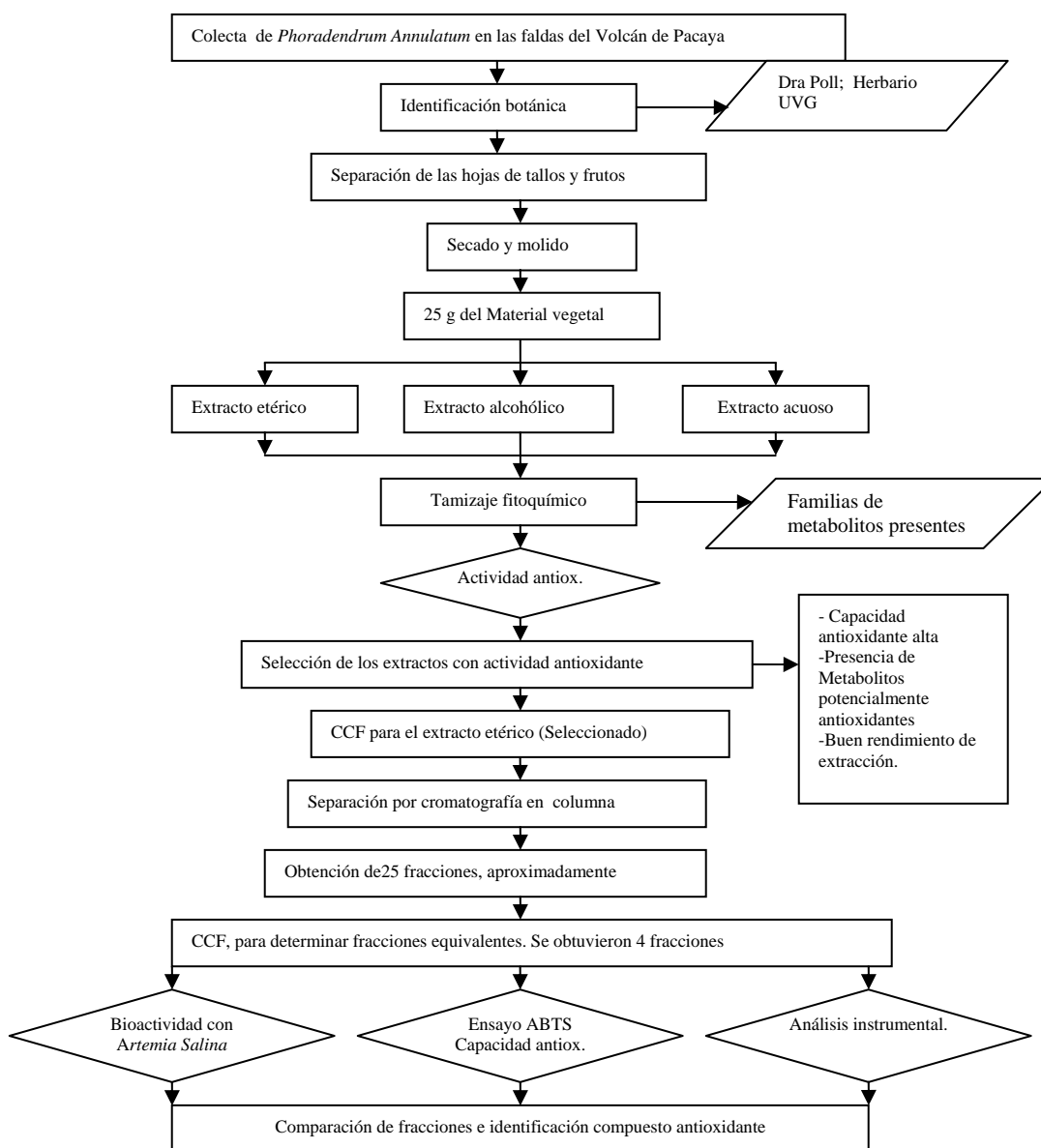
- Separar fracciones de interés, del extracto etérico, según la actividad biológica y antioxidante.

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Metodología general

A continuación se presenta un diagrama de flujo que resume la metodología de este trabajo de investigación.

Figura 6: Diagrama de flujo de la metodología de este trabajo de investigación.



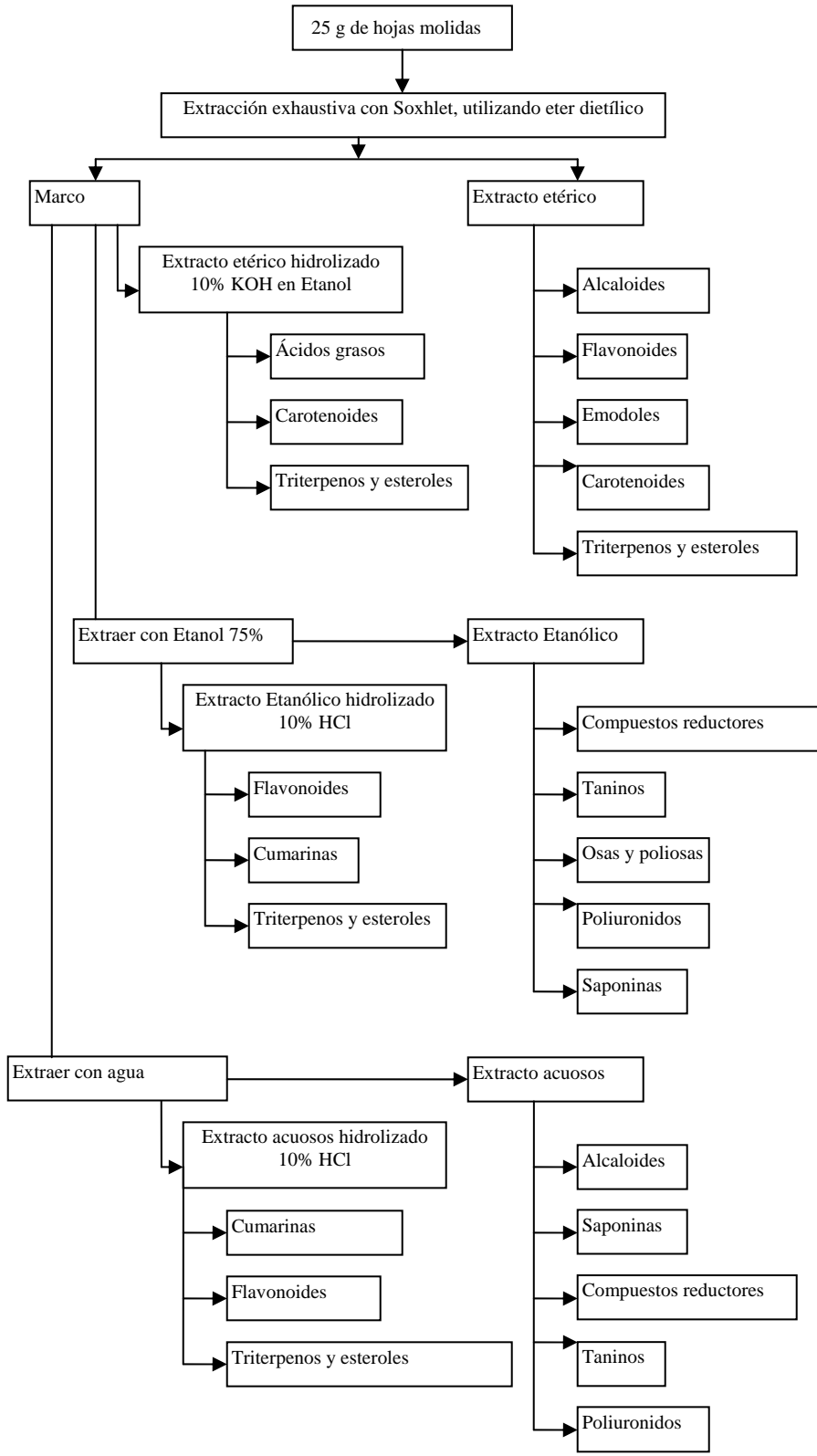
1. Colecta: La colecta se realizó en el mes de febrero del 2006, en las faldas del volcán de Pacaya en la finca El Barretal, cuyas coordenadas son:

14´24°00´ Norte, 90´40°00´. El material vegetal se recogió con todo y la rama del árbol hospedero el cual se identificó como Copalchi (*Strychnos pseudoquina*).

2. Secado y molido: Las hojas se separaron del resto de las ramas y frutos. Solamente se analizaron las hojas. El secado se llevó a cabo en cajas de madera con entrepisos de malla, para permitir la ventilación, y con focos de luz para ayudar a la evaporación del agua sin exponer el material vegetal a cambios bruscos de temperatura. El molido de las hojas se llevó a cabo en una licuadora.

3. Tamizaje fotoquímico: Este se realizó por medio de la metodología propuesta por Sergio Ortiz. Ver en la figura 7 un resumen de esta marcha fitoquímica.

Figura 7: Diagrama de flujo del tamizaje fitoquímico propuesto por S. Ortiz:



4. Actividad antioxidante, ensayo ABTS: Esta se evaluó por medio del ensayo ABTS desarrollado por Van den Berg, pero en este trabajo se utilizó la variante propuesta por Kim (Kim,2002) .

Materiales:

- ABTS como sal de diamonio
- AAPH, 2,2'-Azobis(2-amidino-propano)dihidrocloruro
- Vitamina C grado reactivo
- Fosfato de sodio dibásico
- Fosfato de sodio Monobásico

Procedimiento

Preparación del Radical Libre

Se prepara una solución que es 1mM en AAPH y 2.5mM en ABTS utilizando una solución buffer de fosfatos (pH 7.4 conteniendo 150mM de NaCl). La mezcla se calienta en baño de maría a 68°C por 13 minutos. La concentración de la solución resultante (ABTS^{•-} color azul-verdoso) se ajusta a una absorbancia de 0.650 ± 0.020 (aproximadamente) a 734nm.

Preparación de una curva de referencia con Vitamina C

Se preparan soluciones de vitamina C, con concentraciones exactas de 2mg/100mL, 4 mg/100mL, 6 mg/100mL, 8 mg/100mL, 10 mg/100mL. Para llevar a cabo la reacción se colocan 980µL de la solución de radical libre ABTS^{•-} con 20µL de solución de vitamina C. Se incuban a por 10 minutos en un baño a 37°C protegiendo la mezcla de la luz. El decaimiento de la absorbancia se mide a 734nm al terminar la incubación. El control consiste de 20µL de metanol al 50% y 980µL de la solución de radical libre ABTS^{•-}. Con estos valores se construye una curva que relaciona decaimiento de absorbancia contra concertación de antioxidante (vitamina C en este caso). Esta curva de referencia también se puede construir utilizando, rutina, catequina, ácido clorogénico o quercetina como antioxidante.

Reacción de los extractos con el radical libre ABTS^{•-}

Se colocan 980µL de la solución de radical libre ABTS^{•-} con 20µL del extracto a analizar. Al igual que en la preparación de la curva de referencia, las mezclas de reacción se incuban a por 10 minutos en un baño a 37°C protegiendo la mezcla de la luz. El decaimiento de la absorbancia se mide a 734nm al terminar la incubación. Con este decaimiento se pueden intrapolar en la curva de referencia y obtener los miligramos equivalentes de vitamina C que representa el extracto.

Preparación de una curva de referencia con Vitamina C

Se preparan soluciones de vitamina C, con concentraciones exactas de 2mg/100mL, 4 mg/100mL, 6 mg/100mL, 8 mg/100mL, 10 mg/100mL. Se coloca la vitamina C en lugar del extracto y se procede de la misma manera.

5. Bioactividad, ensayo con *Artemia Salina*: Esta se evalúa por medio del ensayo propuesto por McLaughlin, un resumen del procedimiento se muestra a continuación:

Materiales:

- Quistes de *Artemia Salina*
- Sal para acuario
- Caja petri
- Pipetas 5mL y 0.5mL
- Micropipetas 100µL y 10µL
- Motor oxigenador de pecera

Procedimiento

Eclosión de los quistes de Artemia Salina

Preparar agua de mar de acuerdo a las instrucciones (38g de sal de mar por litro de agua) y filtrarla.

Preparar una pecera, dividida en dos, una de las mitades debe de estar cubierta de la luz. Poner los quistes de *Artemia salina* con el agua de mar en

la mitad que esta cubierta, esto es para que los camarones que eclosionen naden hacia la luz y así poder separarlos de los quistes que no han eclosionado. La eclosión toma 48h-72h aproximadamente. En climas más cálidos los quistes eclosionan más rápido.

Preparación de los viales para la prueba:

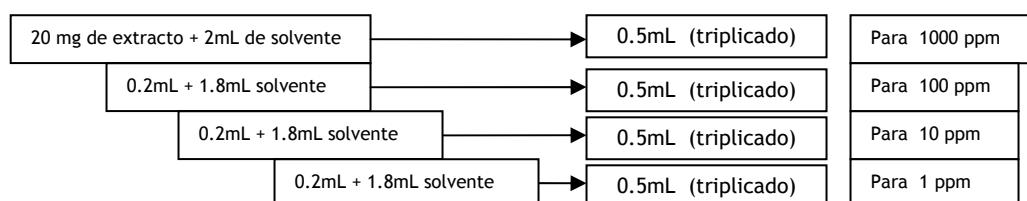
Para cada fracción, evaluar 1000, 100 y 100 µg/mL. Preparar 3 viales para cada concertación para un total de nueve viales, de la manera que se describe en la 5.

Después de tener los tubos de ensayo con el extracto a diferentes concentraciones, el solvente se debe de evaporar a sequedad. Es recomendable dejar los tubos evaporando 24 horas para asegurarse que todo el solvente haya sido evaporado.

Colocación y conteo de los camarones:

Cuando el solvente ha sido evaporado a sequedad por completo, se colocan 10 camarones por tubo en un volumen de 4 mL de agua salada. Ponga los tubos sin cubrir bajo una lámpara, cuidando de que no se sobrecalienten. Contar los sobrevivientes después de 24 horas, y analizar los datos por medio del programa de computadora Finney, para calcular LC50 con un intervalo de confianza del 95%.

Figura 8: Diagrama de flujo del procedimiento de dilución para el bioensayo con *Artemia Salina*.



6. Cronograma de actividades

Cuadro 3: Cronograma de actividades organizado por semanas.

Semana \ Actividad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Colecta	X												
Identificación	X												
Molido	X												
Extracción etéica, a 25 g de hojas		X	X	X	X								
Pruebas al extracto etérico				X									
Extracción Etanólica				X									
Pruebas extracto Etanólico					X								
Extracción auosa, al mat, vegetal restante						X							
Pruebas al extracto acuoso							X						
TLC todos los extractos								X					
Separación en columna									X				
TLC para fracciones equivalentes										X			
Pruebas ABTS, a los tres extractos											X		
Pruebas de bioactividad												X	
Análisis Intrumental, a una fracción													X

V. RESULTADOS

A. Resultados del tamizaje fitoquímico

Cuadro 4: Porcentaje de rendimiento en la extracción de 25g de material vegetal.

Extracto	Peso obtenido	Rendimiento
Etérico	2.5 g, completamente secos	10%
Alcohólico	4.8g de jarabe aproximadamente 70% humedad (Aproximadamente 1.44 g secos)	5.76%
Acuoso	4g de jarabe, aproximadamente 70% humedad (Aproximadamente 1.2 g secos)	4.8%

El extracto etérico fue el que mayor porcentaje de rendimiento presento

Cuadro 5: Grupos de metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta *Phoradendron annulatum*

Extracto / Metabolitos secundarios	Etérico	Etérico saponificado	Alcohólico	Alcohólico hidrolizado	Acuoso	Acuoso hidrolizado
Alcaloides	+*		-		-	
Flavonoides	+			-		-
Emodoles	-					
Cumarinas	-			-		-
Carotenoides	+	+				
Triterpenos	+	+		+		-
Esteroles	-	+		+		-
Ácidos grasos		+				
Compuestos reductores			+		-	
Taninos y Galotaninos			-		-	
Osas y poliosas			+		+	
Poliuronidos			-		+	
Saponinas			+		+	
Antraceno				-		-

En el extracto etérico fue donde se encontró mayor riqueza de metabolitos, de los cuales los flavonoides y los carotenoides tienen potencial antioxidante. Ver en Anexo fotos de las pruebas.

* En muy reducida cantidad

B. Resultados de la cromatografía de capa fina

1. Fases móviles

Cuadro 6: Fases móviles utilizadas para los tres diferentes extractos. La fase móvil óptima se indica con sombreado gris.

Extracto	Fases móviles utilizadas	Manchas observadas
Etérico	Cloroformo	4
	Acetona	1
	Hexano	1
	Ácido Acético 50%	2
	Ciclohexano	2
	Dietil Eter	4
	Dietil Eter Cloroformo 1:1	7
Etanólico	Acetona	2
	Cloroformo	2
	Metanol 50%	2
	Etanol 70%	2
Acuoso	Acetona	1
	Cloroformo:Metanol:Agua (13:7:1)	2
	Metanol 50%	2
	Etanol 70%	2

- Ver en anexo fotos de las placas de CCf
- No se realizó CCF bidimensional

1. RF para los extractos

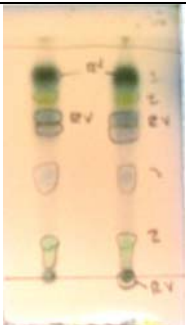

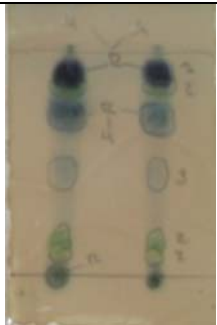
Cuadro 7: Valores RF para las manchas separadas con la fase móvil óptima en cada extracto:

Extracto	Fase móvil / revelador	RF / Observaciones		
Etérico	Dietil Eter Cloroformo 1:1	M	RF	Buena separación. No se observa estela entre manchas
		A	0.92	
		B	0.83	
		C	0.78	
		D	0.45	
		E	0.15	
		F	0.06	
Etanólico	Etanol 70%	M	RF	Poca diferencia entre manchas.
		A	0.72	
		B	0.59	
Acuoso	Metanol 50%	M	RF	Mancha A es la más grande. Se observa estela
		A	0.66	
		B	0.38	
		C	0	

- Ver fotografías de las placas en el anexo

3. CCF para extracto etérico.

Cuadro 8: Diferentes reveladores para el extracto etérico, utilizando la fase móvil óptima

Revelador	Vainillina	Fast Blue Salt	Dragendorf modificado																												
Placa																															
RF y observaciones	<table border="1"> <thead> <tr> <th>M</th> <th>RF</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>0.92</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>0.83</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>0.78</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>0.45</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>0.15</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>0.06</td> </tr> </tbody> </table>	M	RF	A	0.92	B	0.83	C	0.78	D	0.45	E	0.15	F	0.06	Ninguna mancha de la muestra fue revelada. La mancha que se observa es control de Narangenina	<table border="1"> <thead> <tr> <th>M</th> <th>RF</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>0.92</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>0.83</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>0.78</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>0.45</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>0.15</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>0.06</td> </tr> </tbody> </table> Revelo las mismas manchas que la Vainillina	M	RF	A	0.92	B	0.83	C	0.78	D	0.45	E	0.15	F	0.06
M	RF																														
A	0.92																														
B	0.83																														
C	0.78																														
D	0.45																														
E	0.15																														
F	0.06																														
M	RF																														
A	0.92																														
B	0.83																														
C	0.78																														
D	0.45																														
E	0.15																														
F	0.06																														
<i>Las manchas A y C, muy probablemente son alcaloides esteroidales o terpenoides. Lo que se confirma con la prueba de Mayer.</i>																															

C. Pruebas de actividad antioxidante

Cuadro 9: Recta de mejor ajuste que relaciona, disminución de la absorbancia del radical libre ABTS con la concentración presente de vitamina C, medida a 734nm. Ver datos originales en anexo.

Recta de mejor ajuste	$[\Delta A]^* = 0.0361[\text{Vit C}]^* + 0.0487$
Coefficiente de correlación	$R^2 = 0.9606$

* ΔA , Disminución de la absorbancia del radical ABTS
 * [Vit C], Concentración de la Vitamina C en mg/100mL

Cuadro 10: Capacidades antioxidantes calculadas para cada extracto

Extracto	Concentración del extracto [mg/ml]	Descenso de absorbancia [UA]	Miligramos de vit C/100mL equivalentes por miligramos de extracto
Etérico	20	0,5937	0.377
Acuoso	140	0,6483	0.059
Alcohólico	140	0,6201	0.056

El extracto etérico es el que presentó mayor capacidad antioxidante.

Cuadro 11: Capacidades antioxidantes calculadas para

las fracciones del extracto etérico, calculadas en duplicado.

No. de extracto	Concentración del extracto [mg/ml]	Descenso de absorbancia del radical libre [UA]	Miligramos de vit C/100mL equivalentes por miligramos de extracto	Promedio de miligramos de vit C/100mL equivalentes por miligramos de extracto
1	91.74	0.0849	0,005	0,0092
	91.74	0.1339	0,013	
2	98.59	0.2134	0,023	0,0387
	98.59	0.4351	0,054	
3	15.26	0.4757	0,259	0,4055
	15.26	0.5153	0,272	
4	133.41	0.4357	0,388	0,0456
	133.41	0.5406	0,423	

La fracción 3 es la que mayor capacidad antioxidante presenta. Es decir, cada mg de fracción 3 equivale a 0.4055mg de vitamina C/100mL

D. Resultados del ensayo con *Artemia salina*

Cuadro12: Dosis letal 50% (LD50) para las fracciones del extracto etérico, obtenidas con ensayo de *Artemia salina*.

Fracción	LD50 [ppm]
1	5.50
2	1.00
3	150.81
4	1.00

La fracción con mayor LD50 según ensayo con *Artemia salina* es la fracción 3.

- LD50 calculada por medio de regresión lineal, ver sección de cálculos para una explicación detallada.

E. Análisis instrumental de las fracciones del extracto etérico

Figura 9: Espectro IR de la fracción No. 1, del extracto etérico:

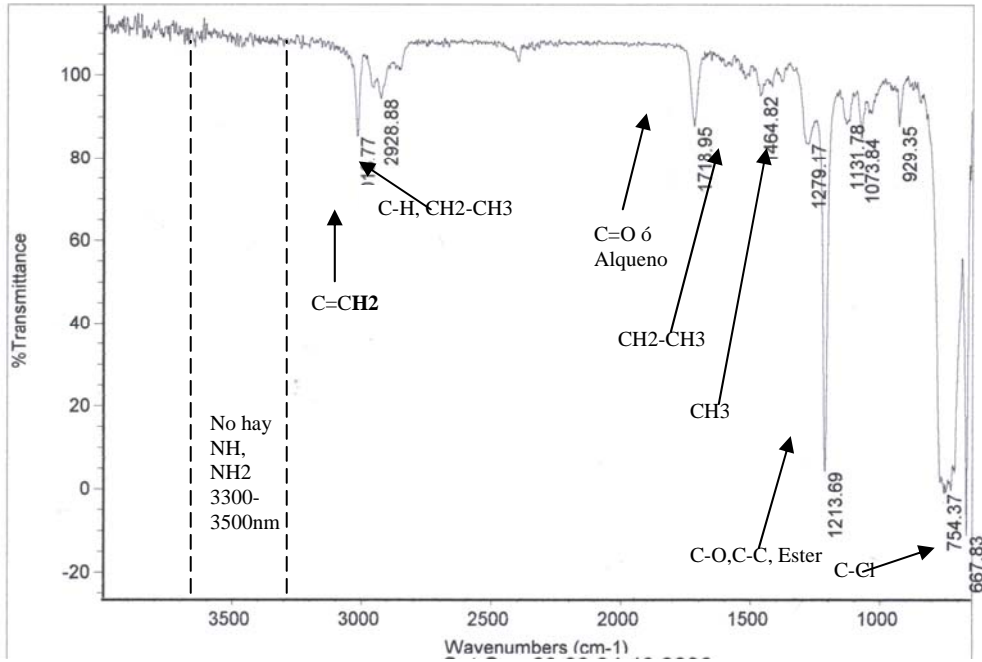


Figura 10: Espectro UV-Vis de la fracción No.1, del extracto etérico:

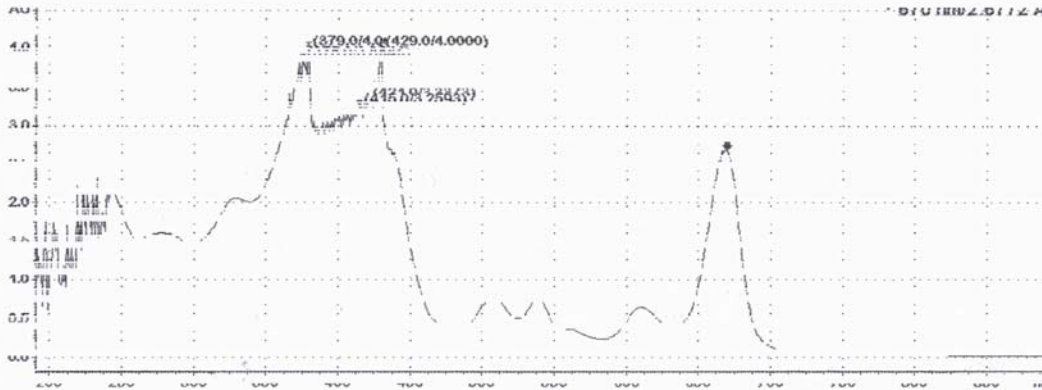


Figura 11: Cromatograma de la fracción No.1, del extracto etérico, obtenido en una columna C-18, con fase móvil, metanol agua 80:20.

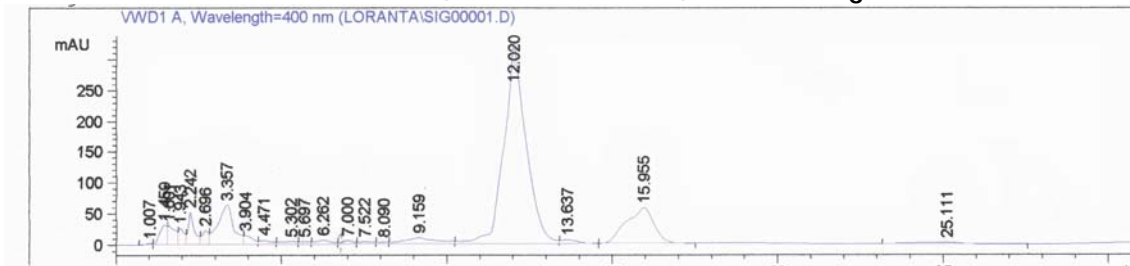


Figura 12: Espectro IR de la fracción No. 2, del extracto etérico:

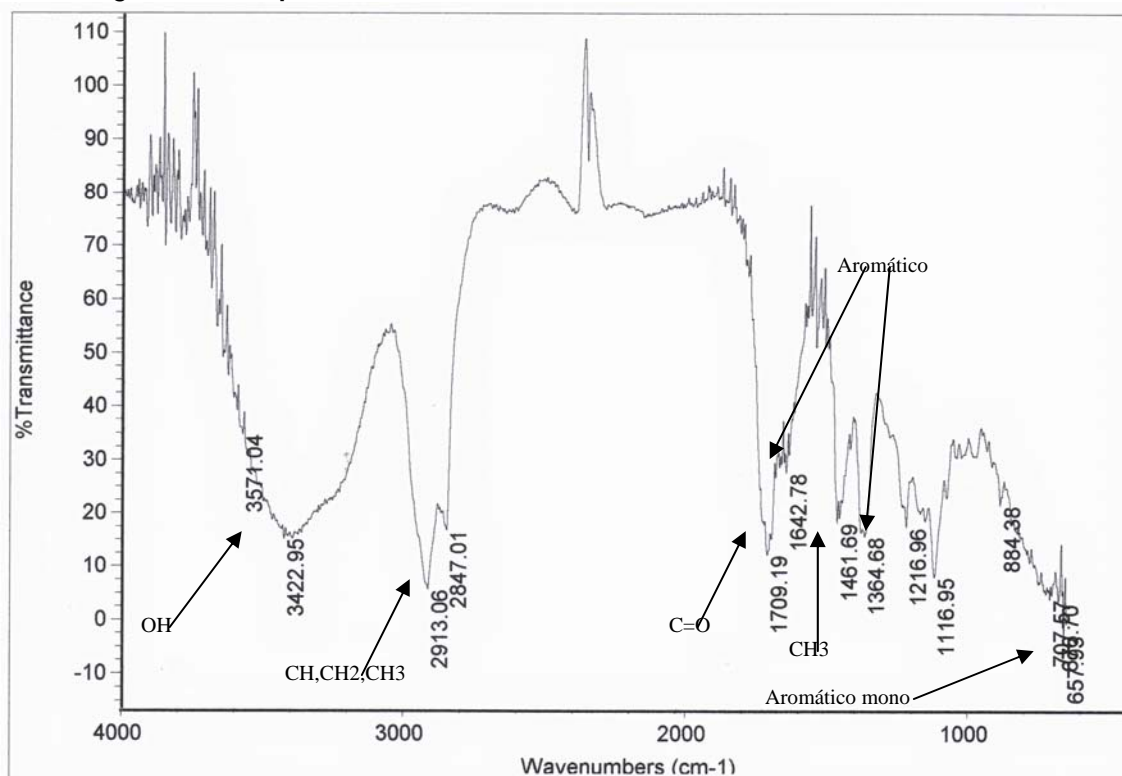


Figura 13: Espectro UV-Vis de la fracción No.2, del extracto etérico:

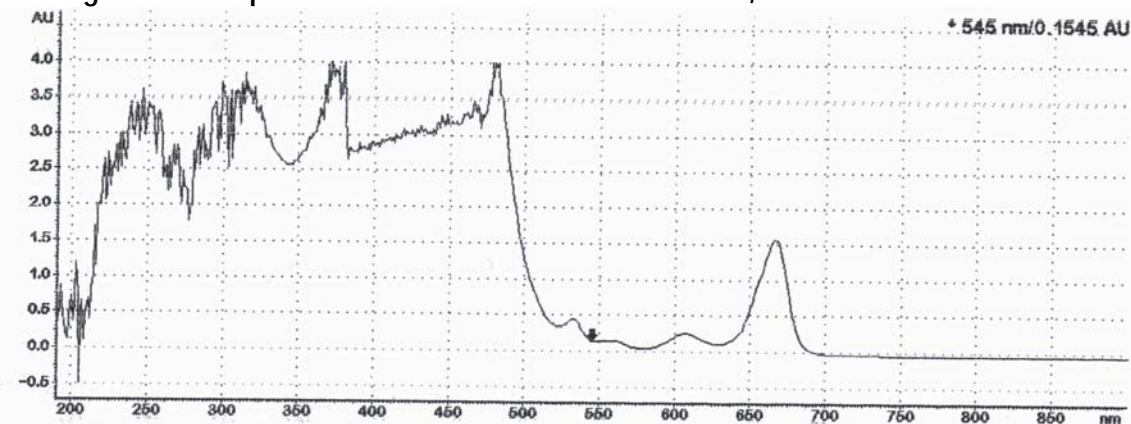


Figura 14: Cromatograma de la fracción No.2, del extracto etérico, obtenido en una columna C-18, con fase móvil, metanol agua 80:20.

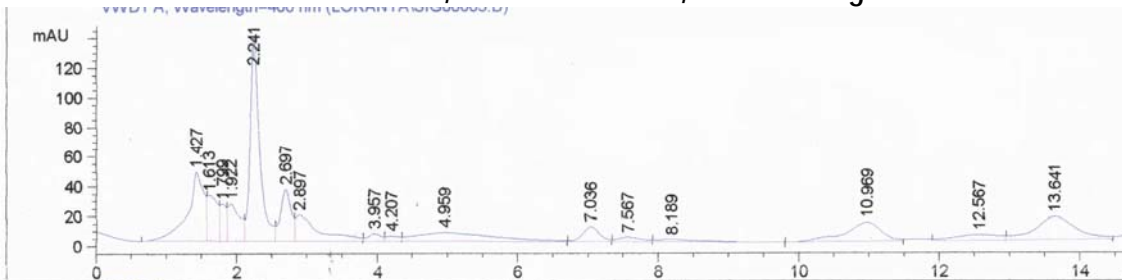


Figura 15: Espectro IR de la fracción No. 3, del extracto etérico:

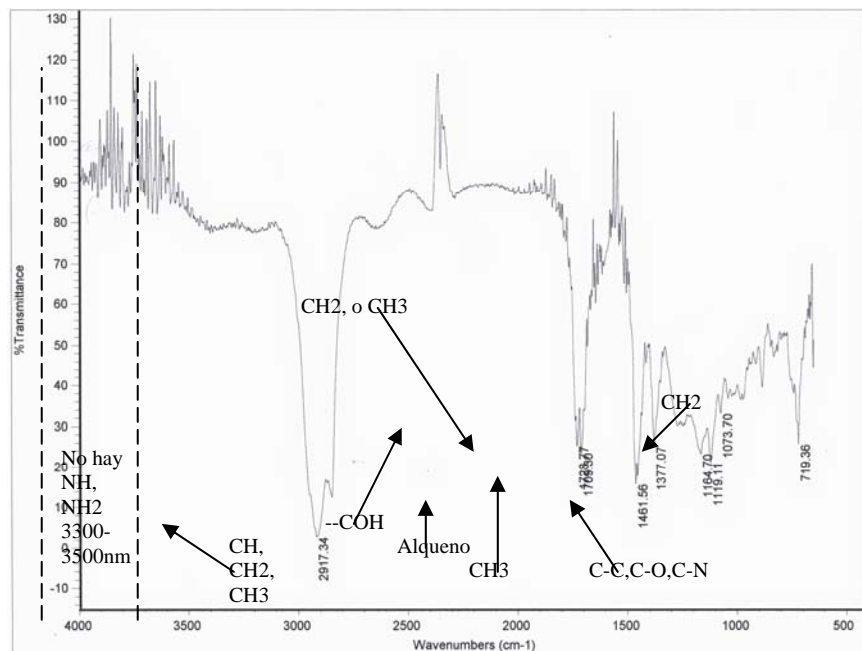


Figura 16: Espectro UV-Vis de la fracción No.3, del extracto etérico:

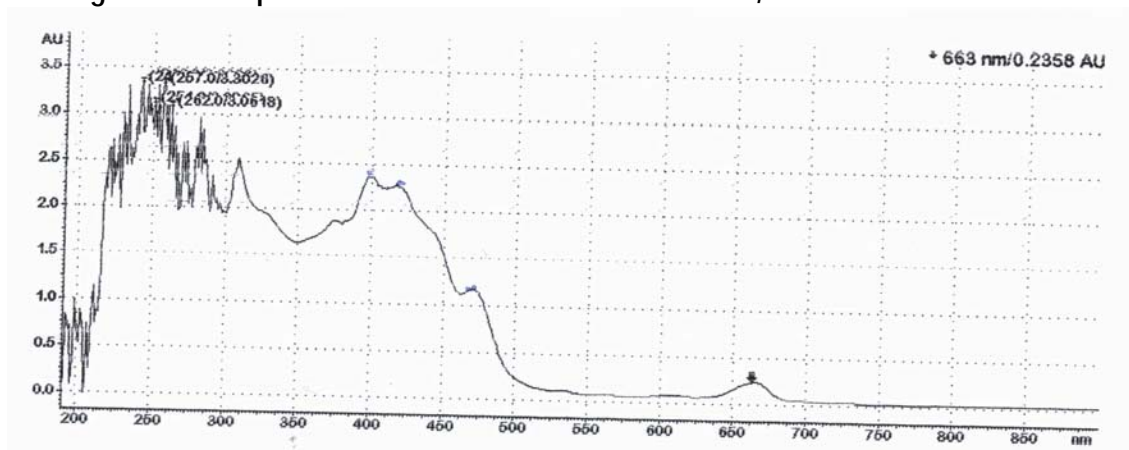


Figura 17: Cromatograma de la fracción No.3, del extracto etérico, obtenido en una columna C-18, con fase móvil, metanol agua 80:20.

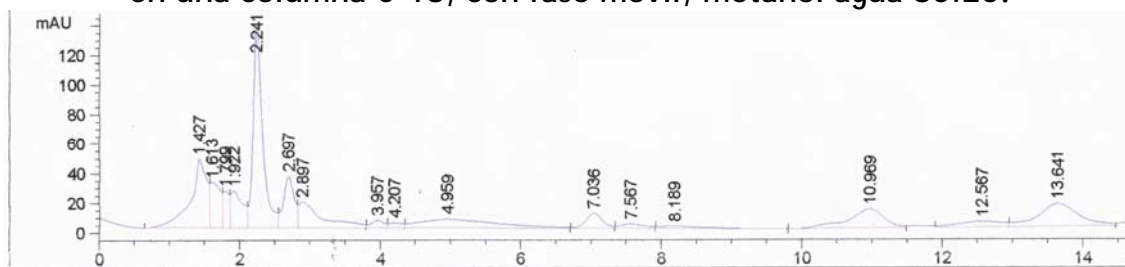


Figura 18: Espectro IR de la fracción No. 4, del extracto etérico:

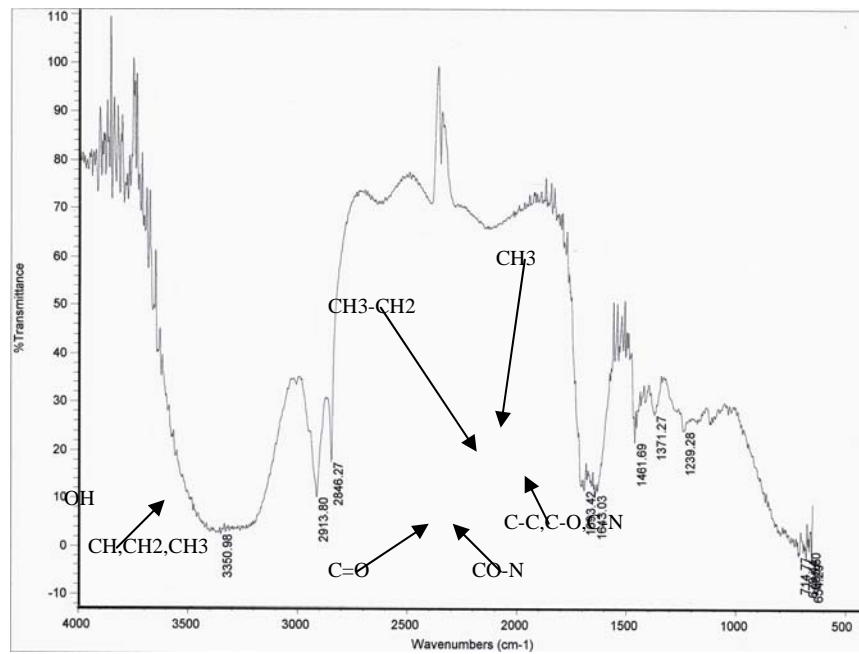


Figura 19: Espectro UV-Vis de la fracción No.4, del extracto etérico:

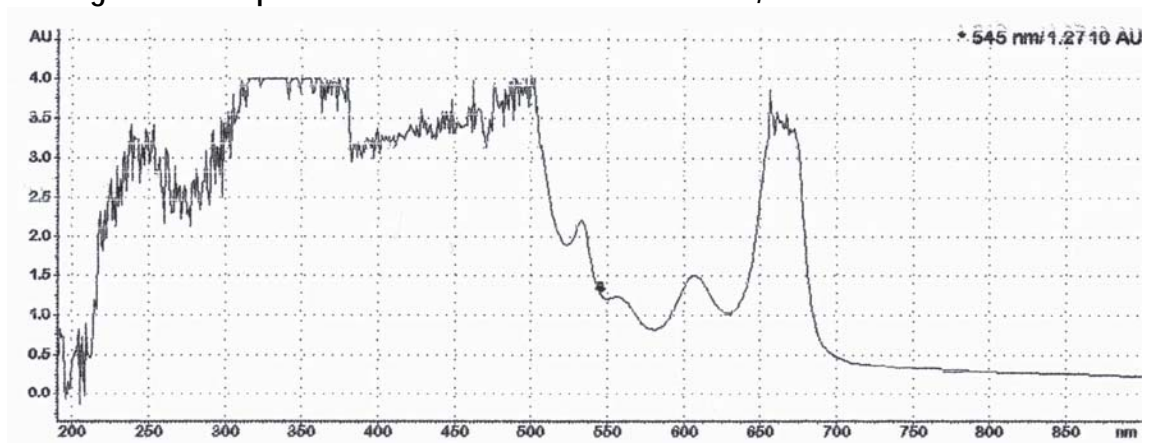
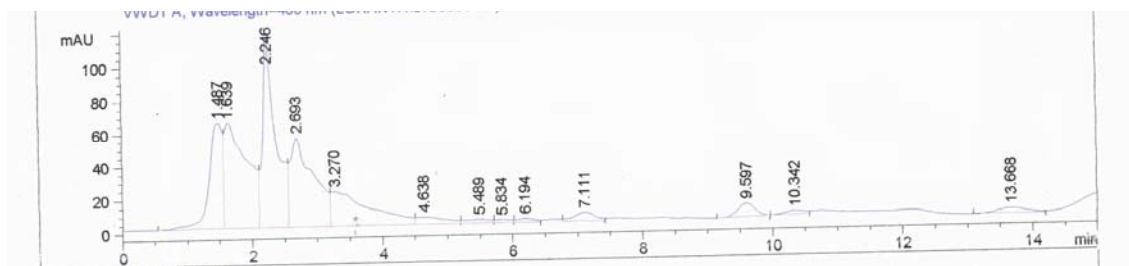


Figura 20: Cromatograma de la fracción No.4, del extracto etérico, obtenido en una columna C-18, con fase móvil, metanol agua 80:20.



Cuadro 13: Comparación de composición de la fracción 3 con el resto de fracciones

Tiempo retención de la fracción 3	Áreas en la fracción 3	Fracción 1		Fracción 2		Fracción 4	
		% relativo a fracción 3	Área	% relativo a fracción 3	Área	% relativo a fracción 3	Área
1.427	761,083	-	No aparece	160,4	1221,151	-	No aparece
1.613	306,883	156,2	479,354	257,3	789,761	506,0	1552,722
1.799	146,861	-	No aparece	228,0	334,820	-	No aparece
1.922	291,660	-	No aparece	324,9	947,676	-	No aparece
2.241	1305,581	50,7	661,688	264,9	3458,743	125,5	1638,929
2.697	370,611	82,5	305,844	300,3	1112,995	365,1	1353,006
2.897	414,449	-	No aparece	190,2	788,437	-	No aparece
3.957	68,644	411,0	282,105	326,8	224,296	-	No aparece
4.207*	48,383	-	No aparece	-	No aparece	-	No aparece
4.959	469,313	-	No aparece	26,6	124,746	-	No aparece
7.036	171,448	79,5	136,228	185,0	317,227	70,3	120,576
7.567	76,207	153,5	117,004	142,0	108,183	-	No aparece
8.189	69,893	10,2	7,149	319,2	223,118	-	No aparece
10.969*	455,478	-	No aparece	-	No aparece	-	No aparece
12.567*	169,703	-	No aparece	-	No aparece	-	No aparece
13.641	627,690	34,9	218,931	-	No aparece	17,9	112,451

Los picos marcados con gris son exclusivos de la fracción 3. Los picos marcados con negritas son los que comparten con la fracción 3 las otras fracciones, pero tienen poca cantidad comparado con la fracción 3.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta investigación se buscaba detectar, identificar y aislar compuestos con actividad biológica y/o antioxidante. Se obtuvieron cuatro fracciones del extracto etérico, por medio de separación en columna, a las cuales se le realizó pruebas de actividad antioxidante, actividad biológica con *Artemia salina* y análisis Instrumental. De estas fracciones la No. 3, es la que mostró una mejor capacidad antioxidante y su LD50 fue la mas alta. A continuación se da un análisis detallado de los resultados.

En este trabajo se utilizaron solamente las hojas de la planta *P. annulatum*. Debido a que es la parte más abundante de la planta y porque se asumió que allí podían estar los metabolitos secundarios de importancia. Aunque no era parte de los objetivos de esta investigación, se recomienda analizar los frutos, tallos y austerios ya que de acuerdo a Kuskosky(2005), <<los frutos tienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos, y su consumo está asociado a una menor incidencia y mortalidad por cáncer>>(Kukosky,2005), además se ha reportado toxicidad en los frutos.

Se considera que en la extracción exhaustiva, no se afectó los metabolitos termolábiles, sin embargo, si se pudieron haber degradado los metabolitos fotosensibles. Además de los factores considerados se recomienda tomar en cuenta la localización de la planta en la montaña (frente seco o frente húmedo) y llevar a cabo varias colectas durante el año. Debido a que la concentración y variedad de metabolitos puede cambiar según la época y condiciones.

Tal como se plantea en la metodología, de los tres extractos obtenidos, se debía elegir uno para realizar un análisis profundo. Según los criterios de selección de la metodología (Ver figura 6) se seleccionó el extracto etérico. Éste fue el que presentó una mejor capacidad antioxidante (ver cuadro 10). También, fue el más rico en metabolitos potencialmente antioxidantes (Ver cuadro 5). Y para complementar fue el que presentó más rendimiento en la extracción (Ver cuadro 4).

Una de las ventajas que presentaría el extracto etérico al momento de extraer en grandes cantidades es que no es tan susceptible a crecimiento de mohos o bacterias como lo es el acuoso. Aunque por otro lado, el extracto acuoso es muy fácil de obtener en forma de infusión.

Los rendimientos obtenidos son aproximados debido a la cantidad de solvente no evaporado en cada extracto, por lo que se recomienda liofilizar los extractos. Se considera que los rendimientos se pueden mejorar en gran manera, ya que no se le dio tanta importancia a realizar un proceso eficiente sino a la composición de los extractos. Por ejemplo en repetidas ocasiones se tomó extracto directamente del balón de extracción con el fin de realizar pruebas con extracto fresco, en lugar de esperar a que la extracción finalizara. Lo que disminuye el rendimiento final.

En la CCF del extracto etérico, al revelar con vainillina y Dragendorff las mismas manchas fueron reveladas (ver cuadro 8). Lo que sugiere la presencia de un alcaloide esterooidal o terpenoidal. La prueba de Mayer confirma la presencia de alcaloides en el extracto etérico. Es importante mencionar que en la planta hospedera, Copalchí, se han encontrado alcaloides (Nicoletti, 1984). Y esto se puede atribuir a que el *P. annulatum*, es una planta que succiona savia de la planta hospedera.

Se realizó separación en columna al extracto etérico (ver CCF del extracto etérico en cuadro 8). La fracción No.1, había quedado retenida en la sílica gel, lográndose obtener al cambiar el eluyente a acetona y cloroformo 1:1. Lo que nos indica que la fracción No. 1 es más polar que las otras, ya que fue retenida por la sílica que tiene grupos OH, fuertemente polares. Lo mas interesante es que el espectro IR no revela grupos OH. Esta polaridad se puede deber a algún otro grupo funcional, como por ejemplo a alquenos conjugados. También cabe mencionar que el color de esta fracción era verde oscuro. Esto sugiere grupos cromóforos como lo son los alquenos conjugados.

En el ensayo ABTS, la fracción con mayor actividad antioxidante fue la No. 3, y la con menor actividad antioxidante fue la fracción No. 1. Las fracciones No. 2 y No.4 tuvieron actividades muy similares (Ver cuadro 11). En el cuadro 11 se observa que las actividades antioxidantes no son mayores que la actividad antioxidante de la vitamina C. Pero se debe considerar que los metabolitos responsables de esta actividad antioxidante son sustancias que no son fotosensibles ya que sobrevivieron la extracción exhaustiva que duro 4 semanas (ver cuadro 3), así como la exposición a la luz, y aire.

Al analizar las actividades antioxidante conjuntamente con los espectros IR. Se puede ver que las fracciones No. 2 y No. 4 a pesar de tener grupos aromáticos y grupos OH, que podrían ser fenoles, no tienen actividad antioxidante significativa. Es decir, que los fenoles presentes en las fracciones 2 y 4 no aportan actividad antioxidante. Por otro lado la molécula de la fracción No. 3, la más antioxidante, podría ser un alqueno conjugado o un posible aldehído (pico en 1728nm), pero no un polifenol. Tampoco es un flavonoide ya que en el espectro IR no se observa señales de aromáticos característico de los flavonoides.

Al realizar el ensayo con *Artemia salina*, la fracción No. 3 presentó la LD50 más alta (Ver cuadro 12). Lo que sugiere que la molécula con alta actividad antioxidante es la menos tóxica. Las fracciones 2 y 4 presentaron la más alta bioactividad, aclarando que esta bioactividad no es del tipo antioxidante. Pero en este trabajo no se investigó qué tipo de bioactividad es la que tiene.

Se obtuvieron resultados similares en las fracciones 4 y 2, en los siguientes aspectos: Las capacidades antioxidantes son similares (difieren en 0.007 unidades); En ambos espectros IR se confirma la presencia de un grupo OH, posiblemente un fenol, especialmente en la fracción 2; Las bioactividades encontradas fueron 1ppm para ambos; Y finalmente, los espectros UV-Vis

presentaron máximos en las mismas regiones. Por otro lado el espectro IR también revela que no son idénticos. En esta investigación no se profundizó en buscar la diferencia entre las fracciones 2 y 4 debido a que su actividad antioxidante es baja y no son de interés para los objetivos de este trabajo. Se concluye que están compuestas por metabolitos similares.

Se debe tomar en cuenta que las fracciones no estaban del todo puras, esto se puede ver con los cromatogramas obtenidos por medio de HPLC, donde es evidente que hay un compuesto mayoritario en cada fracción pero no es el único. Esto afecta directamente los espectros IR y no se puede afirmar que todos los grupos funcionales detectados en el espectro IR corresponden a una sola molécula. Dado que la fracción de mayor interés es la fracción 3, se construyó una tabla con todos los picos obtenidos y sus respectivas áreas comparando la fracción 3 con las demás. Se encontraron tres picos que son exclusivos de esta fracción, y que podrían ser responsables de la actividad antioxidante. También se obtuvieron los porcentajes relativos de los picos que compartían las demás fracciones con la No.3. Vale la pena estudiar en un futuro aquellos picos que están en poca concentración con respecto a la fracción 3, (Ver cuadro 13).

No se debe de olvidar que en estos procesos de “neutralización” de radicales libres puede existir sinergismo entre metabolitos, y se podría dar el caso que al separar estos compuestos se obtuviera una menor acción antioxidante que cuando están juntos. Fenomeno que vale la pena estudiar en el futuro.

También se realizó tamizaje fitoquímico al extracto alcohólico y al acuoso. Sobresale la presencia de una saponina en ambos, comprobada por el test de la espuma, de la hemólisis y la prueba de Liebermann-Burchard. La cual se recomienda estudiar ya que es un compuesto mayoritario y podría ser útil en otras aplicaciones.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró separar cuatro fracciones con actividad biológica y antioxidante de la planta *P. annulatum*.

- Se obtuvo el extracto acuoso (4.8% rendimiento). En el cual se detectó una saponina como compuesto mayoritario. La actividad antioxidante para este extracto fue 0.059mg de vitamina C/100ml equivalentes a un mg de extracto. No se realizó ensayo de *Artemia salina* para este extracto.
- Se obtuvo el extracto alcohólico (5.8% rendimiento). En el cual se detectó una saponina como compuesto mayoritario. La actividad antioxidante para este extracto fue 0.056mg de vitamina C/100ml equivalentes a un mg de extracto. No se realizó ensayo de *Artemia salina* para este extracto.
- Se obtuvo el extracto etérico (10% rendimiento). En el cual se detectaron flavonoides, alcaloides esteroidales o terpenoides, carotenoides y triterpenos. La actividad antioxidante para este extracto fue 0.377mg de vitamina C/100ml equivalentes a un mg de extracto.
- La fracción 1 del extracto etérico fue la que menor actividad antioxidante presentó (0.0092377mg vit C/100ml). La LD50 determinada con de *Artemia salina* fue 5.50ppm. Y el espectro IR sugiere que es un alqueno.
- La fracción 3 del extracto etérico fue la que mayor actividad antioxidante presentó (0.4055mg vit C/100ml). La LD50 determinada con de *Artemia salina* fue 150.81ppm. Y el espectro IR sugiere que es un alqueno.
- La capacidad antioxidante de la fracción No. 3 no se debe a un polifenol ni a un flavonoide, sino que éste podría ser un alqueno conjugado o un posible aldehído.
- En las fracciones No.2 y No.4 del extracto etérico se encontraron resultados similares. Las actividades antioxidantes fueron 0.0387 y 0.0456mg vit C/100ml, respectivamente. La LD50 determinada con de *Artemia salina* fue 1ppm para ambas fracciones. Y el espectro IR sugiere

presencia de un grupo aromático y un grupo OH en ambas fracciones. El espectro IR también muestra que no son compuestos idénticos.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar los frutos, tallos y austerios de *P. annulatum*.

- Se recomienda tomar en cuenta la localización de la planta en la montaña (frente seco o frente húmedo) y llevar a cabo varias colectas durante el año. Para monitorear como cambia la concentración y variedad de metabolitos según estos factores.
- Se recomienda liofilizar los extractos para obtener extractos fáciles de manejar y poder calcular porcentajes de rendimiento más exactos.
- Se recomienda aislar los tres picos que eran exclusivos de la fracción No. 3 y estudiar su capacidad antioxidante. Así como estudiar el fenómeno de sinergismo de antioxidantes al separar estos picos.
- Se recomienda estudiar la saponina presente en el extracto acuoso y alcohólico ya que es un compuesto mayoritario y podría ser útil en otras aplicaciones.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aukema, Juliann. 2004. *Distribution and dispersal of desert mistletoe is scale-dependent, hierarchically nested. Echography*; 27:2 137-144.

Boxin, Ou, *et al.* 2002. *Analisis of Antioxidant Activities of Common Vegetables employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A comparative Study.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50: 3122-3128.

Cáceres, A. 1999. *Plantas de uso medicinal en Guatemala.* Editorial Universitario. 402p.

CAM; Complementari Alternative Medicine; <http://www.nlm.nih.gov/nccam>; Ultima Modificación 2001.

Domínguez, X; Rojas, P; Ridaura, V; 1971. *Phytochemistry.* 10 ed.

Elango, Narchonbai; Samuel, Shila; Chinnakkannu, Panneerselvam; 2006. *Enzimatic and non-enzimatic antioxidant status in stage (III) human oral squamous cell carcinoma and treated with radical radio therapy: Influence of selenium supplementation . Clinica Chimica Acta; 373(1/2) : 92-98.*

Enriquez, Ana; 2004. *Tamizaje Fotoquímico y evaluación de actividad biocida de hojas, tallos y raíces de Haplophyton cinereum;* Tesis Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 28 págs.

Fidahussein, S; Becker, H; Exner, J; 1983. *Phytochemistry.* 22, 311-312.

Graziano, M. *et al.* 1967. *Phytochemistry.* 6, 1709-1711.

Gonzales, E. *et al.* 2000. *Journal of Ethnopharmacology.* 329-333

Hillestrom, Peter; Covas, Maria; Poulsen, Henrik; 2006; *Effect of dietary virgin olive oil on urinary excretion of etheno-DNA adducts. Free Radical Biology & Medicine*; 41 (7) : 1133-1138.

Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio); Santo Domingo de Heredia, Costa Rica; <http://www.inbio.ac.cr>; Actualizada por: [webmaster](#). Última modificación: 11 de setiembre, 2006.

Jayaprakasha, G. 2006. *Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of Garcinia pedunculata. Innovative Food Science & Emerging Technologies*; 7 (3) : 246-250.

KEW; Royal botanical Garden; <http://www.kew.org/>

Kim ,Dae-OK; Ki, Won Lee; Hyong, Joo Lee y Chang Yong Lee; 2002; *Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of phenolic Phytochemicals Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50(37) 13-3117.

Kuskoski, Marta, *et al.* 2005. *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 25(4): 726-732.

Lakshmi, B, *et al.* 2006. *Antimutagenic activity of methanolic extract of Ganoderma lucidum and its effect on hepatic damage caused by benzopyrene. Journal of Ethnopharmacology*; 107 (2) : 297-303.

McLaghlin, Jerry; Lingling, L; Rogers L; 1998. *The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. Drug Information Journal*. 32: 513-524.

Miquel, Eleonora.2004. *Anioxidant evaluation protocols: Food Quality or health effects. European Food Research and Technology*. 219: 561-571.

Mohan, Iyyapu, *et al.* 2006. *Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by Spirulina in Rats. Cancer Chemotherapy & Pharmacology*; 58 (6) : 802-8086.

Murch, Susan; *A melatonin-rich germplasm line of St Jonhs wort. Journal of Pineal Research*; 41 (3) : 284-287.

Prasad, Lakshmi, *et al.* 2006. *Effect of Gallic acid on renal biochemical alterations in male Wistar rats induced by ferric nitroacetic acid. Human & Experimental Toxicology*; 25 (9) : 523-529.

Pöll, Elfriede. 2006. *Diversidad y Distribucion de Loranthacea s.l (Muerdago) de Guatemala*. Herbario, Instituto de Investigaciones. Universidad del Valle de Guatemala.

Queiroz, A; Melito, I; 2000. *Journal of Ethnopharmacology*. 70. 329-333.

Shoemaker, David; Nibler, Joseph y Garland, Carl; 2003; *Experiments in physical Chemistry*; Septima edición; Mc Graw Hill; U.S.A; 380-385 pp;

Sinha, A. *et al.* 1999. *Journal of Natural Products*. 62, 1036-1038.

SIUC. *College of Science. Parasitic Plant Connection. Loranthaceae*

URL: <http://www.parasiticplants.siu.edu/Loranthaceae/index.html>

Última actualizacion: 07-Sept-06 / dlñ

Solis, Myrna, *et al.* 2005. *An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. Journal of Electroanalytical Chemistry*; 579: 59-66.

Standley, P & A Steyemark. 1946. *Flora of Guatemala*. Chicago Natural History Museum. Volumen 24 Parte IV. 493pp.

Suzen, Sibel. 2006. *Combinatorial Antioxidants Guest Editor. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*; 9 (6) : 407-407, 1p.

Suzen, Sibel. 2006. *Recent Development of melatonin Related Antioxidant Compounds. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*; 9 (6) : 4009-419.

Vaiyapuri, Manju. 2006. *Effect of Ginger on bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. European Journal of Cancer Prevention*; 15 (5): 377-383.

Varela, Beatriz, *et al.* 2004 «Phoradendron liga, Echi used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies » 94 (1) : 109-116.

Vogel, Martin; Karst, Uwe; 2006. *Forensische Analytik "Schon wieder ein weißes Pulver!" Schnelle Analytik von Sprengstoffen auf Peroxidbasis*. Universität Twente Abteilung Analytische Chemie und MESA. Institut für

X. ANEXO

A. Cálculos:

1. Obtención de miligramos equivalentes de vitamina C por miligramo de extracto etérico: A continuación se presenta los cálculos realizados para el extracto etérico. Se procedió de la misma manera para todos los extractos y fracciones.

- Concentración del extracto: Se tomaron 0.02g de extracto y se disolvieron en 1 mL de acetona, de esto se tomo 20µL de extracto.

$$20\mu\text{L} * \frac{1\text{mL}}{1000\mu\text{L}} * \frac{20\text{mgExtracto}}{1\text{mL}} = 0.4\text{mgExtracto}$$

- El medio de reacción era 1mL, entonces la concertación en la reacción era 0.4mg/mL= 40mg/100mL.
- De la ecuación de regresión, dado que la disminución en la absorbancia fue 0.5937UA.

$$\Delta A = 0.0361[C] + 0.0487$$

$$[C] = \frac{\Delta A - 0.0487}{0.0361} = \frac{0.5937 - 0.0487}{0.0361} = 15.0969\text{mg}_{\text{VitC}}/100\text{mL}$$

- Ahora haciendo la corrección de la concertación

$$40 \frac{\text{mgExtracto}}{100 \text{ mL}} = 15.0969 \frac{\text{mgVitC}}{100 \text{ mL}}$$

$$1 \frac{\text{mgExtracto}}{100 \text{ mL}} = 0.377 \frac{\text{mgVitC}}{100 \text{ mL}}$$

$$\Rightarrow \text{Capacidad}_{\text{Antioxidante}} : 0.377 \frac{\text{mgVitC}}{\text{mg}_{\text{Extracto}}}$$

$$0.377 \frac{\text{mgVitC}}{\text{mg}_{\text{Extracto}}} * \left(\frac{2500\text{mg}_{\text{Extracto}}}{25000\text{mg}_{\text{Hojas}}} \right) * \left(\frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \right) * \left(\frac{100\text{g}_{\text{Hojas}}}{100\text{g}_{\text{Hojas}}} \right) = 37700 \frac{\text{mgVitC}}{100\text{g}_{\text{Hojas}}}$$

2. Datos originales de la curva de calibración

Cuadro 14: Datos de la curva de calibración que relaciona la disminución de absorbancia del radical ABTS^{•-} contra la concentración de vitamina C.

Concentración de Vitamina C [mg/100mL]	Absorbancia Después de la Reacción [UA*]	Disminución de Absorbancia [UA*]
ABTS (blanco)	0.6943	0.0366
10	0.2382	0.4195
(Continuación cuadro 14)	114	0.3463
6	0.4326	0.2251
4	0.4463	0.2114
2	0.5322	0.1255

* UA, unidades de Absorbancia

