

DETERMINACION DEL TIPO DE COMPUESTO  
QUE POSEE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
DE LA Virola Koschnyi (Sangre de drago)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

DETERMINACION DEL TIPO DE COMPUESTO  
QUE POSEE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
DE LA Virola Koschnyi (Sangre de Drago)

CLAUDIA LORENA PORRAS JUI


Trabajo de investigación presentado  
para optar al grado académico de

Licenciada en Química

Guatemala


1991

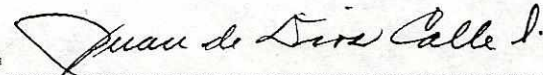
Vo. Bo. :

(f)   
-----  
Ing. Maria Lillian Paiz R.  
Asesora

Tribunal:

(f)   
-----  
Ing. Maria Lillian Paiz R.

(f)   
-----  
Licda. Rebeca Conde Goicolea

(f)   
-----  
Dr. Juan de Dios Calle

Fecha de aprobación: 28 de octubre de 1991

A Maria Lillian Paiz,  
quien hizo de su escuela  
el descubrimiento más  
fascinante y emocionante  
de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que hicieron posible la presente investigación, especialmente a:

- Ing. Maria Lillian Paiz, por su sabio y motivador asesoramiento;
- Licda. Rebeca Conde, por su ayuda incondicional;
- Universidad del Valle de Guatemala;
- Laboratorio Ciudad Vieja, donde se realizó la investigación antimicrobiológica de la Virola Koschnyi;
- Doctora Elfride Pöll, Licda. Margarita Selle, Doctor Juan de Dios Calle y Juan Pablo Pira, por la ayuda que en su oportunidad me brindaron;
- Mi familia.

"Año sumergirme dentro de ese mundo del misterio,  
proporcionándome un entendimiento del poder de la mente;  
y acostumbrarme a los funcionamientos de la misma."

Honorato de Balzac

## RESUMEN

La "Sangre de Drago" (Virola Koschnyi) es utilizada popularmente como remedio casero contra amigdalitis, úlceras y gastritis. El presente trabajo tuvo como objetivos, el estudio de la propiedad antimicrobiana de la corteza y resina de la Virola Koschnyi contra Staphylococcus Aureus ATCC 25923, Streptococcus Pyogenes y Cándida albicans, utilizando la técnica de difusión de disco; investigación fitoquímica de la corteza y resina por métodos fitoquímicos específicos; aislamiento del principio activo de la corteza contra Staphylococcus Aureus ATCC 25923, por métodos cromatográficos; e identificación del mismo por medio de espectroscopia IR, NMR, UV y pruebas fitoquímicas específicas.

Tanto la corteza como la resina mostraron actividad antimicrobiana contra Staphylococcus Aureus, Cándida albicans y Streptococcus Pyogenes. Los metabolitos secundarios más abundantes fueron Flavonoides, Glicosidos cardíacos, saponinas, taninos y otros compuestos oxidables.

El análisis del método de extracción, las pruebas cualitativas y espectroscópicas sugirieron que el principio activo, contra Staphylococcus Aureus, de la corteza de la V. Koschnyi posee un grupo fenólico con cadena alquílica y grupo carbonilo.

## CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.	
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
A. <u>Virola Koschnyi</u>	3
1. Taxonomía	3
2. Descripción	3
3. Usos	4
B. El género <u>Virola</u>	5
1. Interés etnofarmacológico	5
2. Estudios fitoquímicos	7
3. Actividad Biológica	19
D. <u>Staphylococcus Aureus</u>	20
III. OBJETIVOS	23
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL	24
A. Extracción de la <u>V. Koschnyi</u>	24
1. Método 1: Extracción de la resina	24
2. Método 2: Extracción de la corteza	25
B. Métodos de investigación fitoquímica	25
1. Flavonoides y compuestos afines	25
2. Glicósidos cardiotónicos	26
3. Esteroles y saponinas	26
4. Alcaloides	27
5. Taninos y polifenoles	27
6. Quinonas y compuestos relacionados	27

	Páginas
C. Investigación Microbiológica	27
1. Técnica de difusión de disco	27
2. Investigación del método de aislamiento del principio activo	29
3. Determinación del tipo de compuesto activo	30
4. Tratamiento estadístico de los datos de los resultados antimicrobiológicos	30
V. RESULTADOS	31
A. Fitoquímicos	31
B. Microbiológicos	43
C. Aislamiento del principio activo de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	55
VI. DISCUSION	71
VII. CONCLUSIONES	76
VIII. RECOMENDACIONES	78
IX. BIBLIOGRAFIA	79
APENDICES	
A. Test de difusión de disco	83
B. Análisis en TLC de la <u>Virola Koschnyi</u>	87
C. Extracción de alcaloides en plantas con menos del 1% de contenido	102
D. Límites del diámetro de zona de inhibición con discos antimicrobianos para <u>S. aureus</u> ATCC 25923	103

Páginas

E. Análisis de varianza para la actividad  
antimicrobiana de la V. Koshoyi 104

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Presencia de los 1,3-dirilpropanos en las especies <i>Virola</i>	10
2. Presencia de alcaloides en especies de <i>Virola</i>	14
3. Presencia de neolignanós en el género <i>Virola</i>	17
4. Investigación de flavonoides en los extractos crudos de la resina de la <i>V. Koschnyi</i>	33
5. Investigación de glicósidos cardiotónicos en los extractos crudos de la <i>V. Koschnyi</i>	34
6. Investigación de esteróles en la resina de la <i>V. Koschnyi</i>	35
7. Investigación de saponinas en los extractos crudos de la resina de la <i>V. Koschnyi</i>	35
8. Investigación de alcaloides en los extractos crudos de la resina de la <i>V. Koschnyi</i>	36
9. Investigación de quinonas en la resina de la <i>V. Koschnyi</i>	36
10. Investigación de taninos y polifenóles en la resina de la <i>V. Koschnyi</i>	37
11. Investigación de flavonoides en los extractos crudos de la corteza de la <i>V. Koschnyi</i>	37
12. Investigación de glicósidos cardiotónicos de los extractos crudos de la <i>V. Koschnyi</i>	38
13. Determinación de esteróles en los extractos crudos de la corteza de la <i>V. Koschnyi</i>	39
14. Investigación de saponinas en los extractos crudos de la corteza de la <i>V. Koschnyi</i>	
15. Investigación de alcaloides en los extractos crudos de la corteza de la <i>V. Koschnyi</i>	40

	Página
16 Determinación de alcaloides en la fracción alcaloidal de la resina de <u>V. Koschnyi</u> . Análisis en TLC con sistema de elución benceno:cloroformo:etanol 7:3:1	40
17 Investigación de quinonas en la corteza de la <u>V. Koschnyi</u>	41
18 Investigación de taninos y/o polifenoles en los extractos crudos de la corteza de la <u>V. Koschnyi</u>	41
19 Resumen de los principales metabolitos secundarios presentes en la corteza y resina de la <u>V. Koschnyi</u> sugeridos por los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas	42
20 Masa de los extractos crudos de la extracción de la resina por el método 1b. y concentración para las pruebas microbiológicas	43
21 Equivalentes de resina utilizados en las pruebas antimicrobianas de la <u>V. Koschnyi</u>	44
22 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Staphylococcus aureus</u>	45
23 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Cándida albicans</u>	46
24 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Streptococcus pyogenes</u> B hemolítico del grupo A	47
25 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>E. coli</u>	48
26 Masa de los extractos crudos obtenidos de la corteza de la <u>V. Koschnyi</u>	49
27 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la corteza de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	50

	Página
28 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la corteza de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Streptococcus pyogenes</u> B hemolítico del grupo A	51
29 Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la corteza de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Cándida albicans</u>	52
30 Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	54
31 Actividad antimicrobiana de las fracciones de FAS en columna de sílica contra <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	60
32 Actividad antimicrobiana de las fracciones de FAS(11-12) de la <u>V. Koschnyi</u>	61
33 Actividad antimicrobiana de las fracción de la columna FAS(11-12)6 de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	62
34 Comparación de los diámetros de inhibición por algunas fracciones y subfracciones activas de la corteza de la <u>V. Koschnyi</u> contra <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	63
35 Actividad antimicrobiana de los solventes contenidos en los extractos y fracciones de la <u>V. Koschnyi</u>	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Biógenes de flavonoides	9
2 Métodos de síntesis de 1,3 diarilpropanos	10
3 Spiroeliptinas de <i>V.</i> spp	11
4 Estilbenos de <i>V.</i> spp	11
5 Flavonoides de <i>V.</i> spp	12
6 Alcaloides de <i>V.</i> spp	13
7 Esteres de cadena larga de <i>V.</i> spp	15
8 Policetidas de <i>V.</i> spp	16
9 Algunos neolignanós de <i>Virola</i> spp	18
10 Diagrama de flujo del método de aislamiento del principio activo de la <i>V. Koschnyi</i>	65
11 Espectro UV del compuesto activo FAS(11-12)6'2	65
12 Espectro IR en film y ventana de KBr del compuesto activo FAS(11-12)6'2	67
13 Espectro NMR en $CDCl_3$ del compuesto activo FAS(11-12)6'2	68
14 Espectro NMR en $CDCl_3$ del precursor FAS(11-12)6	69
15 Espectro NMR de $CDCl_3$	70

## I. INTRODUCCION

La "sangre de drago" (Virola Koschnyi) es una planta muy utilizada popularmente como remedio casero en las regiones de Cobán, Izabal y El Petén. Los habitantes utilizan la savia y corteza exhaustivamente para la curación de amigdalitis, úlceras y gastritis. En la ciudad de Guatemala, su uso se ha extendido por curanderos y naturistas para los mismos propósitos.

Es interesante reconocer que solamente el propio paciente ha experimentado los efectos de este medicamento vegetal y por lo tanto, es digno de una investigación científica.

El presente trabajo tuvo como propósito principal, contribuir al estudio de una de miles de plantas que son utilizadas por sus propiedades curativas, por medio de la investigación de la propiedad antimicrobiana de la "sangre de drago", hacia algunos microorganismos como el Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes B hemolítico del grupo A y Cándida albicans. Así mismo, la identificación de los principales metabolitos secundarios dentro de la planta de importancia clínica por la posibilidad de reacciones adversas. Llevar a cabo el aislamiento e identificación del tipo de compuesto que le da la propiedad antimicrobiana.

El trabajo consistió en una parte teórica y otra

experimental. La parte teórica involucró una investigación bibliográfica del género *Virola* en cuestión de características, actividad biológica y estudios fitoquímicos preliminares. Esta parte está contenida en la sección de Antecedentes de este trabajo.

El trabajo experimental comprendió métodos fitoquímicos y microbiológicos ya establecidos, así como la investigación del método de aislamiento del compuesto activo y su respectiva caracterización.

## II. ANTECEDENTES

### A. Virola Koschnyi

1. Taxonomía. La Virola Koschnyi (Warrb). o V. merendonis (Pittier) llamada también como sangre de drago (Standley, 1928), sangre, drago o cedrillo (Standley et al., 1981) es una planta que pertenece a la familia Miristicaceae o familia de la Nuez Moscada del orden Laurales.

Existen entre 40 y 65 especies del género Virola distribuidas en el continente americano en bosques húmedos de Centro y Suramérica, siendo abundantes especialmente en la flora del Amazonas (Schultes, 1979). El nombre "sangre" es frecuente en estas regiones debido a que la planta exuda una savia roja de la corteza.

En Guatemala se encuentran tres especies: V. multiflora con hojas pequeñas, entre 1.5 y 3 cms. de largo; V. Koschnyi con hojas más largas, 4.5 y 6.5 cms con nervios laterales de 18 a 35 pares, estrelladas y pubescentes; y V. guatemalensis con hojas de nervios laterales de 14 a 21 pares. (Standley et al., 1981)

2. Descripción. La Virola Koschnyi es un árbol de 35 metros de altura y con 1.25 metros de diámetro en el tronco. Posee ramas densas y estrelladas. Las hojas son elípticas de 13 a 35 cms de largo y entre 4 y 13 cms de ancho, de forma obtusa y cúspida en la base; tienen nervios

laterales de 18 a 35 pares. Se caracteriza por inflorescencia con flores densas; frutas elipsoidales de 2 a 3 cms y corteza en continua exfoliación.

La Virola Koschnyi se encuentra en bosques húmedos a 300 metros sobre el nivel del mar en Alta Verapaz, Izabal, Belice, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. (Standley et al, 1981)

3. Usos. En Centro América, el género Virola tiene poco uso. La madera es de color café pálido, de peso liviano y firme, utilizada generalmente en trabajos de carpintería. En Belice, a la Virola Koschnyi se le conoce con el nombre de "banak", y la madera es exportada a los Estados Unidos para la manufactura de plywood.

Las semillas son ricas en aceite, y en Guatemala se utilizan para la fabricación de jabones y candelas.

A las hojas se les atribuyen propiedades aromáticas, empleándose como saborizantes de bebidas. (Standley et al, 1981)

Según un estudio realizado por el Instituto Indigenista Nacional de Guatemala, en 1978, (Instituto Indigenista Nacional, 1978), la "sangre de drago" es utilizada para la curación de amigdalitis, úlceras, vista cansada y como antiabortivo.

Para la curación de úlceras, en la zona Kekchí, Lanquín de Guatemala, agregan una cucharadita de "sangre de drago" (savia de la corteza) a un vaso de agua. La savia diluida

se bebe durante el tiempo requerido para la curación.  
(Instituto Indigenista Nacional, 1978)

La Doctora Elfride Poll, de la Universidad del Valle de Guatemala, durante una expedición a Rax ruhá en 1989, región en las cercanías de la carretera Transversal del Norte en Cobán, encontró la utilización de la "sangre de drago", *Virola Koschnyi*, para el tratamiento de úlceras, gastritis, amigdalitis y asma por los indígenas del lugar.

Los indígenas le agregan una cucharada de sangre de drago (savia del árbol) a diez tazas de agua hervida, y toman una taza de este preparado en ayunas y antes de cada tiempo de comida. (Poll, comunicación personal)

En Centro América y México existen otras especies llamadas popularmente "sangre de drago", debido a que también exudan una savia de color rojo. Estas son la *Glicirida sepium*, en Costa Rica; *Pterocarpus officinalis* en Guatemala y Nicaragua; y *Croton panamensis* en México.

## B. El género *Virola*

1. Interés Etnofarmacológico. El género *Virola* presenta un interés etnofarmacológico especialmente en Suramérica. El descubrimiento de las propiedades farmacológicas se estima que no es reciente debido a que su utilización se remite a tribus que poseen una transformación cultural o a sociedades en total desintegración.

Entre los usos de mayor importancia se encuentra la fabricación de "snuffs" de varias especies de *Virola* con

efectos alucinógenos, psicoactivos y narcóticos (Schultes, 1979).

Se ha reportado también el uso oral de la *Virola* con propósitos embriagantes (Schultes, 1979) y el uso local como desinfectante, cicatrizante y para el tratamiento de enfermedades de la piel. (Gottlieb, 1979)

El doctor Koch-Grunberg escribió, en 1923, acerca de un "snuff" utilizado por los nativos de la región del Orinoco como fuerte estimulante. Se refirió al "hakudufha", como un "snuff" mágico preparado de la corteza de cierto árbol. La corteza era triturada y colocada en un recipiente con agua hasta evaporación. El sedimento tostado y pulverizado se aspiraba a través de una caña. Por la descripción de Koch-Grunberg, Schultes (Schultes, 1979), indicó que el "snuff" debió haber sido elaborado a partir de una corteza de *Virola*, estableciendo que dicho reporte fue el primero en la literatura del uso narcótico del género *Virola*.

Posteriormente, se realizaron identificaciones botánicas de las plantas e investigaciones de sus usos y forma de preparación.

En Colombia y Brazil, el "snuff" de las especies *V. calophylla* y *V. callophyloidea* es usado en medicina. Entre Venezuela y Brazil, utilizan la resina de la *V. theiodora* también como "snuff", el cual contiene otros aditivos como hojas de *Justicia pectoralis* y cenizas de *Elizabetha princeps*.

En Colombia ingieren directamente la resina de la V. elongata sin preparación alguna para efectos psicoactivos. (Schultes, 1979)

La Virola carinata ha sido utilizada para el tratamiento de descoloración de la piel (Kazuko, 1986); la V. venezulensis o para el tratamiento de reumatismo en Venezuela (Lopes et al, 1982); y otras especies como veneno para flechas de cacería. (MacRae et al, 1984)

## 2. Estudios Fitogquímicos.

a. Flavonoides. La presencia de un alto contenido en flavonoides es característico de las especies de Virola. Los flavanos, que generalmente se encuentran en las resinas coloreadas, junto con sus dímeros oxidativos (biflavonoides) constituyen la composición principal de la sangre roja, "sangre de drago", de este género. Además se han reportado chalconas, isoflavonoides, diarilpropanos y sus derivados.

Del tronco de la V. calophylloidea se aislaron la hidroxidihidrochalcona, (+/-)-, 2'dihidroxi-4,4'-dimetoxidihidrochalcona, [1], el (+/-)-4'-hidroxi-3',7'-dimetoxiflavano [2] y el 1-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-3-(4''-hidroxi-3''-metoxifenil)-propano [3]. (Martínez et al, 1987)

De la V. carinata se reportó la flavonona [4], y en la V. caducifolia se encontraron los isoflavonoides típicos del género Virola, formononetín [5a] y biochanin-A [5b], así

como sus respectivos derivados 2'-hidroxi [5c, 5d] y 2'-metoxi [5e]. Con excepción de biochanin-A, todas estas isoflavonas también se aislaron de la madera de la V. multinervia (Gottlieb, 1979)

La V. multiflora y V. elongata contienen 1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(3,4-metilendioxfenil)-propano (virolano) [6], el derivado oxidativo 1-(1,5-dihidroxi-4-metoxiciclohex-3-en-2-ona)-3-(3,4-metilendioxfenil)-propano (virolaflorina), [7] y tres 2-hidroxi-1,3-diaril-propanos, substituidos en los anillos aromáticos por 2-OH-4-OMe/3,4-OH (virolanol) [8a] 2,4-diOH/3-OMe-4-OH (virolanol B) [8b], 2-OH-4-OMe/3-OMe-4-OH (virolanol C) [8c] además del (2R,3S)-7,3',4'-trihidroxi-flavan-3-ol (fasetinidol) [9]. (Kijjoo et al, 1981).

En el tronco de la V. multinervia se aisló conjuntamente con el virolano y virolanol, el aceite 1-4(4'-hidroxi-2'-metoxifenil)-3-(3''-hidroxi-4''-metoxifenil)-propano, [10], (Braz et al, 1976)

La figura 1 contiene la biogénesis de flavonoides y la figura 2 los métodos de síntesis de los 1,3-diarilpropanos, de importancia para la determinación de la estructura de flavonoides.

Además se han localizado en varias especies de Virola los derivados oxidativos de los flavanos: espiroeliptinas (figura 3) y estilbenos de importancia biosintética.





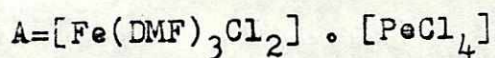
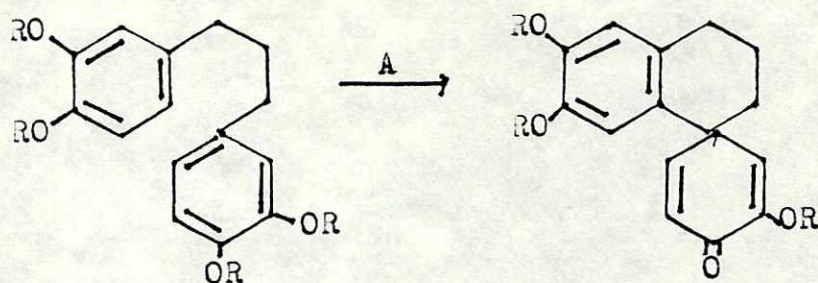


Figura 3. Spiroeliptinas de *V. spp.* (Gottlieb et al, 1979)

En la *V. venosa* se aisló el 3-hidroxi-5-metoxi-E-estilbeno [13a]; en la corteza de la *V. cuspidata* el 3,5,4'-trimetoxi-E-estilbeno [13b] y en la *V. elongata* el 3,5,4'-trimetoxi-trans-estilbeno [14a] y su isómero cis [14b] (MacRae et al, 1985)

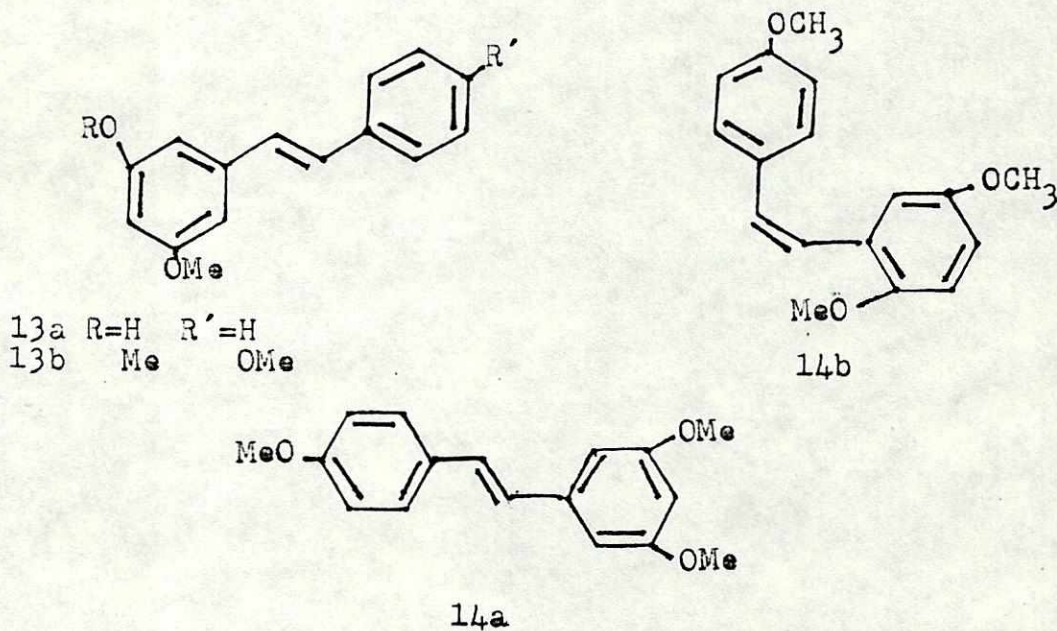
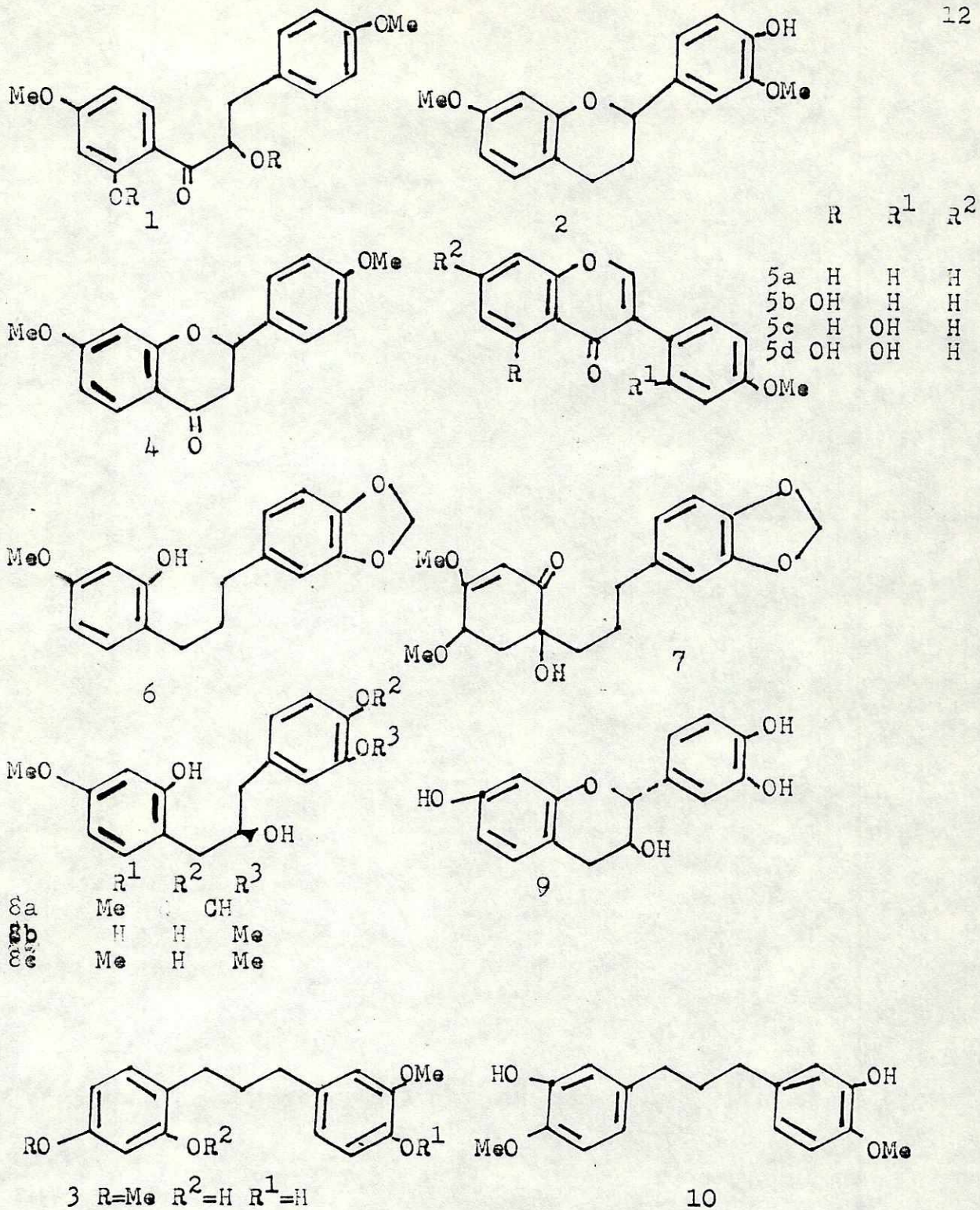
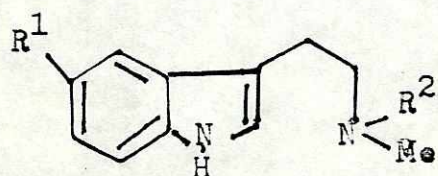


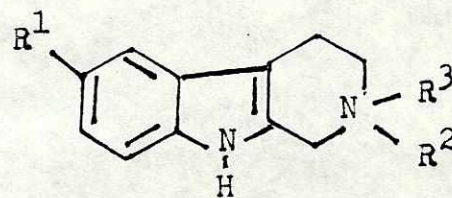
Figura 4. Estilbenos de *V. spp.* (MacRae et al, 1985)

Figura 5. Flavonoides de *V. spp.*

b. Alcaloides. Las especies del género *Virola* han sido estudiadas extensamente respecto de sus constituyentes alcaloidales debido a su amplio uso como agentes halucinógenos. De la *V. theiodora*, *V. elongata* y *V. multinervia* se aislaron como alcaloides mayoritarios: N-metilriptamina [15a], N,N-dimetil [15b], 5-metoxi-N,N-dimetilriptamina [15c], y 6-metoxi-b-carbolinas [16]. (Macrae et al, 1984). La tabla 2 resume los presencia de alcaloides en algunas especies de *Virola*.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
15a	H	H
15b	H	Me
15c	OMe	H
15d	OMe	Me



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Δ
16a	H	H	Me	
16b	OMe	H	Me	
16c	OMe	Me	Me	
16d	OMe	Me	H	1,2
16e	OMe	Me	H	1,2,3,4

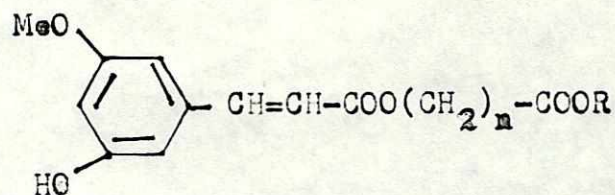
Figura 6. Alcaloides de *V.* spp. (Gottlieb et al, 1979)

TABLA 2

Presencia de alcaloides en especies de *Virola*  
(Gottlieb et al., 1979)

Especies	parte	15a	15b	15c	15d	16a	16b	16c	16d
<u><i>V. theiodora</i></u>	corteza	+	+		+		+		
	raíz		+	+	+				
	hojas		+		+	+			
<u><i>V. calophylla</i></u>	corteza		+		+				
	raíz		+		+				
	hojas	+	+						
<u><i>V. rufula</i></u>	corteza		+	+	+			+	
	raíz		+	+	+			+	
	hojas	+	+						
<u><i>V. multinervia</i></u>	corteza		+						
	raíz		+		+				
	hojas								
<u><i>V. venosa</i></u>	corteza								
	raíz				+				
	hojas			+	+				
<u><i>V. sebifera</i></u>	corteza		+						
<u><i>V. cuspidata</i></u>	hojas							+	+

c. Esteres de cadena larga. El género *Virola* contiene ésteres de n-ácidos grasos y ácidos ω-hidroxi-grasos de β-sitosterol, D-glucosa y ácido ferúlico (cis y trans), β-sitosteril-β-D-glucósido, series de ésteres ácidos C22-C29. Estos compuestos también se presentan como sus diésteres l-monoglicéridos correspondientes y los ácidos ω-hidroxi como los ésteres glucosil correspondientes (Kazuko et al., 1987)



17a R=H n= 27-21

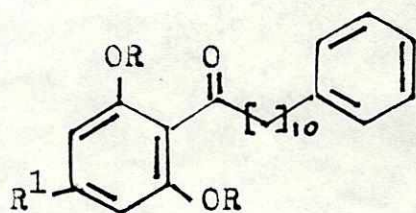
17b H OCH<sub>2</sub>-CH(OH)CH<sub>2</sub>OH  
n= 21, 23-28

Figura 7. Esteres de cadena larga de *V. spp.* (Kazuko et al, 1987)

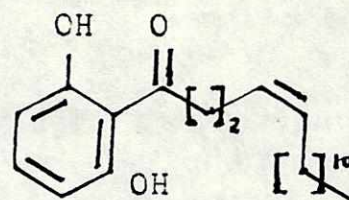
En los frutos de la *V. sebifera* se aislaron los policetidas [17a,18a,19a], así como sus formas de acetato [19b,20,17b,21]. (MacRae et al, 1979)

d. Neolignanos. La actividad fungistática o fungicida de las semillas de la *Dialyantera otoba* fue atribuida a la presencia de (-)-otobaina [23a]. Varios lignanos de estructura similar [24,23] fueron aislados como constituyentes minoritarios de varias especies *Virola*. Otros neolignanos de importancia son la (+)-guaiacina [24a], un principio activo de la *Guaiacum officinale*; galbacina [25a], veranguensina [25b], virolina [26a] y surinamensina [26b], con actividad biológica. (Gottlieb, 1979).

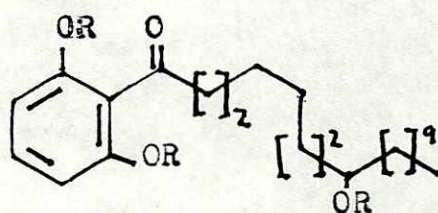
La tabla 3 muestra la presencia de neolignanos en el género *virola*. Los neolignanos corresponden a los tipos benzodioxano, otobaina, eugenol, tetralina, y arilnaftaleno.



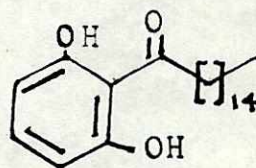
18a  $R=R^1=H$   
 18b  $R=H R=OMe$



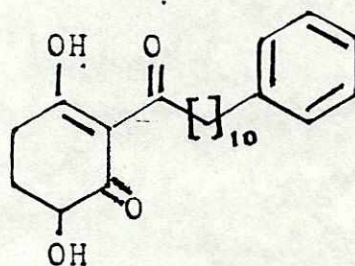
19



20a  $R=H$   
 20b  $R=Ac$



22



21

Figura 8. Policetidas de *V. spp.* (MacRae et al, 1987)

TABLA 3

Presencia de Neolignanós en el género *Virola*

Espece	Compuesto	Referencia
<u><i>V. carinata</i></u>	(+)-guaiacina 24a	
	(-)-isootobafenol 24b	
	(-)-galcatina 24c	(Gottlieb <i>et al.</i> , 1979)
	(-)-carcinatona carinatina	(Kazuko <i>et al.</i> , 1982)
	(-)-cubebina 35a	
	(-)-hinokinina 35b	
	(+)-asarina 34	
	eusiderina 27	(Calvacante <i>et al.</i> , 1985)
	dehidrodieugenol	
	carinatona 33b	
	carinatanol 33a	
	carinatol 33d	(Kazuko <i>et al.</i> , 1982)
	<u><i>V. sebifera</i></u>	hidroxioxootobaina 23c
butirolactona 28		
oxootobaina 29a,b y c		(Lopes <i>et al.</i> , 1983)
tetralonas		(Lopes <i>et al.</i> , 1982)
(-)-hinokinina 35b		(Lopes <i>et al.</i> , 1983)
<u><i>V. surinamensis</i></u>	galbacina 25a	
	(+)-veraguensina 25b	
	virolina 26a	
<u><i>V. calophylloidea</i></u>	surinamensina 26b	(Gottlieb <i>et al.</i> , 1979)
	Ac.dihidroguaiarético 30a	
<u><i>V. calophylla</i></u>	metoxihidroxi- otobaina 23a y 23b	
	metoxiotobaeno 32	(Martínez <i>et al.</i> , 1985)
	arilnaftalenos 31c	
<u><i>V. elongata</i></u>	Ac.dihidroguaiarético 30a	
	Dibencilbutanos 30b y 30c	
	Tetralinas 31a 31b	(Martínez <i>et al.</i> , 1990)
	tetralona	(Martínez <i>et al.</i> , 1988)
	bis-tetra-hidrofuranoepeesartemina	
	sesartemina	
	epiyangambina	
	yangambina	
	dihidrosesartemina	
	B-dihidroyangambina	(Macrae <i>et al.</i> , 1984)
virolanol		
fisetinidol	(Martínez <i>et al.</i> , 1985)	
<u><i>V. guggenheimii</i></u>	eusiderina 27a	
<u><i>V. pavonis</i></u>	eusiderina 27b	
<u><i>V. cuspidata</i></u>	Hidroxioxootobaina 23c	(Gottlieb <i>et al.</i> , 1979)

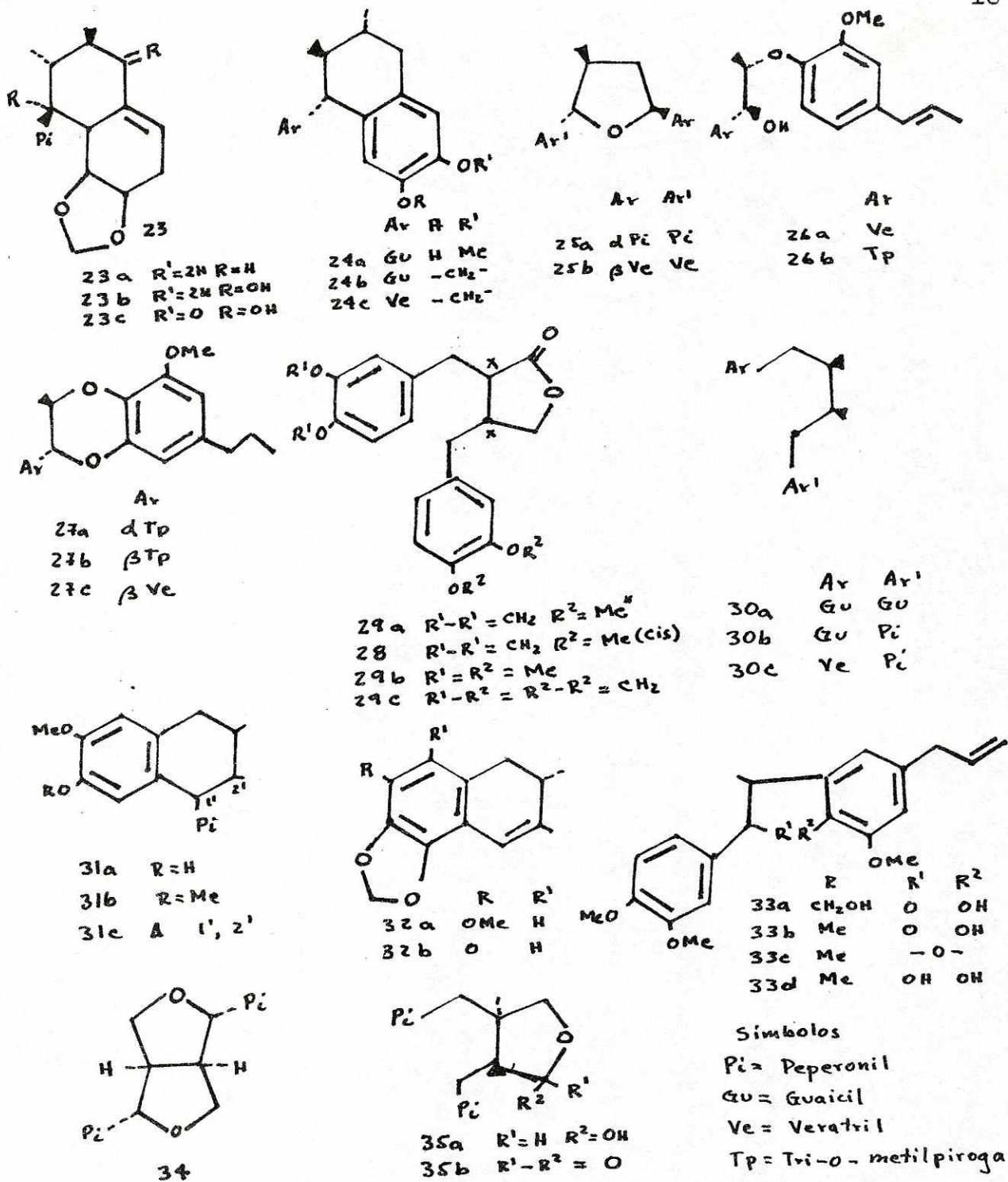


Figura 9. Algunos Neolignanos presentes en *Virola* spp.

3. Actividad Biológica. El interés por la química de las especies del género *Virola* se debe, principalmente, al descubrimiento de sus propiedades medicinales. Los derivados de triptaminas, neolignanos y lignanos han sido aislados como compuestos biológicamente activos.

Las triptaminas *N,N*-dimetiltriptamina y 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina han sido identificadas como los constituyentes primarios alucinógenos de la resina. (MacRae y Towers, 1984)

Los lignanos tienen un amplio campo de actividad biológica. Varios lignanos presentan actividad antimitótica, antiviral, anti-tumor y de inhibición de algunas enzimas. También producen efectos cardiovasculares, alérgicos, actividad antimicrobiana, fungistática y actividad hacia insectos como la inhibición del crecimiento de algunas larvas de mosquitos.

La sesamina, asarina e hinokinina, lignanos presentes en varias especies de *Virola* se han utilizado para aumentar la toxicidad de algunos insecticidas, produciéndose casos de sinergismo.

La nor-isoguaiacina y el ácido dihidroguaiarético han sido reportados como inhibidores del crecimiento de especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y en el caso de la nor-isoguaiacina de la *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antifungi contra *Rhizoctonia solani*, *R. oxysporum*, *Pythium* spp y *Rhizopus nigrens* ha sido

atribuida al ácido nor-dihidroguaiarético y algunos de sus derivados. (MacRae y Towers, 1984)

En una investigación del uso de la resina de la V. elongata como veneno en flechas, se examinó la alteración en el comportamiento de ratas por extractos alcaloidales y no alcaloidales.

La actividad locomotora se vio modificada por el extracto no alcaloidal. La mayoría de su actividad se atribuyó a la presencia de lignanos bis-tetrahidrofuranos, episesartemina, sesartemina, epiyangambina y yangambina. (MacRae y Towers, 1984)

#### D. Staphylococcus Aureus.

Los estafilococos son cocos gram-positivos y ocurren en forma de racimos de uva de tres a cuatro células. Carecen de movimiento, no forman esporas, son catalasa-positivos, y aeróbicos. (Lennette et al, 1980)

Las especies de Staphylococcus son de interés clínico y pueden ser identificados con base en su morfología, producción de coagulasa, hemólisis, resistencia a la novobiocina, actividad fosfatasa, producción aeróbica de ciertos ácidos a partir de ciertos carbohidratos y crecimiento anaeróbico en un medio semisólido de tioglicolato.

El Staphylococcus aureus aislado de especímenes clínicos crece sobre agar, sangre y es usualmente hemolítico. Produce un pigmento dorado-amarillo, da los tests de coagulasa fosfatasa, y producción aeróbica de ácido positivos, crece

en forma anaeróbica en tioglicolato y el promedio del diámetro de la colonia es de 7.8 mm. (Lennette *et al*, 1980)

Las infecciones más comunes producidas por Staphylococcus son las infecciones de la piel producidas por las especies de Staphylococcus aureus. Estas incluyen foliculitis, furúnculos, carbúnculos, celulitis, impétigo, síndrome de piel escaldada e infecciones de heridas post-operativas. Algunos procesos como el envenenamiento de alimentos es producido por enterotoxinas elaboradas por el Staphylococcus aureus.

Entre 1950 y 1960, el S. aureus produjo una mortalidad considerable como patógeno nosocomial de pacientes hospitalizados. El uso de penicilinas semisintéticas ha sido una terapia exitosa de infecciones serias de S. aureus. Sin embargo los S. aureus meticilina-resistente (MRSA) es uno de los mayores problemas clínicos y epidemiológicos en hospitales. La mayoría de los cuales es resistente a varios de los agentes antimicrobianos comunes, como macrólidos, aminoglicósidos, y antibióticos B-lactama. Las infecciones agudas causadas por MRSA se han tratado exitosamente con vancomicina. (Balows *et al*, 1991)

Los agentes antimicrobianos comunes para el S. aureus ATCC 29212, son las penicilinas: penicilina G, oxacilina, nafcilina, meticilina; cefalosporinas: cefalotin, cefazolin; compuestos B-lactamas: imipenem, aztreonam; aminoglicósidos: gentamicina y algunos antibióticos misceláneos como la

clindamicina, eritromicina, vancomicina, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, enoxacin, ofloxacina, sulfisoxazol y trimetoprim. (Ballows, 1991)

En el apéndice D, se encuentra una tabla que contiene los límites de los diámetros de las zonas de inhibición de algunos discos antimicrobianos contra el S. aureus ATCC 25923.

Aún no se ha comprendido del todo el mecanismo de acción de gran parte de los medicamentos antimicrobianos. Sin embargo, se presentan los mecanismos antimicrobianos bajo cuatro postulados diferentes:

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular.
  2. Alteración de la permeabilidad de la membrana celular o en el transporte activo a través de dicha membrana.
  3. Inhibición de la síntesis proteínica (inhibición de la traducción y transcripción del material genético).
  4. Inhibición de la síntesis del ácido nucleico
- (Katzung, 1987)

### III. OBJETIVOS

Los objetivos de la investigación de la "sangre de drago", Virola Koschnyi fueron los siguientes:

A. Determinar la actividad antimicrobiana de la corteza resina de la sangre de drago contra Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes b hemolítico del grupo A, Cándida albicans y E. coli.

1. Realizar una extracción consecutiva por medio de Soxhlet con hexano, benceno, éter sulfúrico, cloroformo y etanol de la resina y corteza y determinar el extracto activo para cada microorganismo.

2. Fraccionar el extracto activo de la corteza por métodos químicos y cromatográficos, a fin de aislar el principio activo.

3. Por medio del método de extracción, pruebas fitoquímicas cualitativas y espectroscopia de IR, UV y NMR; determinar el tipo de compuesto activo

B. Determinar los principales metabolitos secundarios presentes en la resina y corteza por métodos fitoquímicos específicos.

#### IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

La resina (750 ml) y la corteza (3 Kg) fueron colectadas en la finca Mercedes en Telemán, Alta Verapaz; e identificadas por la Dra. en botánica Elfride Pöll, de la Universidad del Valle de Guatemala.

##### A. Extracción de la V. Koschnyi

1. Método Ia: Extracción de la resina para investigación fitoquímica. La investigación fitoquímica de la resina se realizó con 50 ml de resina. Durante la investigación se guardó en refrigeración a -7 C.

A 50 ml de resina se agregaron 50 ml de etanol y con una ampolla de decantación se extrajo con 200 ml de hexano reducidos a 20 ml con rotavapor; 300 ml de benceno reducidos a 50 ml; 700 ml de éter etílico reducidos a 50 ml; 200 ml de cloroformo reducidos a 25 ml (se produjo una mezcla de cloroformo-etanol con el etanol adicionado inicialmente); 400 ml de cloroformo, reducidos a 20 ml y el residuo final se diluyó con 50 ml de etanol.

Al extracto de hexano se le denominó H1a, al de benceno B1a, éter etílico E1a, cloroformo-etanol CE1a, cloroformo C1a y etanol E1a. Los extractos se mantuvieron a temperatura ambiente.

2. Método 1b: Extracción de la resina para pruebas microbiológicas. A 50 ml de resina se les llevó a sequedad sobre un baño de agua. El residuo (22 g) se extrajo en soxhlet durante 48 horas con cada uno de los siguientes solventes: hexano, benceno, éter etílico, cloroformo y etanol. Cada uno de los extractos fue filtrado, evaporado y secado con nitrógeno. Los residuos se diluyeron con 1 ml de su solvente respectivo. Los extractos crudos se denominaron H1b, B1b, E1b, C1b y Et1b.

3. Método de extracción 2: Extracción de la corteza para análisis fitoquímico y microbiológico.

La corteza del tronco del árbol se secó en un horno a 60 C durante 72 horas. La corteza seca (tres kilos) se pulverizó y se extrajo consecutivamente en soxhlet con hexano, benceno, éter sulfúrico, cloroformo y metanol durante 48 horas. Los extractos se concentraron en rotavapor y se secaron con nitrógeno. Se les denominó HC, BC, EC, CC y MeC, respectivamente.

B. Métodos de Investigación fitoquímica

Para la determinación de los metabolitos secundarios principales de la resina y corteza de la *V. Koschnyi*, se utilizaron los métodos de investigación fitoquímica recomendados por Domínguez, 1973.

1. Investigación de flavonoides y compuestos afines:
  - a. Prueba Shinoda A: extracto y 3 gotas de HCl.

- b. Prueba Shinoda B: extracto y 3 gotas de HCL y un trocito de magnesio.
  - c. Prueba Marini-Betolo A: extracto y tres gotas de ácido sulfúrico concentrado.
  - d. Prueba Marini-Betolo B: extracto y cloruro férrico.
  - e. Prueba Dimroth A: extracto y tres gotas de ácido bórico en anhídrido acético.
  - f. Prueba Dimroth B: extracto y ácido bórico, ácido cítrico y acetona.
  - g. Prueba Dimroth C: extracto HCl y ebullición.
  - h. Prueba con Nitrato de Plata.
  - i. Test de Cianidina
2. Glicósidos Cardiotónicos
- a. Prueba de lactonas insaturadas: Sobre un trozo de papel filtro se colocaron tres gotas de extracto de concentrado. El papel se secó en un horno y después se roció con el reactivo de Kedde.
  - b. Prueba de Baljet
  - c. Prueba de Raymond
3. Esteroles y Saponinas:
- a. Prueba de Liebermann-Burchard
  - b. Prueba de Rosenheim
  - c. Prueba de Salkowski

- d. Test de espuma
- e. Prueba de Hemólisis en Agar Sangre
- 4. Alcaloides
  - a. Reactivo de Mayer
  - b. Reactivo de Dragendorff
  - c. Reactivo de Wagner
- 5. Investigación de Taninos y Polifenoles
  - a. Reactivo de cloruro férrico
  - b. Reactivo de gelatina
  - c. Reactivo de sal-gelatina
- 6. Investigación de Quinonas
  - a. Prueba de Borntrager
  - b. Prueba de Borntrager Modificado

#### C. Investigación Microbiológica

1. Técnica de Difusión de disco. Para la determinación antimicrobiana e investigación del principio activo se utilizó la técnica de difusión de disco. El test de difusión de disco es el recomendado por la U.S. Food and Drug Administration y por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) que es una modificación al descrito originalmente por Bauer et al. (Balows et al, 1991)

Se empleó agar Muller-Hinton para el examen contra Staphylococcus aureus ATCC 25923, Cándida albicans y E. coli Base de Agar Sangre y sangre de carnero para el examen contra Streptococcus pyogenes B hemolítico del grupo A.

Con los extractos crudos, fracciones y subfracciones se

sensibilizaron discos de papel filtro blancos de 1/4". A los discos se les dejó evaporar el solvente y se guardaron en cajas petri estériles hasta su utilización.

En la preparación del inóculo, se utilizó en método standard. Las colonias se inocularon en 5 ml de caldo de soya-caseína. El caldo inoculado se incubó a 35 C hasta la aparición de una turbidez. La turbidez se comparó visualmente con la preparación standard de McFarland (0.5 ml de 0.048 M de cloruro de bario a 99.5 ml de 0.36 N de ácido sulfúrico); en caso necesario se ajustó con solución salina (0.85%).

Los discos sensibilizados se colocaron sobre el medio de agar inoculado y después de 24 horas de incubación a 37 C se examinaron los platos y se midieron los diámetros de completa inhibición. Como control se utilizó sulfametoxasol y trimetoprim (STX) (500 ug) de BBL.

-Mueller-Hinton Agar  
Diagnóstica Merck  
Microbiología/ Diagnostico in vitro

-Base de agar Sangre  
Diagnóstica Merck  
Microbiología/Diagnostico in vitro

-Discos Blank de papel filtro 1/4"  
BBL

-Sulfametoxasol-Trimetoprim  
500 mg  
BBL

2. Investigación del método de aislamiento del Principio Activo. El método de aislamiento del principio activo fue determinado por medio del fraccionamiento del extracto crudo que presentó mayor actividad y era el más factible para trabajar respecto de la cantidad de muestra adecuada para un fraccionamiento posterior.

Cada una de las fracciones del extracto crudo fue sometida al examen microbiológico. El procedimiento de fraccionamiento y examen de la porción activa se llevó a cabo sucesivamente hasta el aislamiento del compuesto activo.

El fraccionamiento involucró cromatografía en columna abierta de sílica gel y sephadex; cromatografía en capa fina preparativa y cromatografía en capa delgada de sílica gel.

Especificaciones de los soportes cromatográficos:

- Para cromatografía en columna  
Kieselgel 60  
Korngro e 0.063-0.200 mm  
(70-230 mesh ASTM) (Merck)
- Para cromatografía en capa fina preparativa  
Kieselgel 60 PF(254+366) (Merck)
- Cromatofolios Al de sílica gel 60F254  
DC-Alufolien  
Kieselgel 60 F254  
espesor de capa 0.2 mm (Merck)

-LH 20-100  
Sephadex Lipophilic  
Bead Size 25-100 u. Para filtración en gel.  
Sigma Chemical Company

El análisis cromatográfico se realizó con lámparas de luz ultravioleta de 366 y 254 nm.

-Model UVL-53 UV-366 nm  
-Model UVL-58 UV-254 (Mineralight, UVP Inc.)

3. Determinación del tipo de compuesto activo. El tipo de compuesto activo se determinó por medio de espectroscopia de NMR, UV e IR, pruebas cualitativas específicas y análisis del método de extracción.

-Lambda 5  
UV/VIS Spectrophotometer  
Perkin Elmer  
  
-Infrared Spectrophotometer 735B.  
Perkin Elmer  
  
-EM-360L NMR  
Spectrometer System  
Varian, Instrument Division

4. Tratamiento estadístico de los datos de los resultados antimicrobiológicos. El análisis estadístico de la actividad antimicrobiana involucró la determinación de diferencia de medias de los diámetros de las zonas de inhibición por análisis de varianza (ANDEVA) de una vía. Los bioensayos se realizaron en triplicado de discos dentro de una caja inoculada y en triplicado de cajas inoculadas.

## V. RESULTADOS

### A. Resultados de la investigación fitoquímica

En las tablas siguientes se encuentran los resultados de los métodos de investigación fitoquímica. Es de interés la formación de soluciones coloreadas que son características de algunos metabolitos.

En la prueba de Marini-Bettolo A, la coloración naranja de los extractos H1a, B1a, HC y CC indicó la presencia de flavononas; la coloración amarilla de BC, CC y MeC de flavonas y flavonoles y la coloración guinda de MeC y E1a de chalconas.

En la prueba de Marini-Bettolo B, la solución verde-amarillo de B1a, E1a y MeC fue propia de derivados del catecol. La reacción con nitrato de plata indicó presencia de flavonoides con dos hidroxilos.

La presencia de Leucoantocianinas se evidenció con la coloración violeta que cambió a rojo fuerte en el test de cianidina para la resina.

Los glicósidos cardiotónicos y lactonas insaturadas se encontraron en los extractos E1a, E1a, MeC y EC.

Las pruebas de alcaloides no fueron positivas; sin embargo la reserpina, alcaloide indólico tampoco dio resultado positivo con los reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner.

Se preparó un extracto de la resina para su análisis

en TLC, con un método para plantas que contienen alcaloides en menos de 1%. (Apendice C)

Los 5 ml de extracto se analizaron en TLC de silica gel (.2 mm) con un sistema de solventes benceno:cloroformo:etanol (7:3:1) y se revelaron con el reactivo de Yodoplatinato (apéndice C). Se obtuvieron manchas blancas con valores Rf de 0.78, 0.44 y 0.26.

La formación de espuma fue una de las características típicas de la resina y corteza de la V. Koschnyi. El test de hemólisis fue positivo para los extractos Et1a, Et1b y MeC. Estas observaciones podrian dar como resultado la presencia de saponinas en la especie.

Otra característica fue la presencia de polifenoles y taninos del tipo catecol y pirogalol debido a la formación de un precipitado negro-azul en los extractos Et1a y MeC y en la resina, con los reactivos correspondientes.

En los dos extractos anteriores y en la resina se observó la formación de un precipitado oxidable de color rosado, el cual fue soluble en metanol y dio las pruebas de taninos y polifenoles positivas.

Los resultados se presentan en las tablas siguientes, se indica la cantidad de extracto, las pruebas fitoquímicas y los resultados. Un signo menos, (-), indicó resultado negativo y un signo más, (+), resultado positivo.

TABLA 4

Investigación de flavonoides en los extractos crudos de la resina de la *V. Koschnyi*. (0.1 ml de extracto)

Extractos	Resultados de Pruebas									
	ShA	ShB	MBA	MBB	DA	DB	DC	NP	C	
H1a	+	-	+	-	-	-	-	-		
B1a	+	-	+	-	-	-	-	-		
E1a	+	+	+	+	+	-	-	-		
C1a	-	-	-	-	-	-	-	-		
CE1a	-	+	-	-	-	-	-	-		
Et1a	+	+	+	+	-	-	-	+	+	

ShA=Shinoda A    MBA=Marini-Bettolo A    DA=Dimroth A    DC=Dimroth C  
 ShB=Shinoda B    MBB=Marini-Bettolo B    DB=Dimroth B  
 NP= Nitrato de Plata    C=Cianidina

TABLA 5

Investigación de Glicósidos cardiotónicos de los extractos  
 crudos de la resina de la V. Koschnyi (2 ml de extracto)

Extracto	Resultados		
	LI	Ba	Ray
H1a	-	-	-
B1a	-	-	-
E1a	+	+	-
C1a	-	-	-
CE1a	+	-	-
Et1a	+	+	+

LI=Lactomas Insaturadas Ba=Bal Jet Ra=Raymond

TABLA 6

Investigación de Esteroles en la resina de la V. Koschnyi  
(0.5 gramos de resina seca)

Prueba	Resultados
Liebermann-Burchard	-
Rosenheim	-
Salkowsky	-

TABLA 7

Investigación de Saponinas en los extractos crudos de la  
resina de la V. Koschnyi (0.3 ml para el test de hemólisis y  
5 ml de extracto crudo)

Extracto	Test de Espuma	Prueba de Hemólisis
H1a	-	-
B1a	-	-
E1a	-	-
C1a	-	-
CE1a	-	-
Et1a	+	+

TABLA 8

Investigación de alcaloides en los extractos crudos de la resina de la V. Koschbyi (1 g de residuo evaporado)

Extracto o Control	Pruebas			
	Dragendorff	Mayer	Wagner	Yodoplatinato
H1a	-	-	-	-
B1a	-	-	-	-
E1a	-	-	-	-
C1a	-	-	-	-
Et1a	-	-	-	-
Reserpina	-	-	-	-
Papaverina	+	+	+	+

TABLA 9

Investigación de Quinonas en la resina de la V. Koschnyi (0.5 gramos de resina seca)

Prueba	Resultados
Borntrager	-
Borntrager Modificado	-

TABLA 10

Investigación de Taninos y polifenoles en la resina de la V. Koschnyi (0.5 gramos de resina seca)

Prueba	Resultados
Reactivo de gelatina	+
Reactivo de sal-gelatina	+
Cloruro férrico	+

TABLA 11

Investigación de flavonoides en los extractos crudos de la corteza de la V. Koschnyi. (0.1 ml de extracto 0.2g/ml)

Extractos	Resultados de Pruebas									
	SHA	SHB	MBA	MBB	DA	DB	DC	NP	C	
HC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
BC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
EC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
CC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
MeC	-	+	+	+	-	-	-	-	+	

SHA=Shinoda A    MBA=Marini-Bettolo A    DA=Dimroth A    DC=Dimroth C  
 SHB=Shinoda B    MBB=Marini-Bettolo B    DB=Dimroth B  
 NP= Nitrato de Plata    C=Cianidina

TABLA 12

Investigación de Glicósidos cardiotónicos de los extractos  
 crudos de la corteza de la V. Koschnyi (2 ml de extracto de  
 0.2g/ml)

Extracto	Resultados		
	LI	Ba	Ray
HC	-	-	-
BC	-	-	-
EC	+	+	-
CC	-	-	-
MeC	+	+	+

LI=Lactonas Insaturadas Ba=Baijet. Ra=Raymond

TABLA 13

Determinación de esteroides en los extractos crudos de la corteza de la V. Koschnyi (0.1g/5 ml de extracto)

Extracto	Resultados		
	LB	Ros	Salk
HC	+	-	+
BC	+	-	+
EC	-	-	+
CC	+	-	+
MeC	-	-	-

LB=Liberman Burchard Ros=Rosenheim Salk=Salkowski

TABLA 14

Investigación de Saponinas en los extractos crudos de la corteza de la V. Koschnyi (0.3 ml para el test de hemólisis y 5 ml de extracto crudo/ 0.2g/ml)

Extracto	Test de Espuma	Prueba de Hemólisis
HC	-	-
BC	-	-
EC	-	-
CC	-	-
MeC	+	+

TABLA 15

Investigación de alcaloides en los extractos crudos de la corteza de la V. Koschyi (1 g de residuo evaporado)

Extracto o Control	Pruebas			
	Dragendorff	Mayer	Wagner	Yodoplatinato
HC	-	-	-	-
BC	-	-	-	-
EC	-	-	-	-
CC	-	-	-	-
MeC	-	-	-	-
Reserpina	-	-	-	-
Papaverina	+	+	+	+

TABLA 16

Determinación de alcaloides en la fracción alcaloidal de la resina de V. Koschnyi. Análisis en TLC con sistema de elución benceno:cloroformo:etanol 7:3:1

Extracto	Agentes reveladores						
	D	DM	W	WM	M	MM	IP
Extracto alcaloidal	-	-	-	-	-	-	+

D=Dragendorff    DM=Dragendorff Modificado  
 W=Wagner        WM=Wagner Modificado  
 M=Mayer          MM=Marquis  
 IP=yodoplatinato

TABLA 17

Investigación de Quinonas en la corteza de la V. Koschnyi  
(0.5 gramos de extracto)

Extracto	Borntrager	Borntrager Modificado
HC	-	-
BC	-	-
EC	-	-
CC	-	-
MeC	-	-

TABLA 18

Investigación de taninos y/o polifenoles en los extractos  
crudos de la corteza de V. Koschnyi. (5 mL de 0.2g/ml)

Extracto	Resultados		
	Gelatina	Sal-gel	FeCl3
HC	-	-	-
BC	-	-	+
EC	-	-	+
CC	+	-	+
MeC	+	+	+

TABLA 19

Resumen de los principales metabolitos secundarios presentes en la corteza y resina de la V. Koschnyi. Sugeridos por los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas.

Metabolito	Resina	Corteza
Flavonoides	+	+
Glicosidos cardiotónicos	+	+
Esteroles	-	+
Saponinas	+	+
Alcaloides	+	-----
Quinonas	-	-
Taninos	+	+

B. Resultados de la investigación antimicrobiana

1. Actividad antimicrobiana de la resina de la V. Koschnyi. La tabla 20 muestra los datos de los extractos crudos obtenidos de 22 gramos de resina seca con el método de extracción lb, la concentración para las pruebas microbiológicas y el porcentaje de rendimiento. Con excepción de Et1b, el contenido total de cada extracto se diluyó con un mililitro de solvente, a fin de relacionar la actividad con respecto a los equivalentes de resina.

TABLA 20

Masa de los extractos crudos de la extracción de la resina por el método lb. y concentración para las pruebas microbiológicas.

Extracto	masa (g) (+/- 0.0001 g)	C (g/ml)	%
H1b	0.0197	0.0197	0.09
B1b	0.0099	0.0099	0.05
E1b	0.0498	0.0498	0.22
Ea1b	0.1022	0.1022	0.40
C1b	0.0105	0.0105	0.04
Et1b	17.5282	0.0336	47.85

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo en triplicado de cajas inoculadas. Cada caja contenía tres discos sensibilizados con 20, 40 y 80 microlitros de cada uno

de los extractos.

Los resultados presentados en las tablas 22, 23 y 24 indicaron actividad antimicrobiana contra estafilococo, estreptococo y cándida. Los extractos activos fueron E1b contra los tres microorganismos anteriores; Et1b contra estafilococo y cándida; Ea1b contra estafilococo y en menor escala, H1b contra cándida.

La tabla 21 contiene los equivalentes de resina de discos sensibilizados para las pruebas microbiológicas.

TABLA 21

Equivalentes de resina utilizados en las pruebas antimicrobianas de la V. Koschnyi.

Extracto	Volumen (+/- 1 ul)	Equivalentes
H1b	50	1.1
	80	1.76
B1b	50	1.1
	80	1.76
E1b	50	1.1
	80	1.76
Ea1b	50	1.1
	80	1.76
C1b	50	1.1
	80	1.76
Et1b	50	0.0035
	80	0.0056

TABLA 22

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la *V. Koschnyi* contra *Staphylococcus Aureus* (50 y 80 ul de extracto crudo)

Extracto o Control	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
		1	2	3
H1b	985	-	-	-
	1576	-	-	-
B1b	495	-	-	-
	792	-	-	-
E1b	2490	7.0	7.0	7.0
	3984	12.0	12.5	12.0
Ea1b	5110	14.0	14.5	14.0
	8176	15.0	15.0	15.0
C1b	630	-	-	-
	840	-	-	-
Et1b	1680	13.0	13.0	13.0
	2688	14.0	14.0	14.0
SXT	500	25.0	25.0	25.0

TABLA 23

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la V. Koschnyi contra Cándida Albicans (50 y 80 ul de extracto )

Extracto o Control	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
		1	2	3
H1b	985	7.0	7.0	7.0
	1576	7.0	7.0	7.0
B1b	495	-	-	-
	792	-	-	-
E1b	2490	11.0	11.0	11.0
	3984	16.0	16.0	16.0
C1b	630	-	-	-
	840	-	-	-
Et1b	1680	8.0	8.0	8.0
	2688	10.0	10.0	10.0
SXT	500	30.0	30.0	30.0

TABLA 24

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la V. Koschnyi contra Streptococcus pyogenes B hemolítico del grupo A. (50 ul de extracto)

Extracto o Control	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
		1	2	3
H1b	985	-	-	-
B1b	495	-	-	-
E1b	2490	21.0	21.0	21.0
Ea1b	5110	-	-	-
C1b	630	-	-	-
Et1b	1680	-	-	-

TABLA 25

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la resina de la *V. Koschnyi* contra *E. coli* (50 y 80 ul de extracto)

Extracto o Control	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
		1	2	3
H1b	985	-	-	-
	1576	-	-	-
B1b	495	-	-	-
	792	-	-	-
E1b	2490	-	-	-
	3984	-	-	-
C1b	630	-	-	-
	840	-	-	-
Et1b	1680	-	-	-
	2688	-	-	-

## 2. Investigación antimicrobiana de la corteza de la *V.*

*Koschnyi* La tabla 25 contiene los datos de los extractos crudos obtenidos de 2 kg de corteza y la concentración a la que fueron preparados para las pruebas antimicrobianas.

TABLA 26

Masa de los extractos crudos obtenidos de la corteza de la *V.* *Koschnyi* (2 kg) y la concentración para la actividad antimicrobiana.

Extracto	masa (g) (+/- 0.0001 g)	Concentración (g/ml)
HC	8.26	0.05
BC	4.06	0.05
EC	6.83	0.05
CC	3.14	0.05
MeC	107.00	0.05

Los resultados de las tablas 27, 28 y 29 determinaron la cantidad (microgramos) de extracto que produjo el mayor diámetro de inhibición. Los bioensayos se hicieron en triplicado de cajas inoculadas. En cada caja inoculada se colocaron tres discos sensibilizados con cada extracto. Cada uno de los discos contenía 1000, 2000 y 4000 microgramos, respectivamente.

El análisis de varianza simple (apéndice E) estableció que existió diferencia significativa entre las medias de inhibición de 1000, 2000 y 4000 microgramos para cada extracto activo. Estableciéndose la cantidad de 4000 microgramos de extracto activo para pruebas antimicrobianas posteriores.

TABLA 27

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la corteza de la *V. Koschnyi* contra *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923

Extracto o Control	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
		1	2	3
HC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	-	-	-
BC	1000	7.0	7.0	7.3
	2000	8.0	8.0	8.0
	4000	10.0	10.0	10.5
EC	1000	9.0	9.0	9.0
	2000	12.0	12.0	12.5
	4000	15.0	15.0	15.3
CC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	-	-	-
MeC	1000	11.5	11.5	11.5
	2000	13.0	13.0	13.0
	4000	15.0	15.0	15.0
SXT	500	24.0	24.0	24.0

TABLA 28

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la corteza de la *V. Koschnyi* contra *Streptococcus pyogenes* B hemolítico del grupo A

Extracto o Control	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (Caja inoculada)		
		1	2	3
HC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	-	-	-
BC	1000	7.0	7.0	7.0
	2000	8.0	8.0	8.0
	4000	10.0	10.0	10.0
EC	1000	9.0	9.0	9.0
	2000	12.0	12.0	12.0
	4000	15.0	15.0	15.0
CC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	-	-	-
MeC	1000	11.5	11.3	11.5
	2000	13.0	13.0	13.5
	4000	15.0	15.0	15.5
SXT	500	25.0	25.0	25.5

TABLA. 29

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la corteza de la V. Koschnyi contra Cándida albicans

Extracto o Control	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (Caja inoculada)		
		1	2	3
HC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	-	-	-
BC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	-	-	-
EC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	8.0	8.0	8.0
CC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	-	-	-
MeC	1000	-	-	-
	2000	-	-	-
	4000	7.5	7.5	7.5
SXT	500	30.0	29.5	30.0

Los resultados de las pruebas microbiológicas (tablas 27, 28 y 29) fueron de actividad contra Staphylococcus aureus ATCC 25923, por los extractos MeC y EC; actividad contra Streptococcus pyogenes B hemolítico del grupo A por MeC, EC y BC y contra Cándida albicans por EC y MeC.

El rendimiento alto (5.35%) que se obtuvo con el extracto MeC, en comparación con los otros extractos y la actividad antimicrobiana contra el estafilococo (15 mm), fueron los factores que interesaron el aislamiento del compuesto activo de este extracto.

La tabla 30 contiene los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de 4000 microgramos de MeC en triplicado de discos y de cajas inoculadas. El análisis estadístico (apéndice E) indicó que no existió diferencia significativa entre las medias de cada caja inoculada.

Las pruebas subsiguientes se realizaron en triplicado de cajas inoculadas.

TABLA 30

Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de la *V. Koschnyi* contra *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 (contenido del disco= 4000 g)

Extracto o Control	Disco	Diámetro de zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
		1	2	3
HC	a	-	-	-
	b	-	-	-
	c	-	-	-
BC	a	10.0	10.0	10.0
	b	11.0	11.0	11.0
	c	10.0	10.0	10.0
EC	a	15.3	15.3	15.5
	b	15.5	15.5	15.5
	c	15.0	15.0	15.0
CC	a	-	-	-
	b	-	-	-
	c	-	-	-
MeC	a	15.0	15.0	15.0
	b	15.5	15.5	15.0
	c	15.0	15.0	15.0
SXT	a	24.0	24.0	24.0
	b	24.5	24.5	24.5
	c	24.0	24.0	24.0

3. Aislamiento del Principio activo de la V. Koschnyi  
contra Staphylococcus aureus ATCC 25923. El extracto MeC (100 g) se evaporó en rotavapor y se disolvió en 1000 mlilitros de agua destilada. Un sólido oxidable de color rosado fue insoluble y se filtró al vacío. Este sólido se le llamó T, no presentó actividad antimicrobiana y las pruebas cualitativas para taninos y compuestos fenólicos dieron positivas.

El filtrado (activo) se redujo a 500 ml y se le agregaron 500 ml de etanol. A esta solución se le precipitaron los flavonoides y compuestos afines con un exceso de acetato de plomo (10%). El precipitado de sales de plomo se filtró al vacío y se descompuso con ácido sulfhídrico, generado con ácido clorhídrico y sulfuro de hierro. A este extracto, rico en flavonoides, se le denominó F. Los resultados de los bioensayos fueron de actividad exclusiva de F.

El extracto F se fraccionó en tiras de papel filtro de 3X30 cms (Whatman No. 42), utilizando agua como fase móvil. Se observaron tres bandas a lo largo de la tira, de las cuales la banda del extremo superior (FS) presentó actividad. FS se dividió por cromatografía en columna de Sephadex (25-100u) con metanol como eluyente. Se colectaron ocho fracciones (f1, f2, ... f8).

Las fracciones f1 a f8 se analizaron por cromatografía en capa fina de sílica gel (.2 mm de espesor). El sistema de

solvente fue la capa orgánica superior de la mezcla n-butanol, ácido acético y agua (8:8:2) (SAT), y el reactivo de sal B Fast Blue (FBS) se utilizó como revelador. (cromatogramas en apéndice B).

Con el análisis de cromatografía se unieron las fracciones 1 y 2, originándose la fracción FA, activa (18 mm de inhibición); 3 y 4, FB y las fracciones restantes FC.

La fracción FA, se aisló en capa preparativa de sílica gel, fase móvil SAT y agente cromógeno FBS. (ver apéndice B).

Fue interesante notar que la solución FA poseía una fluorescencia azul (UV 366 nm) que cambió casi inmediatamente a verde. La posibilidad de la presencia de compuestos oxidables, limitó la libertad del manejo de muestras y se tomó especial cuidado en mantenerlas alejadas de la luz y del aire, cubriéndolas con papel de aluminio y no llevándolas a sequedad.

El fraccionamiento de FA (0.8206 g) se llevó a cabo en columna de sílica (0.063-0.2 mm) eluyendo con cloroformo-etanol 50:50 y colectando fracciones, según las bandas detectadas con UV 366 nm. Las fracciones se identificaron como FAS-1, FAS-2, ..FAS-13.

Para la prueba microbiológica, las fracciones se redujeron a 4 ml. Los discos se sensibilizaron con 80 ul de estas fracciones. La tabla 30 contiene los resultados de estas pruebas, atribuyéndose la actividad a las fracciones

FAS-11 y FAS-12 con 20 y 30 mm de diámetro de inhibición respectivamente.

El análisis en TLC de sílica, con cloroformo como fase móvil y UV 366 nm sugirió la unión de las fracciones, dando origen a la subfracción FAS-(11-12) activa. FAS(11-12) se hizo la cromatografía en columna de sílica con cloroformo-etanol (1000-50). De este proceso y con base en la observación con UV 366 nm, se obtuvieron las fracciones FAS-(11-12)1, ...FAS-(11-12)9. El volumen de las nuevas subfracciones se redujo a 4 ml y la prueba antimicrobiana se llevó a cabo con 80  $\mu$ l.

De estas subfracciones FAS-(11,12)3 y FAS-(11-12)6 fueron activas (15 y 20 mm de inhibición respectivamente). El análisis en TLC mostró diferencia en el contenido de las fracciones además de que los intermediarios no presentaron actividad. Se procedió al aislamiento del principio activo en FAS-(11,12)6. Este aislamiento se realizó en cromatografía de capa preparativa de sílica gel con cloroformo-etanol (1000:50).

El resultado fue la división de FAS-(11-12)6 en FAS-(11-12)6'1, ...FAS-(11-12)6'4. La actividad se atribuyó a FAS-(11-12)6'2 (15 mm de inhibición) compuesto, que se terminó de aislar en cromatografía de capa preparativa de sílica gel.

El compuesto activo,  $R_f=0.52$  se observó como una mancha café con UV 366 y 254 nm en cloroformo-etanol (100:50), el reactivo de sal Fast Blue reveló una mancha roja; la intensidad del compuesto activo con UV 366 nm aumentó

considerablemente al ser asperjado con tricloruro de aluminio al 1 % en etanol; y al ser expuesto con vapores de amoníaco tomó una tonalidad oscura.

El espectro UV (figura 11) de 200 a 350 nm de FAS-(11,12)6'2 mostró dos máximos de 284.7 y 291.7 nm a una concentración de 13 ug/ml.

El espectro IR (figura 12) en film mostró absorbancias a  $\nu^{KBr} = 3350, 2853, 2800, 1730, 1440$  y  $1030 \text{ cm}^{-1}$ .

En espectroscopía de NMR, se obtuvo el espectro en cloroformo deuterado del compuesto activo FAS-(11,12)6'2 y de su precursor FAS-(11,12)6. El compuesto activo (0.9 mg) presentó absorción a  $\tau = 0.8, 1.25$  y  $1.6$  y el precursor FAS-(11,12)6 presentó absorción a  $0.8, 1.25$  y  $1.6$ .

La tabla 33 contiene los resultados de la comparación de las actividades de fracciones y subfracciones a una concentración de disco fija. La sensibilización no pudo llevarse a cabo con 4000 microgramos de extracto debido al rendimiento relativamente bajo de extractos y compuestos activos.

TABLA 31

Actividad antimicrobiana de las fracciones de FAS en columna de sílica contra Staphylococcus Aureus ATCC 25923

Fracción o control	Diámetro de la zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
	1	2	3
FAS-1	-	-	-
FAS-2	-	-	-
FAS-3	-	-	-
FAS-4	-	-	-
FAS-5	-	-	-
FAS-6	-	-	-
FAS-7	-	-	-
FAS-8	-	-	-
FAS-9	-	-	-
FAS-10	-	-	-
FAS-11	30.0	30.0	30.0
FAS-12	25.0	25.0	25.0
FAS-13	-	-	-
SXT	25.0	25.0	25.5

TABLA 32

Actividad antimicrobiana de las fracciones de FAS-(11,12)  
de la V. Koschnyi contra Staphylococcus Aureus  
ATCC 25923

Extracto o control	Diámetro de Zona de Inhibición (mm) (caja inoculada)		
	1	2	3
FAS-(11,12)1	-	-	-
FAS-(11,12)2	-	-	-
FAS-(11,12)3	15.0	15.0	15.0
FAS-(11,12)4	-	-	-
FAS-(11,12)5	-	-	-
FAS-(11,12)6	20.0	20.0	20.0
FAS-(11,12)7	-	-	-
SXT	25.0	25.0	25.0

TABLA 33

Actividad antimicrobiana de las fracciones de la columna FAS-(11,12)6 de la *V. Koschnyi* contra *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923

Extracto o control	Diámetro de Zona de Inhibición (mm) (caja inoculada)		
	1	2	3
FAS-(11,12)6'1	-	-	-
FAS-(11,12)6'2	20.0	20.0	20.5
FAS-(11,12)6'3	-	-	-
FAS-(11,12)6'4	-	-	-
SXT	25.0	25.5	25.0

TABLA 34

Comparación de los diámetros de inhibición por algunas fracciones y subfracciones activas de la corteza de la V. Koschnyi contra Staphylococcus aureus ATTC 25923

Fracción	Contenido de disco ug	Diámetro de zona de inhibición (mm) (caja inoculada)		
		1	2	3
FAS	3000	15.5	15.5	15.5
FAS(11-12)	3000	18.3	18.3	18.4
FAS(11-12)6'2	3000	12.0	12.5	12.0
SXT	500	25.0	25.0	25.0

TABLA 34

Actividad antimicrobiana de los solventes contenidos en los Extractos y fracciones de la *V. Koschovi*

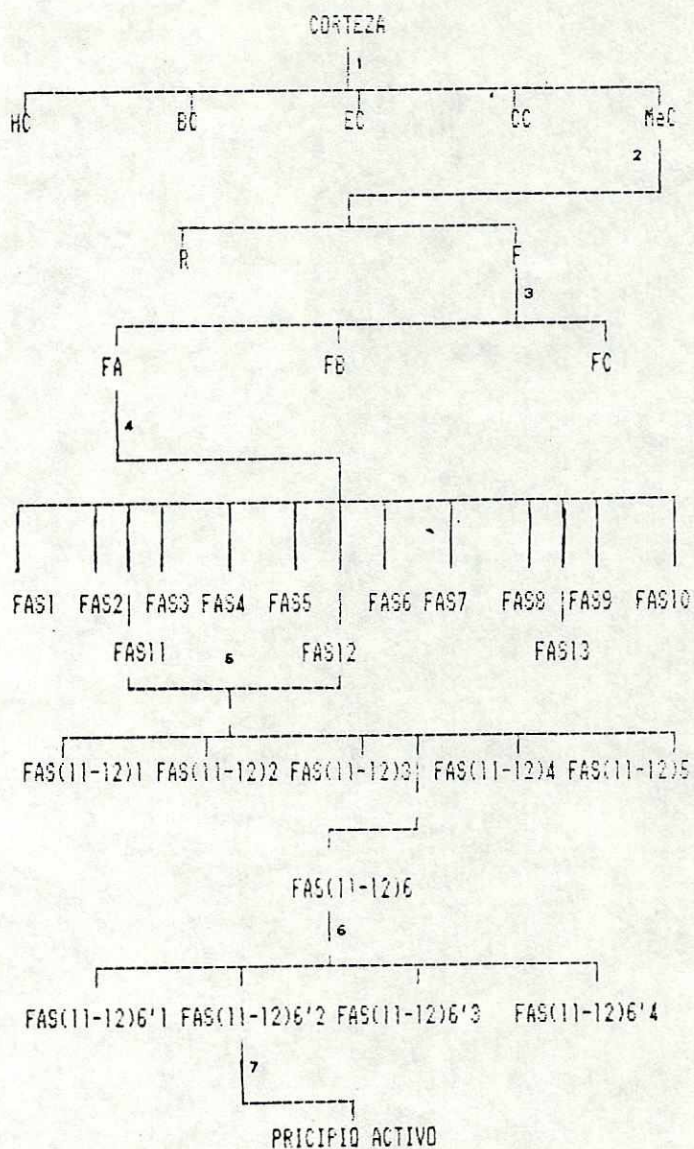
EXTRACTO	ul	MICROORGANISMO											
		<i>S. aureus</i>			<i>C. albicans</i>			<i>S. Pyogenes</i>			<i>E. Coli</i>		
		diametro de inhibicion (mm)											
(REPLICAS)													
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HEXANO	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BENCENO	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETER ETILICO	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLORO- FORMO	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETANOL	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
METANOL	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SXT		25	25	25	26	26	26						

*S. aureus* = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*S. pyogenes* = *Streptococcus pyogenes* B hemolitico del grupo A

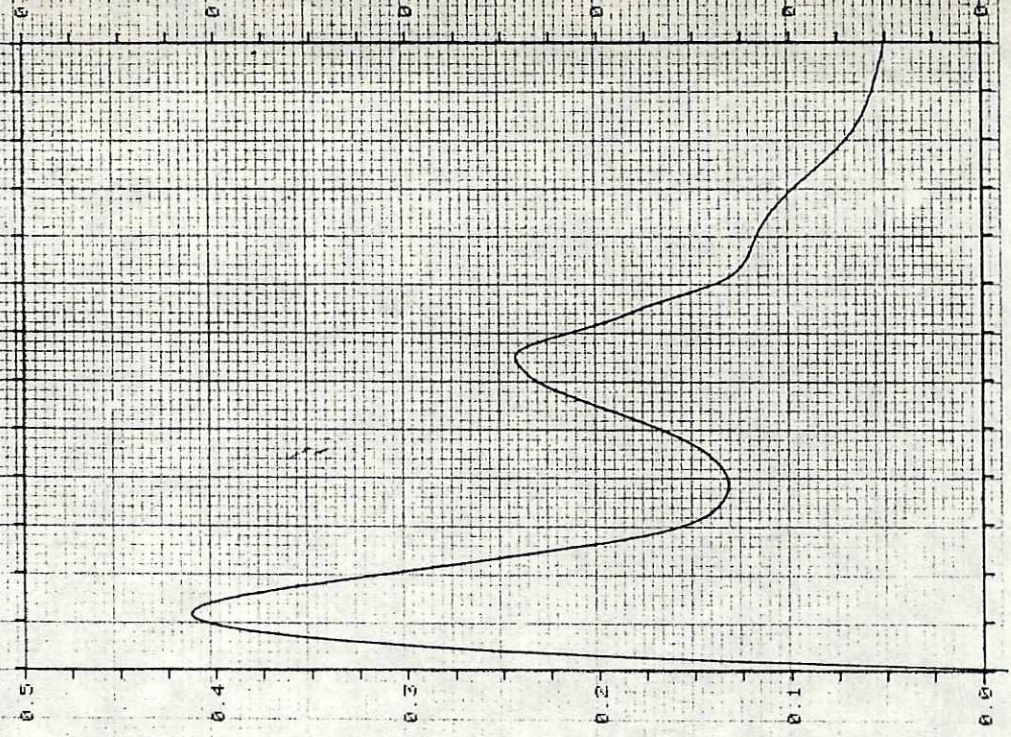
*C. albicans* = *Candida albicans*

*E. coli* = *E. coli*



- 1) Extracción en soxhlet
- 2) Precipitación con acetato de plomo
- 3) Columna de sephadex
- 4) Columna de silica gel
- 5) Columna de silica gel
- 6) Cromatografía proeparativa
- 7) Cromatografía preparativa

Figura 10. Diagrama de flujo del método de aislamiento del principio activo de la V. Kochnyi



PERKIN-ELMER  
 LAMBDA 5 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER  
 METHOD SCAN/MANUAL  
 SAMPLE CYCLE  
 ABSCISSA ORDINATE  
 + 284.7 NM 0.244 M  
 + 231.7 NM 0.413 A

PERKIN-ELMER  
 LAMBDA 5 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER  
 ID  
 TOR  
 D  
 ROINATE MODE  
 IT  
 AN SPEED  
 RESPONSE  
 MP  
 CYCLES/TIME  
 GAIN THRESHOLD  
 GORDER  
 RD MIN/MAX  
 SSC MIN/MAX  
 SSCISSA FORMAT  
 LINTER GRID/SCALE/

SCAN/MANUAL  
 AES  
 2 NM  
 60 NM/MIN  
 0.5 S  
 UV  
 1 / 0.05 MIN  
 0.02 A  
 PRINT DATA  
 0.000 / 0.500  
 220.0 / 350.0  
 10 NM/CM  
 /

FIGURA 11. Espectro UV del compuesto activo BAS(11-12)6'2

max  
EtOH

NO. 007-1493

PERKIN-ELMER

CONCENTRATION \_\_\_\_\_  
 THICKNESS \_\_\_\_\_  
 PHASE film  
 REMARKS \_\_\_\_\_

SCAN MODE \_\_\_\_\_  
 ACCY.  HI ENERGY  RESOLUTION   
 SURVEY  CAL.   
 SPECTRUM NO. 1  
 SAMPLE P.A  
 ORIGIN VK

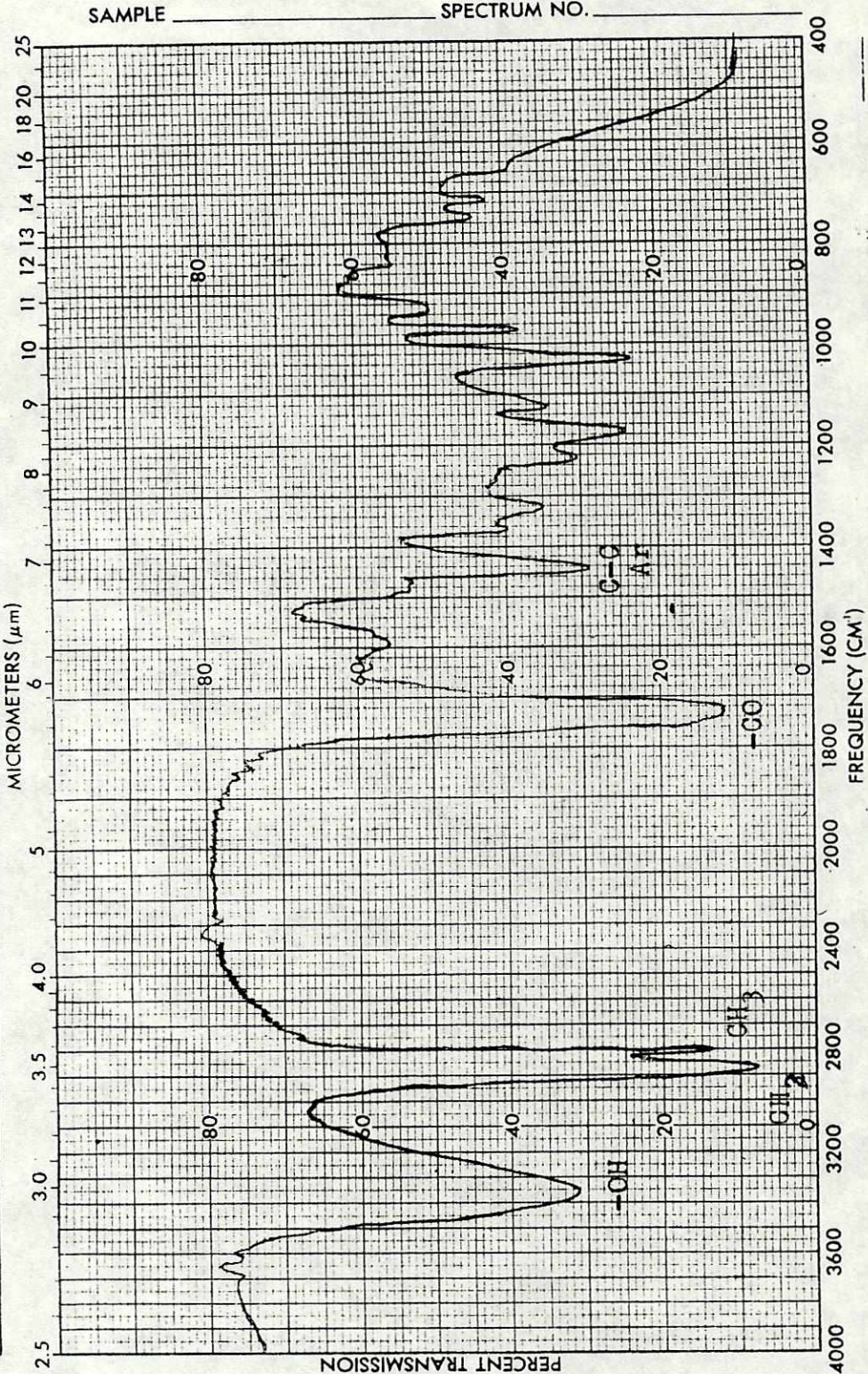
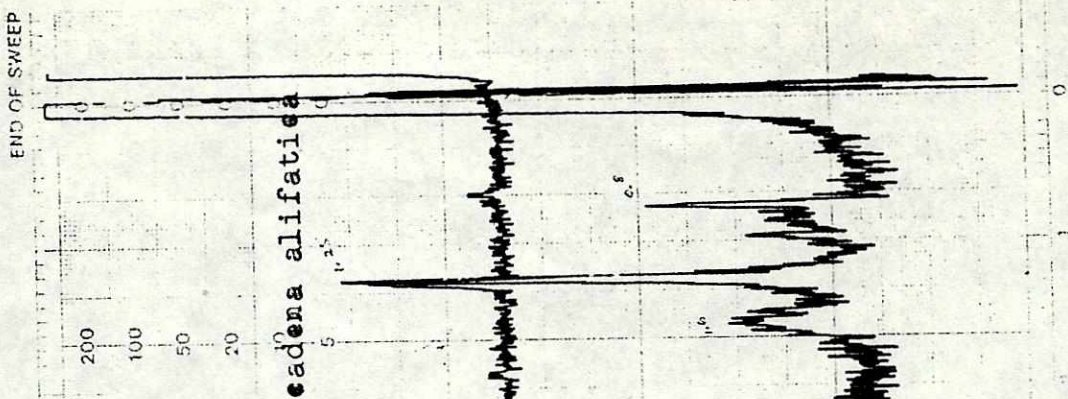


FIGURA 12. Espectro IR en film y ventana de KBr del compuesto activo FAS(11-12)6'2



OPERATOR: 1  
 SAMPLE: 1  
 DATE: 9/11/91  
 SPECTRUM NO. 1

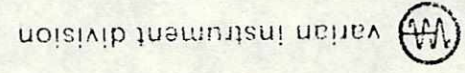
START	STOP
20ppm	10ppm
10ppm	5ppm
5ppm	0ppm

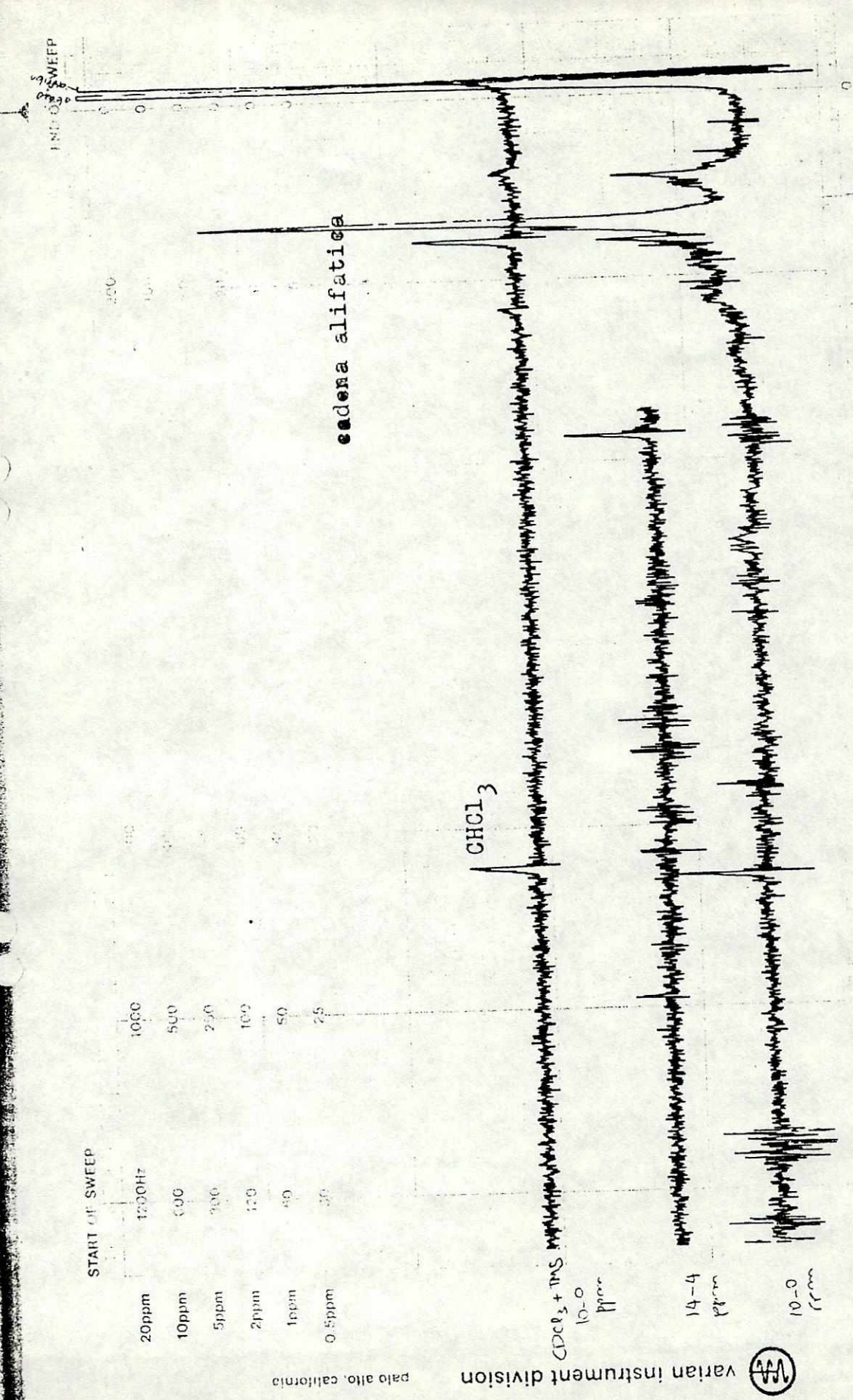
*(CDCl<sub>3</sub>)  
 14-4 ppm  
 10-0 ppm*

CHCl<sub>3</sub>

CONCENTRATION: 2000  
 0.05  
 0.05

FIGURA No. 13. Espectro NMR en CDCl<sub>3</sub> del compuesto activo FAS(11-12)6'2





num (1) 10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

LOCK POS 61.000

LOCK POW 0.05

DECOUPLE 0

DECOUPLER 0.05

DECOUPLER 0.05

1H

DATE 9/11/64

OPERATOR

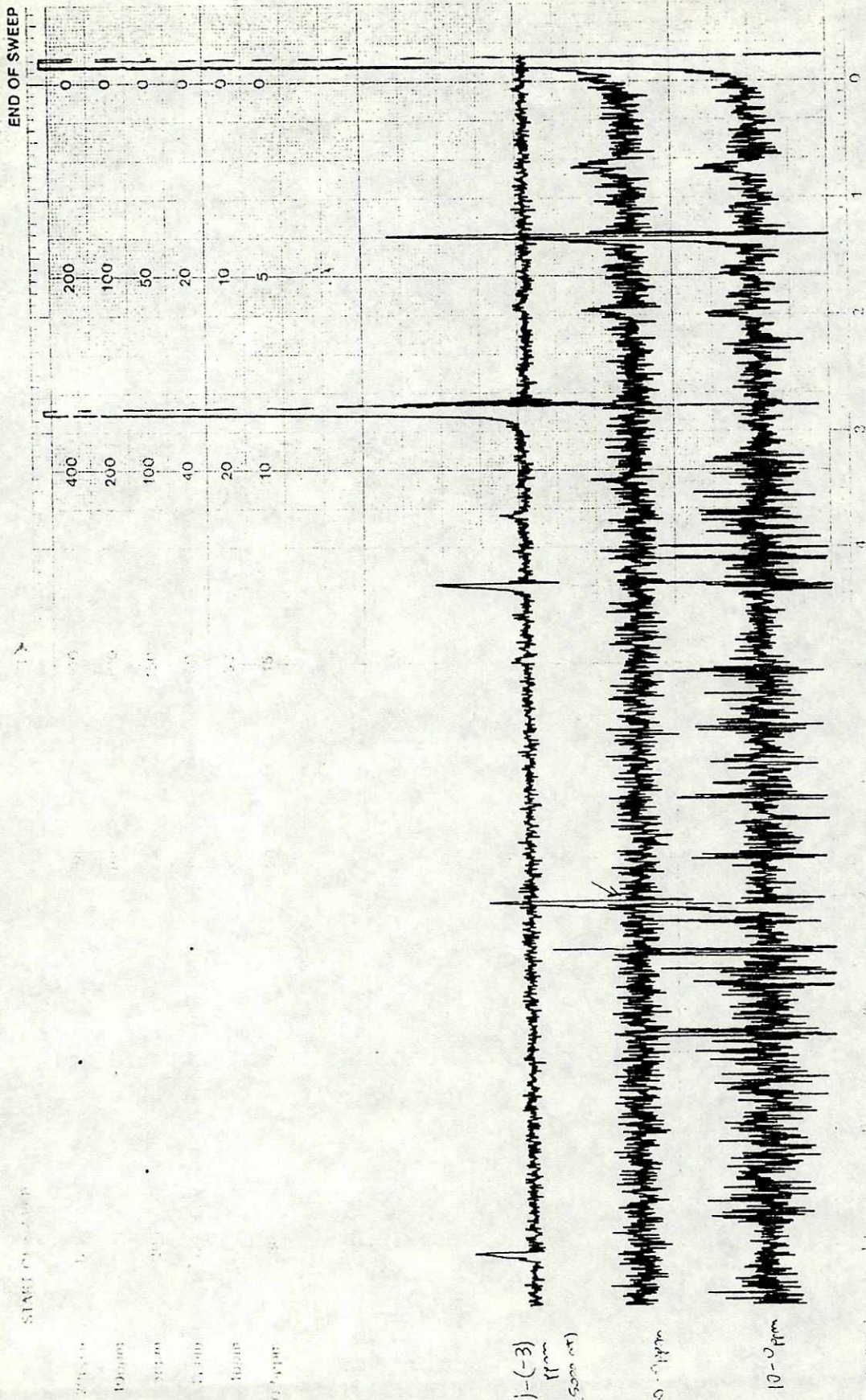
MS

CDCl<sub>3</sub>

FIGURA 14. Espectro NMR en CDCl<sub>3</sub> del precursor FAS(11-12)6'

varian instrument division





START OF SWEEP

END OF SWEEP

OPERATOR: \_\_\_\_\_ DATE: 9/11/71  
 SAMPLE: \_\_\_\_\_ SOLVENT: CDCl<sub>3</sub>  
 NUCLEUS: \_\_\_\_\_ TMS  
 PPM ZERO REF: \_\_\_\_\_  
 PPM ZERO SET: 2000  
 PPM ZERO SET: 0.35  
 PPM ZERO SET: 0.35  
 PPM ZERO SET: 0

(-)-(-)  
11 ppm  
(5000 cps)

10-0 ppm

10-0 ppm

FIGURA 15. Espectro NMR de CDCl<sub>3</sub>



## VI. DISCUSION

### A. Investigación Fitogquímica

Los resultados de la investigación fitoquímica de la V. Koschnyi sugirieron la presencia de flavonoides, glicósidos cardiotónicos, compuestos esteroidales, saponinas y taninos, tanto en la corteza como en la resina.

Flavononas, chalconas, derivados del catecol y flavonoides con dos hidroxilos fueron evidentes en ambas partes de la planta. Flavonas y flavonoles en la corteza y leucoantocianinas en la resina.

En los extractos etéreos y alcohólicos se estima la presencia de glicósidos cardiotónicos y compuestos esteroidales.

La formación de espuma de la resina cruda y su extracto alcohólico, y del extracto alcohólico de la corteza fue significativa, en adición al test positivo de hemólisis que sugirió la presencia de saponinas.

Durante el almacenamiento de la resina cruda y de los extractos alcohólicos Et1a, Et1b y MeC, ocurrió la formación de un precipitado rosado que dio las pruebas de taninos y polifenoles positivas, indicando la posibilidad de taninos oxidables.

Los alcaloides sólo pudieron revelarse en TLC con el reactivo de Yodoplatinato y con el método de aislamiento para plantas con menos del 1 % de su contenido, lo cual sugiere la

posible presencia de una baja cantidad de compuestos nitrogenados en la resina .

La corteza y resina de la V. Koschnyi presentaron un contenido de metabolitos oxidables considerablemente alto, desde el cambio visual de obscurecimiento de la resina pura, y los extractos alcohólicos hasta cambios en las subfracciones activas. Considerando que en el género Virola se han reportado biflavonoides, ésteres de cadena larga, diarilpropanos y sus derivados oxidativos, existe una alta probabilidad de que también estén presentes en la V. Koschnyi.

#### B. Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de la resina fue verificada en los extractos hexánico H1b, contra Cándida albicans; etéreo E1b contra Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes; un compuesto aceitoso Ealb contra Staphylococcus aureus y etanólico contra Staphylococcus aureus.

La presencia de actividad en extractos diferentes y contra microorganismos diferentes aseguran la presencia de más de un compuesto activo en la resina de la V. Koschnyi.

El resultado anterior también se presentó en la corteza. Contra Staphylococcus aureus ATCC 25923 los extractos activos fueron el metanólico y el etéreo, contra Staphylococcus pyogenes B hemolítico del grupo A el extracto metanólico, etéreo y bencénico y contra Cándida albicans los extractos

etéreo y metanólico.

En cuestión de equivalentes, la mayor actividad la presentó el extracto metanólico en la corteza y el etanólico en la resina.

Fue evidente que la resina produjo una inhibición mayor contra Cándida albicans, que la corteza; lo cual estableció la presencia de una mayor concentración del compuesto activo responsable de dicha actividad en la resina.

Dentro de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la corteza contra el Staphylococcus aureus, los resultados de la tabla 31, muestran la presencia de más de un compuesto activo. En la tabla aparece la fracción FAS-(11-12)3, con 15 mm de diámetro de inhibición y la fracción FAS-(11-12)7 con 20 mm. El análisis en TLC, indicó diferencia entre los componentes de las fracciones, además de que las fracciones intermedias no mostraron actividad.

La tabla 33 contiene los resultados antimicrobianos de las fracciones activas y del principio activo a un contenido de disco fijo (3000 ug). La menor actividad del principio activo FAS(11-12)6'2, en comparación con la actividad de la fracción FAS(11-12) concluye la posibilidad de sinergismo entre las diferentes fracciones activas.

### C. Caracterización del compuesto activo

Los resultados del análisis del método de aislamiento, TLC, pruebas cualitativas y espectroscopia proponen un compuesto activo contra Staphylococcus aureus ATCC 25923,

del tipo fenólico con cadena alquílica y grupo carbonilo, presente en la corteza de la *V. Koschnyi*.

La primera fracción activa se obtuvo de la precipitación de flavonoides y compuestos afines con acetato de plomo, un método específico de aislamiento de flavonoides y compuestos afines (Dominguez, 1979).

El compuesto activo se reveló en TLC de sílica gel (0.2mm), cloroformo-etanol (100:50) como una mancha roja con  $R_f=0.52$  con el reactivo de sal Fast Blue (FBS). Reactivo revelador de flavonoides por la formación de compuestos azo. (Wagner, 1984)

El compuesto activo se oscureció en presencia de vapores de amoníaco y se intensificó con tricloruro de aluminio al ser expuesto a luz UV de 366 nm. Los hidroxilos fenólicos libres se ionizan a un pH=11-12 y los flavonoides forman quelatos con tricloruro de aluminio entre el grupo carbonilo y el hidroxilo (en C3, C5 o su equivalente). (Goodwin, 1976)

El espectro de IR del compuesto activo en film presentó absorbancias en  $\checkmark^{KBr}$  ( $cm^{-1}$ ) 3350 (estiramiento de OH), 2853 (metileno alifático), 2800 (metilo), 1730 (estiramiento de carbonilo) y 1440 (estiramiento C-C de anillo).

El espectro UV ( 13  $\mu g/ml$  ) de 190 a 350 nm en etanol presentó máximos a 284.7 y 231.7 nm.

El espectro de  $^1H$  NMR se llevó a cabo en cloroformo deuterado. La poca cantidad de muestra ( 0.9 mg ) dio como resultado una concentración deficiente para la obtención del espectro de NMR. Sólomente se hizo visible la absorción en la

región de sustituyentes alifáticos a  $t=0.8, 1.25$  y  $1.8$ ; y en condición de amplitud relativamente alta que no permitió un análisis adecuado de los picos. Al comparar los espectros de NMR del compuesto activo y su predecesor FAS(11-12)6, se observó la absorbancia en la misma región.

Con este resultado se limitó la conclusión a la presencia de una cadena alquilica larga dentro del compuesto.

## VII. CONCLUSIONES

El análisis del método de extracción, las pruebas cualitativas y espectroscopia de IR, UV y NMR sugirieron que el principio activo de la corteza de la Virola Koschnyi contra el Staphylococcus Aureus ATCC 25923 posee un grupo fenólico con cadena alquílica y grupo carbonilo.

La actividad antimicrobiana contra Cándida albicans, Streptococcus Pyogenes del grupo A B hemolítico y Staphylococcus Aureus ATCC 25923 en extractos y fracciones diferentes en la corteza y resina aseguran la presencia de más de un principio activo en ambas partes de la planta.

La actividad antimicrobiana contra el S. aureus ATCC 25923 se atribuyó a los extractos E1b, Ealb, Et1b, BC, EC y MeC. Contra C. albicans: H1b, E1b, Et1b, EC y MeC; contra Staphylococcus pyogenes B hemolítico del grupo A: E1b, BC, EC y MeC.

La actividad contra Candida albicans pareció ser mayor en la resina que en la corteza lo que podría indicar una mayor concentración de dicho principio activo dentro de la resina.

La investigación fitoquímica de la corteza y resina mostró el contenido de flavonoides, saponinas, taninos, glicosidos cardiotónicos y compuestos esteroidales. La formación de espuma y hemólisis de sangre son dos características de los extractos alcohólicos. Además de la

presencia de metabolitos oxidables entre ellos taninos de alto peso molecular.

## VIII. RECOMENDACIONES

El estudio hasta aquí realizado de la actividad antimicrobiana de la Virola Koschnyi recomienda la investigación futura en los siguientes aspectos:

- Determinación de la estructura del principio activo, así como de sus propiedades físicas y químicas.
- Determinación de la presencia de otros principios activos y propiedad de sinergismo dentro de la planta.
- Cuantificación de la actividad antimicrobiana y estudios de actividad contra otros microorganismos.
- Determinación de los metabolitos presentes y su relación con posibles reacciones adversas, dado el uso exhaustivo de la planta como remedio popular.
- Oxidación y otros cambios químicos que sufre la planta durante su almacenamiento y manejo.
- Estudio de otro tipo de actividad considerando su uso medicinal en la curación de úlceras y gastritis.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Balows, A.; W. Hausler, K. Herrmann, H. Isenberg y J. Shadomy. 1991 Manual of clinical microbiology. 5th. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology. 1364 pp.
- Bauer, A.; M. Kirby, M. Sherrys y M. Turck. 1966 "Antibiotic testing by a standardized single disk method". The American Journal of Clinical Pathology. 45(4): 493-496.
- Braz, R.; D. Gottlieb y S. Pinho. 1976 "Diarylpropanoid from Virola multinervis". Phytochemistry. 15(4): 567-568.
- \_\_\_\_\_, G. Pedreira y D. Gottlieb. 1976 "Isoflavones from Virola caducifolia". Phytochemistry. 15(6): 1029-1030.
- Calvacante, S.; D. Fernández, H. Paulinno, M. Yoshida, D. 1985 Gottlieb. "Lignoids from the fruit of three Virola species". Phytochemistry. 24: 1865-1866.
- Dominguez, X. 1973 Métodos de investigación fitoquímica. México, Editorial Limusa. 281 pp.
- Ellner, P. y H. Neu. 1981 "The inhibitory quotient. A method for interpreting minimum inhibitory concentration data". JAMA. 246(14): 1575-1578.
- Geissman, T. y D. Crout. 1969 Organic chemistry of secondary plant metabolism. California, Freeman, Cooper and Company 592 pp.
- Goodwin, T. 1976 Chemistry and biochemistry of plant pigments. 2nd. ed. London, Academic zpress Inc. 373 pp.
- Gottlieb, D. 1976 "Neolignans from Virola carinata". Phytochemistry. 15: 773-774.
- \_\_\_\_\_, "Chemical studies on medicinal myristicaceae 1979 from amazonia". Phytochemistry. 1: 309-323.
- Guatemala Indígena. Instituto Indigenista Nacional. v. 13 1978 Nos. 3-4. Jul-Dec.
- Kato, M.; L. Lopes, H. Paulino, M. Yoshida y D. Gottlieb. 1985 "Acylresorcinols from Virola sebifera and Virola Elongata". Phytochemistry. 24(3): 533-536.

- \_\_\_\_\_, H. Paulino, M. Yoshida y D. Gottlieb. "Neolignans from fruits of *Virola elongata*". *Phytochemistry*. 25(1): 279-280.  
1986
- Katzung, B. *Farmacología Basica y Clínica*. 3ra. ed. México, D.F., Editorial el Manual Moderno, S.A. de C.V.. 951 pp.  
1987
- Kazuko, K.; Y. Uhara y Y. Hashimoto. "Neolignans of *Virola carinata* bark". *Phytochemistry*. 21(11): 2725-2728.  
1982
- \_\_\_\_\_, Y. Uhara y Y. Hashimoto. "The Neolignans (-)-carinatone and carinatin from *Virola carinata*". *Phytochemistry*. 21(4): 929-931.  
1982
- Kijjoa, A.; A. Giesbrecht, D. Gottlieb y H. Gottlieb. "1,3-diaril-propanes and propan-2-ols from *Virola sebifera*". *Phytochemistry*. 20(6): 1385-1388.  
1981
- Lennette, E.; A. Balows, W. Hausler y J. Truant. *Manual of Clinical Microbiology*. 3er. ed. Washington D.C., American Society for Microbiology. 1044 pp.  
1980
- Lopes, L.; M. Yoshida y D. Gottlieb. "Dibenzylbutirolactone lignans from *Virola sebifera*". *Phytochemistry*. 22(6): 1516-1518.  
1983
- MacRae, D. y N. Towers. "An ethnopharmacological examination of *Virola elongata* bark: a south american arrow poison". *Journal of Ethnopharmacology*. 12: 75-92.  
1984
- \_\_\_\_\_, N. Towers. "Review article number 2. Biological activities of lignans". *Phytochemistry*. 23(6): 1207-1220.  
1984
- \_\_\_\_\_, N. Towers. "Non-alkaloidal constituents of *Virola elongata* bark". *Phytochemistry*. 24(3): 561-566.  
1985
- Martinez, J.; L. Cuca, M. Yoshida y D. Gottlieb. "Neolignans from *Virola calophylloidea*". *Phytochemistry*. 24(8): 1867-1868.  
1985
- \_\_\_\_\_, J.; L. Cuca, A. Santana, E. Pombo-Villar y B. Golding. "Neolignans from *Virola elongata*". *Phytochemistry*. 24(7): 1612-1614.  
1985
- \_\_\_\_\_, M. Yoshida y D. Gottlieb. "Arylnaphtalene neolignans from *Virola calophylla*". *Phytochemistry*. 29(8): 2655-2657.  
1990

- \_\_\_\_\_, L. Cuca. "Flavonoids from *Virola calophylloidea*".  
1987 Journal of Natural Products. 50(6): 1045-1047.
- Schultes, R. "Evolution of the identification of miristicaceous hallucinogens of south america". Journal of Ethnopharmacology. 1: 211-239.  
1979
- Standley. Flora of Guatemala. Part 4. Fieldiana: Botany volume 24. Chicago, Pub. Chicago Natural History Museum.  
1981
- Trease, G. y W. Evans. Tratado de Farmacognosia.  
1988 México, Editorial Interamericana. 846 pp.
- Turck, A.; R. Lindemeyer y R. Petersdorf. "Comparison of single-disc and tube dilution techniques in determining antibiotic sensitivities of gram-negative pathogens". Annals of Internal Medicine. 58(1): 56-65.  
1963
- Wagner, H.; S. Blat, E. Zgainski. Plant Drug Analysis.  
1984 Germany, Springer-Verlag. 320 pp.

A P E N D I C E S

## APENDICE A

### Test de difusión de disco

El test de difusión de disco ha sido utilizado ampliamente, pero recientemente se ha incrementado el número de laboratorios que utilizan los métodos de microdilución MIC, un método automático, o la combinación de ambos. El procedimiento de difusión de disco ha sido aceptado por la Food and Drug Administration (FDA) y estandarizado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Es esencialmente un examen que proporciona resultados cualitativos (aunque con bases cuantitativas) de la clasificación de un organismo como susceptible, intermedio, moderadamente susceptible o resistente. La mayor ventaja es su flexibilidad en el número y clase de agentes antimicrobianos que pueden ser examinados en tests individuales. Es técnicamente simple pero requiere especial cuidado en la reproducción de resultados.

El examen se ha utilizado para organismos de crecimiento rápido como miembros de la familia Enterobacteriaceae, especies de Staphylococcus, y enterococci, pero se ha adaptado el examen a otras bacterias como estreptococci y Pseudomonas, Acinetobacter, Haemophilus y Nisseria.

Las deficiencias del test difusión son su interpretación no cuantitativa, su inaplicabilidad para muchos organismos de

crecimiento lento y anaeróbicos. Sobretudo el método de difusión de disco es efectivo para un análisis de rutina, pero debería ser complementado con un test de dilución cuando no sea aplicable o cuando se requieran resultados cuantitativos.

#### Medio de Agar:

El método de difusión de disco ha sido estandarizado con agar Mueller-Hinton. Algunos microorganismos requieren de la adición de sangre desfibrinada al 5% de caballo, carnero u otro.

Los discos de papel filtro que contienen los agentes antimicrobianos están certificados para el examen de susceptibilidad en frascos específicos y con desecante. Los discos se guardan bajo refrigeración (2, 3°C) o congelados a -14°C.

#### Inoculación de platos:

El método estandar para la preparación del inóculo, implica tomar de tres a cuatro colonias bien aisladas con una aguja o aro y colocarlas en un caldo de digestión soya-caseína (4 a 5 ml). El caldo de cultivo se deja incubar a 35 C hasta la aparición de una turbidez visible. La turbidez puede ajustarse con solución salina o caldo para obtener la turbidez del preparado estándar por adición de 0.5ml de 0.048M de cloruro de bario, a 99.5 ml de ácido sulfúrico 0.36 N (1% v/v). Esta turbidez es la mitad de la densidad del estándar número uno de McFarland y se refiere generalmente como

estándar 0.5 de McFarland que corresponde a  $1.5 \times 10^8$  bacterias por ml de suspensión.

Procedimiento para el test:

Antes de inocular los platos, 15 minutos antes aproximadamente, los discos impregnados se aplican a la superficie de los platos inoculados con un dispensador o pinza estéril. Todos los discos se presionan sobre el agar. El espacio entre cada disco debe ser mayor o igual a 15 mm, después de 16, 18 o 24 horas de incubación, los platos son examinados y los diámetros de inhibición.

Los diámetros de las zonas de inhibición de los agentes antimicrobianos individuales pueden reportarse como equivalentes MIC, pero son transferidos a susceptible, intermedio, o resistente por medio de una tabla de criterio interpretativo.

Fuentes comunes de error:

Aunque el método de difusión de disco es un método sencillo, errores técnicos pueden interferir en la reproducibilidad de los resultados. Los siguientes son los errores comunes encontrados en laboratorios microbiológicos:

1. Preparación inapropiada del agar Mueller-Hinton
2. Almacenamiento inapropiado de discos.
3. Estandarización inadecuada de la densidad del caldo de cultivo
4. Inadecuado mantenimiento de la turbidez del estándar
5. Incubación excesiva de los platos

6. Lectura de los resultados después de 24 h.
7. Mezcla de cultivos
8. Error de transcripción al coleccionar los datos

Más información acerca de la técnica de difusión de disco puede encontrarse en el Manual de Microbiología Clínica de Balows et al. (Balows et al, 1991)

## APENDICE B

### ANALISIS EN TLC DE LA VIOLA KOSCHNYI

A continuación se presentan los cromatogramas del análisis en TLC de las fracciones activas de la V. Koschnyi. Se utilizaron Cromatofolios al de sílica gel de 0.2 mm de espesor (Merck).

Clave de colores:

R= rojo  
V= verde  
B= blanco  
Az= azul  
Am= amarillo  
C= celeste  
Ca= café  
An= naranja

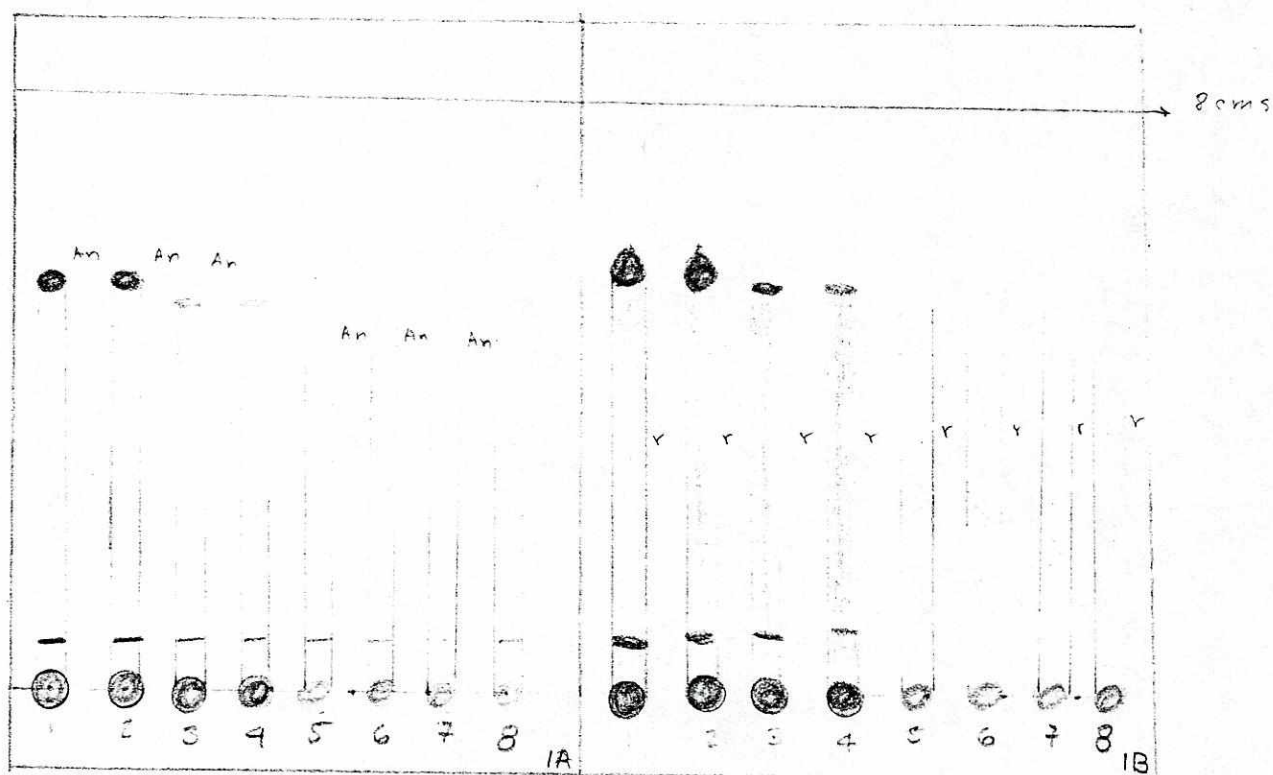
## CROMATOGRAMA No. 1

Fracciones de la columna de Sephadex del extracto activo FS:  
f1..f8.

-Sistema de solvente: SAT

1A. Vis

1B. Reactivo de FBS



CROMATOGRAMA No. 2

Fracciones de la columna de sílica gel de la cromatografía de

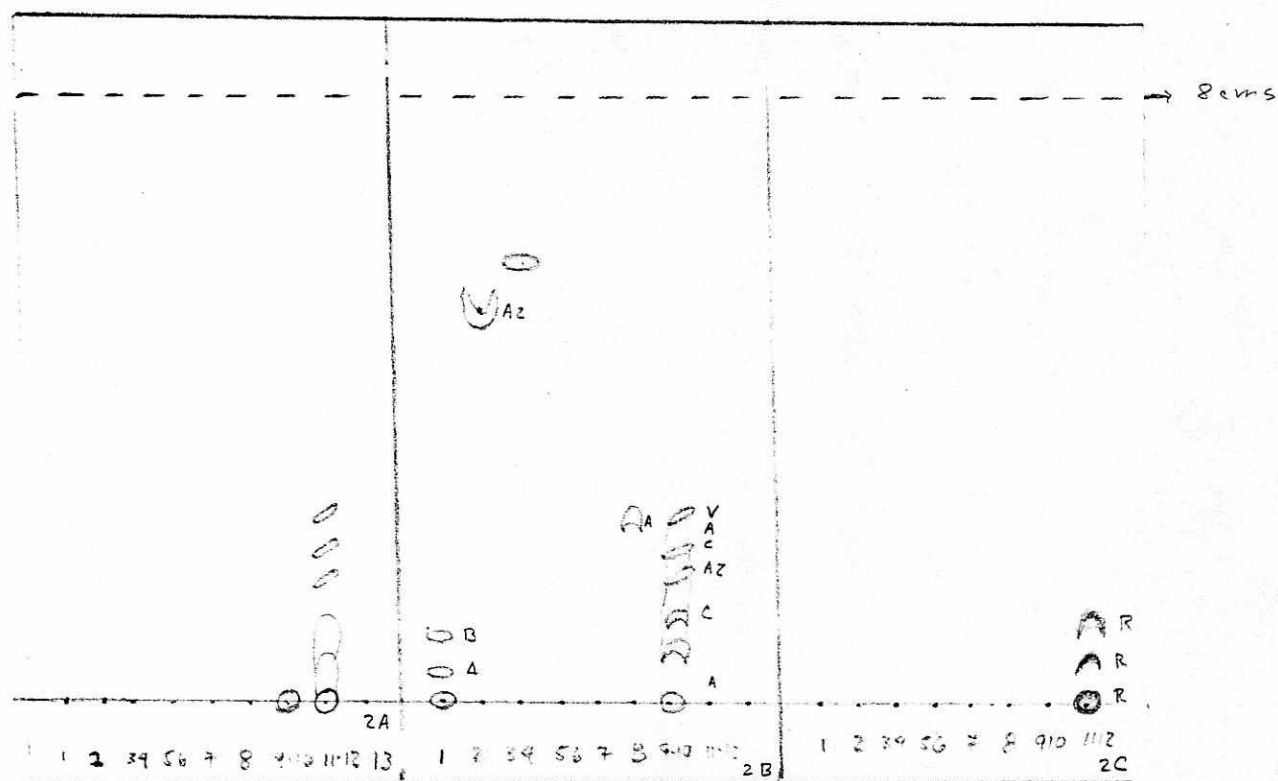
FA: FAS1..FAS13.

-Sistema de solvente: cloroformo

2A. UV 254

2B. UV 365

2C. Reactivo FBS



CROMATOGRAMA No. 3

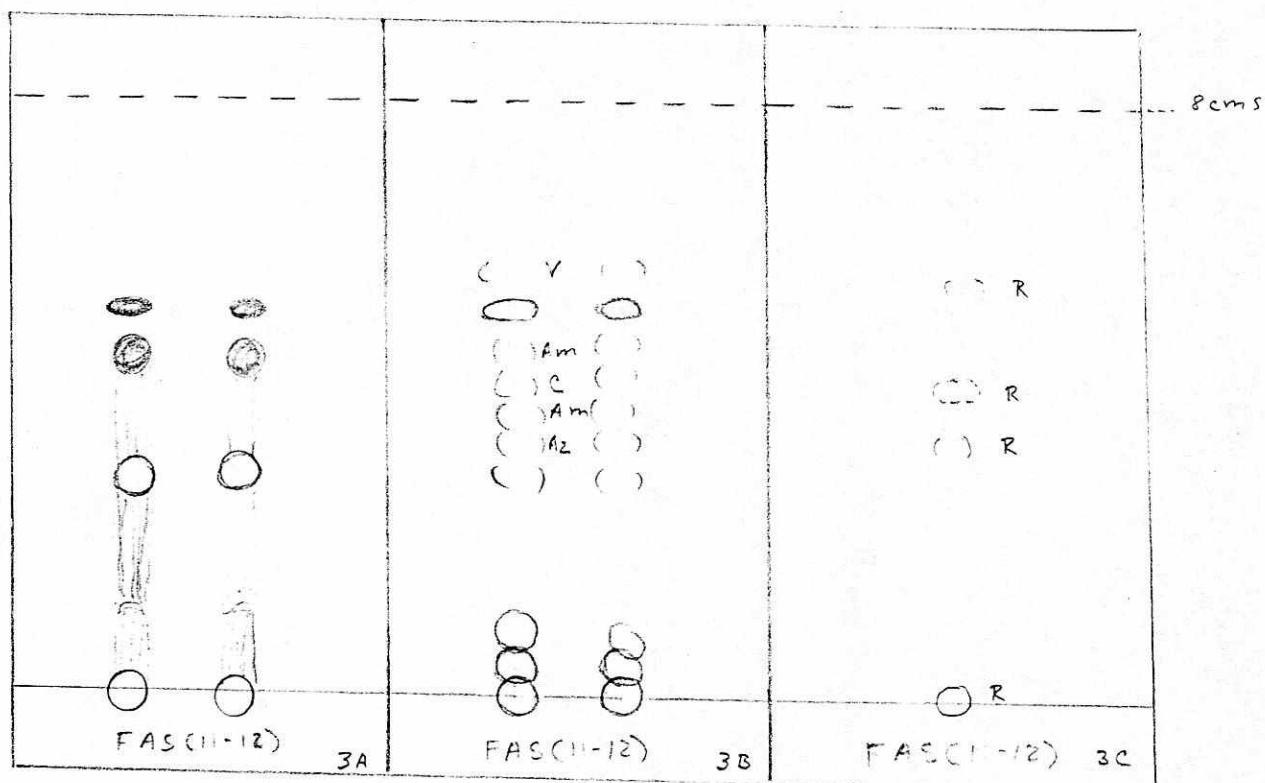
Fracción FAS(11-12)

-Sistema de solvente: cloroformo-etanol (1000-50)

3A. UV 365

3B. UV 254

3C. Reactivo FBS



## CROMATOGRAMA No. 4

Fraccionamiento de FAS(11-12) en columna de sílica gel:

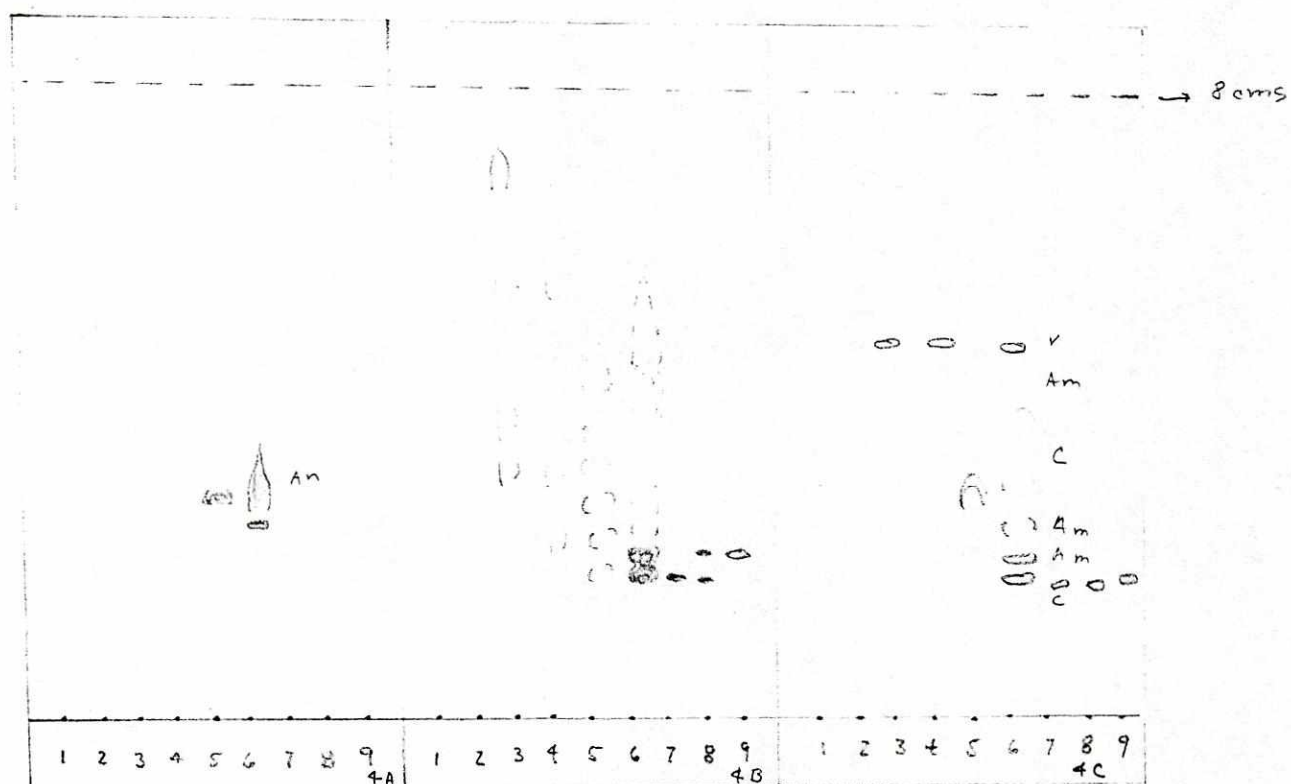
FAS(11-12)1..FAS(11-12)9

-Sistema de solvente: cloroformo-etanol (1000:50)

4A. VIS

4B. UV 366

4C. UV 254



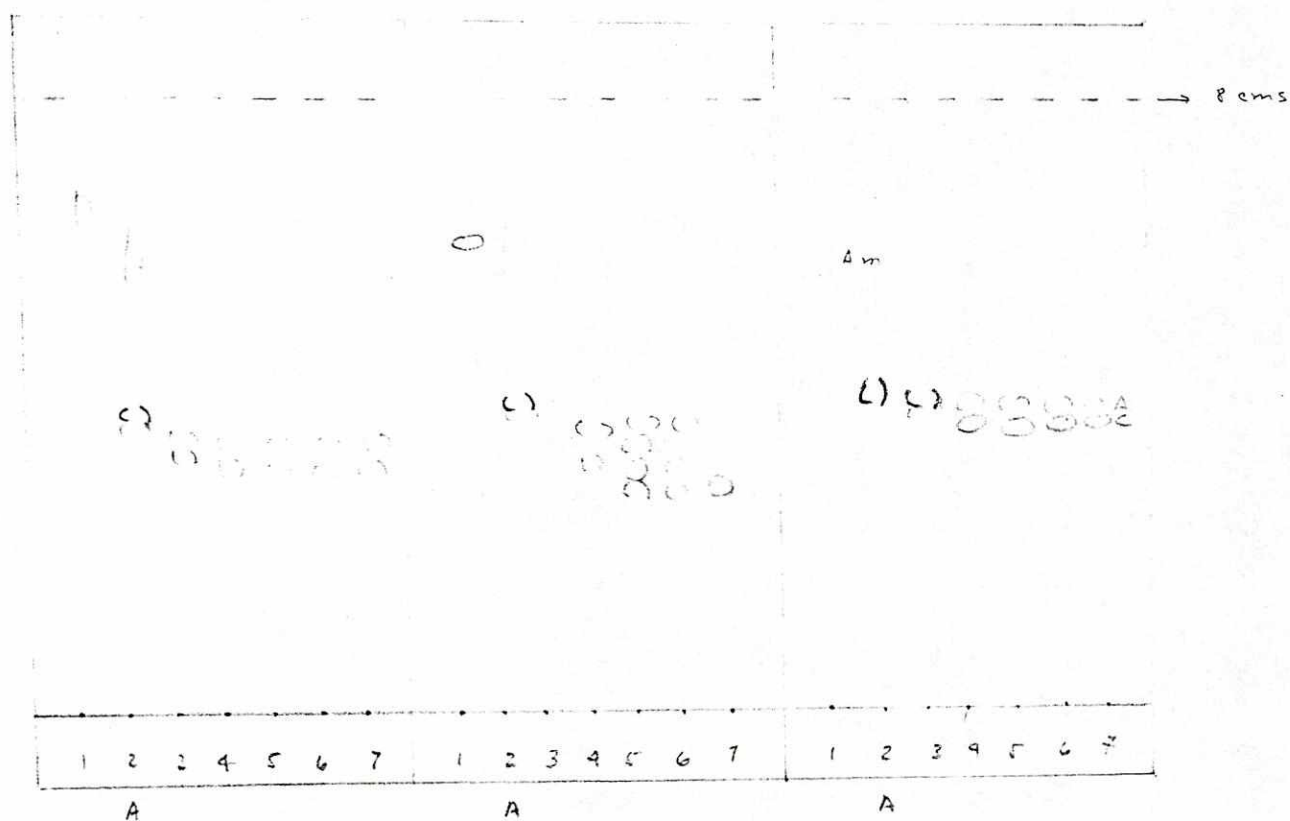
CROMATOGRAMA No. 5

Fraccionamiento de FAS(11-12)6 en columna de sílica:

FAS(11-12)6'1..FAS(11-12)6'4

-Sistema de solvente: cloroformo-etanol (1000:50)

5A. VIS  
5B. UV 366  
5C. UV 254



## APENDICE C

### Extracción de alcaloides en plantas con menos del 1% de contenido

Dos gramos de la planta se pulverizan sobre un mortero con 2 ml de solución de amoníaco, luego se mezcla con siete gramos de óxido de aluminio básico. La mezcla completa se empaqueta en una columna de vidrio (1.5 cms de diámetro por 20 cms. de largo). Las bases alcaloidales se eluyen con 10 ml de cloroformo. Los primeros 10 ml eluidos se colectan y se evaporan a 1 ml, el cual se utiliza para cromatografía. (Wagner *et al*, 1984)

#### Reactivo de Yodoplatinato (IP)

0.3 g de ácido hexacloroplatinico (IV) hidratado es disuelto en 100 ml de agua y mezclado con 100 ml de yoduro de potasio al 6%.

Las placas se asperjan con 10 ml y se evalúan en visible. Detecta compuestos que contienen nitrógeno.

APENDICE D

Limites del diámetro de zona de inhibición  
con discos antimicrobianos seleccionados para el S. aureus  
ATCC 25923

Agente antimicrobiano (contenido de disco)	diametro de la inhibición (mm)
Amoxilina/acido clauvico (20/10 ug)	28-36
Ampicilina (10 ug)	27-35
Ampicilina sublactama (10/10 ug)	29-37
Cefaclor (30 ug)	27-31
Cefuroxima (30 ug)	27-35
Ciprofloxacín (5 ug)	22-30
Netilmicin (30 ug)	22-31
Trimetoprim (5 ug)	19-26
Trimetropim/sulfametoxasol (1.25/23.75 ug)	24-32
Sulfametoxasol (250 o 300 ug)	24-34

## APENDICE E

### Analisis de varianza para la actividad antimicrobiana de la V. Koschnyi

A continuación se presentan las tablas con el análisis de varianza para cada uno de los extractos activos con sus respectivos microorganismos. Se aplicó análisis de varianza de una vía y la prueba B-tukey para determinar la diferencia entre medias de los diámetros de inhibición, dentro de los extractos y dentro de las cajas inoculadas. Así mismo se determinó las diferencias entre los diámetros de inhibición de los extractos. El analisis de varianza (ANOVA) se llevó a cabo con el programa SPSS.

SPSS/ PC + <sup>TM</sup> versión 3.1  
Copyright (c) SPSS Inc. 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989  
Portions Copyright (c) Microsoft Corp. 1981, 1983, 1984  
1985, 1986, 1987, 1988  
44N. Michigan Avenue, Chicago Illinois.

Clave:  
EXT= Extracto  
DIA= Diametro  
VOL= Volumen (ul)  
CONT= Contenido (ug)  
GROUP= Grupo

TABLA E.1

ANOVA para la actividad antimicrobiana de la resina contra  
Staphylococcus aureus. (Tabla 22)

GROUP	EXT	VOL
1	H1b	50
2	H1b	80
3	E1b	50
4	E1b	80
5	E1b	50
6	E1b	80
7	Ea1b	50
8	Ea1b	80
9	Et1b	50
10	Et1b	80

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA

By Variable EXT

## Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	9	1260.6333	140.0704	8404.2222	.0000
Within Groups	20	.3333	.0167		
Total	29	1260.9667			

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA

By Variable EXT

## Multiple Range Test

## Tukey-B Procedure

Ranges for the .050 level -

3.98	4.29	4.48	4.62	4.73
4.82	4.89	4.95	5.01	

The ranges above are table ranges.

The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$$.0913 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$$

(\*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA  
(Continued)

Mean	Group	1	2	7	8	3	4	9	0	5	6
.0000	Grp 1										
.0000	Grp 2										
.0000	Grp 7										
.0000	Grp 8										
7.0000	Grp 3	*	*	*	*						
12.1667	Grp 4	*	*	*	*	*					
13.0000	Grp 9	*	*	*	*	*	*				
14.0000	Grp 10	*	*	*	*	*	*	*			
14.1667	Grp 5	*	*	*	*	*	*	*	*		

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA  
(Continued)

Mean	Group	1	2	7	8	3	4	9	0	5	6
15.0000	Grp 6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

MORE

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 1	Grp 2	Grp 7	Grp 8
Mean	.0000	.0000	.0000	.0000

SUBSET 2

Group	Grp 3
Mean	7.0000

SUBSET 3

Group	Grp 4
Mean	12.1667

MORE

SUBSET 4

Group	Grp 9
Mean	13.0000

SUBSET 5

Group	Grp10	Grp 5
Mean	14.0000	14.1667

SUBSET 6

Group	Grp 6
Mean	15.0000

TABLA E.2

ANOVA para la actividad antimicrobiana de la resina contra  
Cándida albicans. (tabla 23)

GROUP	EXT	VOL
1	H1b	50
2	H1b	80
3	B1b	50
4	B1b	80
5	E1b	50
6	E1b	80
7	C1b	50
8	C1b	80
9	Et1b	50
10	Et1b	80

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA  
ERROR 602, Can't write to listing file

By Variable EXT

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	9	872.7800	96.9667		
Within Groups	20	.0000	.0000		
Total	29	872.7800			

TABLA E.3

ANOVA para la actividad antimicrobiana de la corteza contra Staphylococcus aureus. (tabla 27)

GROUP	EXT	CONT
1	HC	1000
2	HC	2000
3	HC	4000
4	BC	1000
5	BC	2000
6	BC	4000
7	EC	1000
8	EC	2000
9	EC	4000
10	CC	1000
11	CC	2000
12	CC	4000
13	MeC	1000
14	MeC	2000
15	MeC	4000

MORE

----- O N E W A Y -----

Variable DIA

By Variable EXT

## Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	14	1561.6298	111.5450	7381.6534	.0000
Within Groups	30	.4533	.0151		
Total	44	1562.0831			

MORE

----- O N E W A Y -----

Variable DIA

By Variable EXT

## Multiple Range Test

## Tukey-B Procedure

Ranges for the .050 level -

4.85	4.35	4.53	4.66	4.76	4.84	4.91	4.97	5.02	5.07
5.11	5.15	5.18	5.21						

The ranges above are table ranges.

The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

.0369 \* Range \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

MORE

		G G G G G G G G G G G G G G G G
		r r r r r r r r r r r r r r r r
		P P P P P P P P P P P P P P P P
		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Mean	Group	1 2 3 0 1 2 4 5 7 6 3 8 4 5 9
.0000	Grp 1	
.0000	Grp 2	
.0000	Grp 3	
.0000	Grp10	
.0000	Grp11	
.0000	Grp12	
7.1000	Grp 4	* * * * *
8.0000	Grp 5	* * * * *
9.0000	Grp 7	* * * * *
10.1667	Grp 6	* * * * *
11.5000	Grp13	* * * * *
12.1667	Grp 8	* * * * *
13.0000	Grp14	* * * * *
15.0000	Grp15	* * * * *
15.1000	Grp 9	* * * * *

MORE

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 1	Grp 2	Grp 3	Grp10	Grp11
Mean	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000
Group	Grp12				
Mean	.0000				

SUBSET 2

Group	Grp 4
Mean	7.1000

MORE

SUBSET 3

Group	Grp 5
Mean	8.0000

---

SUBSET 4

Group	Grp 7
Mean	9.0000

---

SUBSET 5

Group	Grp 6
Mean	10.1667

---

SUBSET 6

Group	Grp13
Mean	11.5000

---

MORE

SUBSET 7

Group	Grp 8
Mean	12.1667

---

SUBSET 8

Group	Grp14
Mean	13.0000

---

SUBSET 9

Group	Grp15	Grp 9
Mean	15.0000	15.1000

---

TABLA E.4

ANOVA para la actividad antimicrobiana de la corteza contra  
Streptococcus pyogenes, (tabla 29)

GROUP	EXT	CDNT
1	HC	1000
2	HC	2000
3	HC	4000
4	BC	1000
5	BC	2000
6	BC	4000
7	EC	1000
8	EC	2000
9	EC	4000
10	CC	1000
11	CC	2000
12	CC	4000
13	MeC	1000
14	MeC	2000
15	MeC	4000

MORE

----- O N E W A Y -----

Variable DIA

By Variable EXT

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	14	1560.5458	111.4676	9288.9630	.0000
Within Groups	30	.3600	.0120		
Total	44	1560.9058			

MORE

----- O N E W A Y -----

Variable DIA

By Variable EXT

Multiple Range Test

Tukey-B Procedure

Ranges for the .050 level -

4.05	4.35	4.53	4.66	4.76	4.84	4.91	4.97	5.02	5.07
5.11	5.15	5.18	5.21						

The ranges above are table ranges.

The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$.0775 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(\* Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

		G G G G G G G G G G G G G G G G
		r r r r r r r r r r r r r r r r
		P P P P P P P P P P P P P P P P
		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Mean	Group	1 2 3 0 1 2 4 5 7 6 3 8 4 9 5
.0000	Grp 1	
.0000	Grp 2	
.0000	Grp 3	
.0000	Grp10	
.0000	Grp11	
.0000	Grp12	
7.0000	Grp 4	* * * * *
8.0000	Grp 5	* * * * * *
9.0000	Grp 7	* * * * * * *
10.0000	Grp 6	* * * * * * * *
11.4333	Grp13	* * * * * * * * *
12.0000	Grp 8	* * * * * * * * *
13.1667	Grp14	* * * * * * * * *
15.0000	Grp 9	* * * * * * * * *
15.1667	Grp15	* * * * * * * * *

MORE

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 1	Grp 2	Grp 3	Grp10	Grp11
Mean	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000

Group	Grp12
Mean	.0000

SUBSET 2

Group	Grp 4
Mean	7.0000

MORE

SUBSET 3

Group	Grp 5
Mean	8.0000

---

SUBSET 4

Group	Grp 7
Mean	9.0000

---

SUBSET 5

Group	Grp 6
Mean	10.0000

---

SUBSET 6

Group	Grp13
Mean	11.4333

---

MORE

SUBSET 7

Group	Grp 8
Mean	12.0000

---

SUBSET 8

Group	Grp14
Mean	13.1667

---

SUBSET 9

Group	Grp 9	Grp15
Mean	15.0000	15.1667

---

TABLA E.5

ANOVA para la actividad antimicrobiana de la corteza contra  
Staphylococcus aureus a un contenido de 4000 ug (tabla 30)

GROUP	EXT	CAJA
1	HC	1
2	HC	2
3	HC	3
4	BC	1
5	BC	2
6	BC	3
7	EC	1
8	EC	2
9	EC	3
10	CC	1
11	CC	2
12	CC	3
13	MeC	1
14	MeC	2
15	MeC	3
16	SXT	1
17	SXT	2
18	SXT	3

MORE

----- ONEWAY -----

Variable PRO

By Variable CAT

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	.0000	.0000		
Within Groups	0	.0000	.0000		
Total	2	.0000			

MORE

----- ONEWAY -----

Variable PRO

By Variable CAT

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	.0030	.0015		
Within Groups	0	.0000	.0000		
Total	2	.0030			

MORE

----- ONEWAY -----

Variable PRO

By Variable CAT

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	.0185	.0093		
Within Groups	6	.0000	.0000		
Total	8	.0185			

MORE

----- ONEWAY -----

Variable PRO

By Variable CAT

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	.0000	.0000		
Within Groups	6	.0000	.0000		
Total	8	.0000			

TABLA E.6

ANOVA para la actividad antimicrobiana de las fracciones activas de la corteza contra S. aureus. (tabla 33)

GROUP	FRACCION
1	FAS
2	FAS(11-12)
3	FAS(11-12)'2
4	SXT

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA

By Variable FRAC

ERROR 602, Can't write to listing file

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	267.4167	89.1389	4114.1026	.0000
Within Groups	8	.1733	.0217		
Total	11	267.5900			

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA

By Variable FRAC

Multiple Range Test

Tukey-B Procedure

Ranges for the .050 level:-

3.90 4.28 4.53

The ranges above are table ranges.  
 The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..  
 $.1041 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(\* ) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

MORE

----- ONEWAY -----

Variable DIA  
(Continued)

		G G G G
		r r r r
		P P P P
Mean	Group	3 1 2 4
12.1667	Grp 3	
15.5000	Grp 1	*
18.3333	Grp 2	**
25.0000	Grp 4	***

MORE

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 3
Mean	12.1667

-----

SUBSET 2

Group	Grp 1
Mean	15.5000

-----

SUBSET 3

Group	Grp 2
Mean	18.3333

-----

MORE

SUBSET 4

Group	Grp 4
Mean	25.0000

---