

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Química Farmacéutica



**Tamizaje fitoquímico y evaluación de actividad biocida
de hojas, tallos y raíces de
*Haplophyton cinereum***

Por

Ana Judith Enríquez Valenzuela

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Guatemala
2005

Tamizaje fitoquímico y evaluación de actividad biocida
de hojas, tallos y raíces de
Haplophyton cinereum

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Química Farmacéutica



**Tamizaje fitoquímico y evaluación de actividad biocida
de hojas, tallos y raíces de
*Haplophyton cinereum***

Trabajo de graduación presentado por

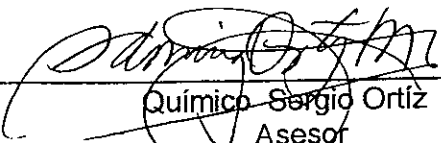
Ana Judith Enríquez Valenzuela

para optar al grado de
Licenciada en Química Farmacéutica

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Guatemala
2005

Vo.Bo. Comisión Evaluadora:

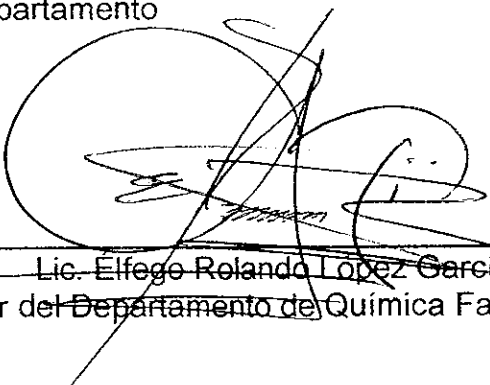
(f) 
Químico Sergio Ortiz
Asesor

(f) 
Doctora Elfriede de Pöll
Asesora

(f) 
Dr. Adrián Gil Méndez

(f) 
Lic. Éfego Rolando López

Vo.Bo. Director de Departamento

(f) 
Lic. Éfego Rolando López García
Director del Departamento de Química Farmacéutica

Fecha de aprobación: 26 de mayo de 2005

*A mi madre,
a Maru y Chichi.*

AGRADECIMIENTOS

A los investigadores Sergio Ortíz y Elfriede Pöhl, por todas sus enseñanzas y su apoyo incondicional.

Al Doctor Adrián Gil, por su disponibilidad para ayudarme y facilitarme los materiales y equipo necesarios.

Al señor Reginaldo Pichiyá, encargado de la sección de Entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

A los señores encargados de la bodega del Departamento de Química de la Universidad del Valle de Guatemala, especialmente a Willy, Jesús y Héctor.

A Isabel Enríquez (mi madre), Maru, Dámaris, Lucía, Celia, Christian, Álvaro y Mario por su cariño, amistad y ayuda invaluable para llevar a cabo la investigación.

CONTENIDO

	Páginas
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras	x
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL	2
A. Antecedentes	2
B. Justificación	3
C. Planteamiento del problema	4
D. Alcances y límites	4
III. MARCO TEÓRICO	5
IV. MARCO METODOLÓGICO	10
A. Objetivos	10
B. Hipótesis	10
C. Población	10
D. Muestra	10
E. Procedimiento	11
F. Diseño de investigación	17
G. Análisis estadístico	17
V. MARCO OPERATIVO	18
A. Recabación y tratamiento de datos	18
B. Recursos	18
C. Aspectos económicos	19

VI.	RESULTADOS	20
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
VIII.	CONCLUSIONES	48
IX.	RECOMENDACIONES	50
X.	BIBLIOGRAFÍA	51
XI.	ANEXOS	
	Anexo 1	53
	Anexo 2	63
	Anexo 3	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Solventes utilizados para elución de extractos en columna cromatográfica	16
2. Apariencia de extractos obtenidos y observaciones adicionales	20
3. Peso de extractos a grado miel obtenidos	20
4. Tamizaje de extractos etéricos	20
5. Tamizaje de extractos etanólicos	21
6. Tamizaje de extractos acuosos	21
7. Nauplios muertos en cada extracto evaluado	22
8. Resultados finales de citotoxicidad contra <i>Artemia salina</i>	22
9. Larvas de <i>Aedes aegypti</i> muertas en cada extracto evaluado	23
10. Resultados finales de bioactividad contra <i>Aedes aegypti</i>	23
11. Caracterización de fracción hexánica de extracto etérico de raíces	24
12. Caracterización de fracción clorofórmica de extracto etérico de raíces	25
13. Caracterización de fracción acetato de etilo de extracto etérico de raíces	26
14. Caracterización de fracción diclorometano de extracto etérico de raíces	26
15. Caracterización de fracción acetona de extracto etérico de raíces	28
16. Caracterización de fracción etanólica de extracto etérico de raíces	28
17. Caracterización de fracción metanólica de extracto etérico de raíces	29
18. Caracterización de fracción hexánica de extracto etanólico de raíces	30
19. Caracterización de fracción clorofórmica de extracto etanólico de raíces	30
20. Caracterización de fracción acetato de etilo de extracto etanólico de raíces	31
21. Caracterización de fracción diclorometano de extracto etanólico de raíces	33
22. Caracterización de fracción acetona de extracto etanólico de raíces	33
23. Caracterización de fracción etanólica de extracto etanólico de raíces	34
24. Caracterización de fracción metanólica de extracto etanólico de raíces	35
25. Caracterización de fracción hexánica de extracto etanólico de tallos	36
26. Caracterización de fracción clorofórmica de extracto etanólico de tallos	37
27. Caracterización de fracción acetato de etilo de extracto etanólico de tallos	37
28. Caracterización de fracción diclorometano de extracto etanólico de tallos	39
29. Caracterización de fracción acetona de extracto etanólico de tallos	40
30. Caracterización de fracción etanólica de extracto etanólico de tallos	41
31. Caracterización de fracción metanólica de extracto etanólico de tallos	41
32. Coloraciones obtenidas con reveladores Mágico 1 y Mágico 2	64
33. Reactivos utilizados para tamizaje fitoquímico y precio estimado	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Haplophyton cinereum	6
2. Diagrama del procedimiento general	11
3. Diagrama del procedimiento seguido en la preparación de diluciones para la evaluación de citotoxicidad contra <i>Artemia salina</i>	15
4. Fracción hexánica 1	24
5. Fracción hexánica 2	24
6. Fracción cloroformo 1	25
7. Fracción cloroformo 2	25
8. Fracción acetato de etilo 1	26
9. Fracción acetato de etilo 2	26
10. Fracción diclorometano 1	27
11. Fracción diclorometano 2	27
12. Fracción acetona 1	27
13. Fracción acetona 2	27
14. Fracción etanol 1	28
15. Fracción metanol 1	29
16. Fracción hexano 3	30
17. Fracción hexano 4	30
18. Fracción cloroformo 3	31
19. Fracción cloroformo 4	31
20. Fracción acetato de etilo 3	32
21. Fracción acetato de etilo 4	32
22. Fracción diclorometano 3	32
23. Fracción diclorometano 4	32
24. Fracción acetona 3	33
25. Fracción acetona 4	33
26. Fracción etanol 2	34
27. Fracción etanol 3	34
28. Fracción metanol 2	35
29. Fracción hexano 5	36
30. Fracción hexano 6	36
31. Fracción cloroformo 5	37
32. Fracción cloroformo 6	37

33. Fracción acetato de etilo 5	38
34. Fracción acetato de etilo 6	38
35. Fracción diclorometano 5	38
36. Fracción diclorometano 6	38
37. Fracción acetona 5	39
38. Fracción acetona 6	39
39. Fracción etanol 4	40
40. Fracción etanol 5	40
41. Fracción metanol 3	41
42. Fracción metanol 4	41

RESUMEN

Este trabajo de investigación se desarrolló con el propósito de contribuir al estudio fitoquímico y biológico de las plantas que podrían tener algún uso popular en Guatemala.

Haplophyton cinereum es una especie de la familia de las Apocináceas, distribuida y conocida en las zonas áridas de Estados Unidos, México y Guatemala. En México y Estados Unidos, se conoce desde la antigüedad por sus propiedades insecticidas; sin embargo, hasta la fecha, en Guatemala crece como una planta silvestre y no se reporta ningún uso popular. Para el estudio, se recolectó la especie que, de forma silvestre, se encuentra en el Municipio El Rancho, del Departamento de El Progreso para su caracterización fitoquímica y evaluación de actividad biocida.

Mediante el tamizaje fitoquímico de raíces, tallos y hojas, se determinó que la planta posee abundantes alcaloides, compuestos esteroidales, galotaninos y taninos catequínicos. Se encontraron también, lípidos, agliconas de esteroides o triterpenos, esteroides y triterpenos no saponificables, carotenoides saponificables y no saponificables, agliconas de flavonas, cumarinas, poliurónidos, flavonoles y flavononas.

Se determinó que los extractos etanólicos de tallos y raíces y el extracto etérico de raíces tienen un potencial insecticida muy potente contra *Aedes aegypti* con valores de LD₅₀ igual a 266.8 µg/ml, 69.1 µg/ml y 233.9 µg/ml respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos de los bioensayos, se seleccionaron para caracterización por cromatografía en capa fina, los extractos de raíces, tallos y hojas. Las cromatoplasmas confirmaron los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico.

I. INTRODUCCIÓN

Los insecticidas constituyen el sector más pequeño del campo de los pesticidas, que con mucha frecuencia son cuestionados por sus múltiples efectos adversos a la salud y el ambiente.

En países como Guatemala, en el que las actividades agrícolas son la base de la economía, el control de plagas es un factor determinante en el éxito dichas actividades. Esta consideración orienta hacia la búsqueda de moléculas que podrían funcionar como un insecticida, que además de ser efectivo, sea también menos dañino.

Haplophyton cinereum, es una planta distribuida y conocida en las zonas áridas de Estados Unidos, México y Guatemala. En México y Estados Unidos, se conoce desde la antigüedad por sus propiedades insecticidas. En Guatemala se encuentra como una planta silvestre y no se reporta ningún uso popular.

Hasta la fecha, no se cuenta con estudios que documenten la composición fitoquímica de *Haplophyton cinereum* o estudios que comprueben la actividad que popularmente se atribuye en otros países.

En este trabajo de tesis, se caracterizó la composición química de *Haplophyton cinereum* y comprobó la actividad biocida. Para el efecto, se efectuó un tamizaje fitoquímico (reacciones químicas y cromatografía en capa fina), de las raíces, tallos y hojas, utilizando plantas recolectadas en El Rancho, Municipio del Departamento de El Progreso y se llevaron a cabo dos ensayos biológicos, uno con *Artemia salina*, para comprobar su actividad biocida, y otro con larvas de *Aedes aegypti*, específico en la determinación de actividad insecticida.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes

Los estudios fitoquímicos se llevan a cabo para caracterizar una planta en cuanto a sus metabolitos secundarios, aislar los principios activos de interés, evaluar su bioactividad y determinar su estructura química. Se orientan a potenciales actividades farmacológicas de los productos naturales y sus derivados, interacción con insectos plaga, etcétera (6).

En cuanto al estudio de la actividad insecticida de un producto vegetal, el principal objetivo es incrementar el conocimiento de los mecanismos de regulación para luego sintetizar análogos que mimeticen las bioactividades que se detecten (6). Para tal efecto, en estudios preliminares se pueden utilizar muestras de 1 a 100 gramos y orientarse a localizar cualitativa o cuantitativamente uno o varios principios activos. Los métodos pueden ser:

- Histológicos. Basados en la observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores, den precipitados, etcétera (4).
- Químicos. Tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados, etcétera (4).
- Físicoquímicos. Por medio del uso de cromatografía o métodos espectroscópicos (4).
- Biológicos. Para determinar el efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupos de ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, etcétera (4).

La cromatografía en capa fina es considerada por muchos investigadores como un método rápido y efectivo en la caracterización de metabolitos secundarios. El botánico ruso Mikhail Tswett estableció las ventajas de la cromatografía y fue el primero en utilizar este término. Ismailov y Scraiber utilizaron láminas de vidrio para colocar capas muy delgadas de alúmina y luego aplicaron extractos vegetales, dando así la primera forma de Cromatografía de Capa Fina. Egon Stahl (1956) dio el nombre de Cromatografía de Capa Fina, estandarizó los procedimientos, equipos y adsorbentes dando un auge a la técnica simple, a bajo costo y eficiente (6). Actualmente se considera que estas pruebas son convenientes en los estudios fitoquímicos para averiguar el número de componentes y, por la intensidad de las manchas, su abundancia relativa (4).

A la luz de los avances en botánica, fitoquímica, farmacología y toxicología, el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades de las plantas debe ser constatado y validado por ensayos biológicos que garanticen seguridad y eficiencia. Es por ello que en los últimos años, el desarrollo de ensayos biológicos ha cobrado auge. En este contexto, el ensayo de una planta o

extracto, contra *Artemia salina* es un método sencillo y de bajo costo que permite medir el grado de toxicidad y comprobar la actividad de algunos pesticidas, anestésicos, micotoxinas y toxinas de dinoflagelados (3). El procedimiento fue originalmente descrito por Michael *et al.*, (10) y ha sido adaptado por Meyer *et al.*, (9). McLaughlin y otros investigadores lo describen como un útil bioensayo en la investigación química y biológica de productos naturales (8).

McLaughlin *et al.* han utilizado el bioensayo con larvas de *Aedes aegypti* para evaluar la actividad de pesticidas procedentes de extractos botánicos. En el ensayo se determina el valor de LC₅₀. La determinación de la LC₅₀, se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias y en el desarrollo de pesticidas se utiliza para determinar los límites de resistencia de insectos, por ejemplo, ante ciertos biocidas. En la investigación fitoquímica valiéndose del principio de que farmacología es simplemente toxicología a bajas concentraciones o toxicología es farmacología a concentraciones altas se puede correlacionar la bioactividad con el valor de la LC₅₀ y al mismo tiempo su grado de toxicidad. En el caso de sustancias biocidas, las sustancias puras, cuyo LC₅₀ ≤ 1.0 µg/ml son valiosas para fines comerciales (8).

B. Justificación

El principal motivo en la búsqueda de la aplicación de metabolitos secundarios vegetales para el control de plagas, es sin duda el incremento acelerado que se ha dado en los últimos años al uso de insecticidas sintéticos, los cuales representan un riesgo para la salud del hombre y la conservación del ambiente.

Dado que la síntesis y concentración de metabolitos secundarios puede variar entre plantas de la misma especie (en cuanto a su clasificación botánica actual), es importante que en Guatemala se realicen investigaciones que contribuyan al estudio de la biodiversidad con el fin de encontrar sustancias biocidas, en particular insecticidas de origen natural, que permitan un control de plagas efectivo, de bajo costo y más seguro.

El tamizaje fitoquímico de las raíces, tallos y hojas de *Haplophyton cinereum*, es importante como estudio preliminar para caracterizar los metabolitos secundarios contenidos en la planta existente en el país, puesto que hasta hoy no se cuenta con esta información. *Haplophyton cinereum* pertenece a la familia Apocynaceae, la cual incluye muchas especies venenosas ricas en alcaloides y otras especies utilizadas en medicina por su riqueza en glucósidos cardiotónicos.

Se espera que la caracterización de los constituyentes de *Haplophyton cinereum* y la comprobación de la actividad insecticida atribuida, aporte al descubrimiento de nuevas moléculas de interés.

El conocimiento de las propiedades de la flora guatemalteca, a la vez que favorece una explotación racional de los recursos naturales que posee el país, ofrece una alternativa a la población, no sólo terapéutica, sino también productiva.

C. Planteamiento del problema

No se ha documentado la composición fitoquímica ni se ha comprobado científicamente la actividad biocida de *Haplophyton cinereum* existente en Guatemala.

D. Alcances y límites

La actividad biocida debida a un metabolito secundario o a la combinación de varios en un extracto, es aplicable para otros extractos botánicos siempre y cuando los compuestos sean los mismos y las concentraciones no varíen significativamente.

La caracterización fitoquímica de *Haplophyton cinereum* es válida para la especie que se encuentra de forma silvestre en el bosque espinoso de El Rancho, Municipio de El Progreso y que se recolecta en época lluviosa, entre mayo y julio.

III. MARCO TEÓRICO

A. Estudios de detección

1. **Etnobotánica.** La etnobotánica es la ciencia que estudia el uso de la flora de una región particular. Para conocer la relación entre la flora de un lugar y el hombre, es necesario el contacto directo con los habitantes de la región a través de una comunicación fluida que permita obtener información confiable que será reproducida lo mas fielmente posible. Por lo tanto es necesario realizar actividades como: conocer plenamente el lugar por medio de investigaciones bibliográficas o directamente a las fuentes reales que brinden información; realizar encuestas y caminatas botánicas para recolectar información y ejemplares; secar, herborizar, determinar botánicamente, conservar y enriquecer (2).

En Guatemala, la riqueza florística y el conocimiento popular sobre etnobotánica son recursos que no se han aprovechado a plenitud por las condiciones sociales, culturales, políticas y económicas prevalecientes (2).

El conocimiento sobre las prácticas tradicionales de curación y agricultura se ha visto limitado porque la mayor parte ha sido transmitido en forma oral y no existe una metodología consistente, ni el recurso humano y financiero disponible, por lo que es difícil plasmar este conocimiento en documentos confiables accesibles a la población. Para la equiparación y uso oficial de los medicamentos fitoterapéuticos es necesario recabar el conocimiento y prácticas populares en forma precisa a través de una metodología que haga posible la recuperación de las prácticas de curación y los recursos terapéuticos empleados, que permitan su validación científica e integración a los sistemas oficiales de salud (2).

B. *Haplophyton cinereum*

1. **Sinónimos.** *Haplophyton cinereum* (A. Rich, Woodson); *Haplophyton cimicidum* A. DC.

2. **Nombres comunes.** En México la planta se conoce desde la antigüedad por sus propiedades insecticidas, recibiendo así el nombre "Actimpatli", que significa "Mata moscas" (14).

Por el uso popular atribuido, para matar cucarachas, en Estados Unidos también es conocida como "Arizona Cockroach", "Hierba de la Cucaracha" o "Raíz de la Cucaracha" (13).

En Guatemala, no se reporta ningún nombre común (Pöhl compers).

3. Descripción. *Haplophyton cinereum* es un arbusto de 50 cm de alto o menos, generalmente muy ramificado y cuyas ramas son herbáceas pero la base del tallo es leñosa (14).

Las hojas son alternas y ocasionalmente opuestas con cortos y finos pecíolos. Son angostas y oblongo – elípticas de 2 a 6 cm de largo y entre 1 y 3.5 cm de ancho; obtusas o redondeadas de la base . El haz y frecuentemente el envés están cubiertos de finos y rígidos tricomas (14).

Las flores son gamopétalas, de cáliz linear lanceolado de 5 a 8 mm de largo. La corola consta de 5 pétalos amarillo pálido. Los pétalos forman un tubo de 6 a 9 mm de largo donde se insertan de 4 a 5 estambres y el ovario de la flor con un pistilo que no sobresale de la corola (14).

Los frutos son vainas largas que en su interior contienen las pequeñas semillas negras de la planta (14).

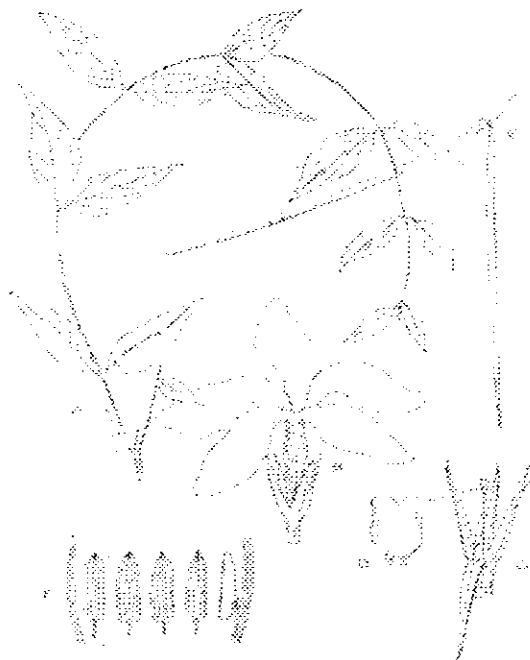


Figura No.1. *Haplophyton cinereum*. (A) Vista general; (B) Detalle de flor; (C) Detalle de cáliz y pistilo; (D) Detalle de estigma; (E) Detalle de fruto; (F) Detalle de estambres en la posición de una corola disectada (14).

4. Hábitat y distribución. Se cree que la planta es originaria de Cuba, y actualmente se encuentra adaptada y distribuida en los suelos áridos y expuestos al sol de Estados Unidos (Arizona, Nuevo México y Arizona), México (Monterrey y Sonora) y Guatemala (14). También se reporta en Kenia, Zambia y Tanzania (13).

En Guatemala crece en altitudes de 200 a 1300 m en matorrales húmedos o secos; es abundante en muchos lugares del departamento de Zacapa en época lluviosa mientras que durante la estación seca, se marchita y no encuentra mucho (14).

5. Procedencia para el estudio. Etnobotánica.

6. Usos etnobotánicos. En México, se prepara una decocción de las raíces y luego de mezclarlo con melaza macerada es utilizado para matar mosquitos, moscas, piojos, cucarachas y otros insectos (14).

En Arizona, las hojas se secan y se prepara una infusión o bien una loción que se utiliza para matar los mosquitos, cucarachas y piojos (7).

En Guatemala no se conoce ningún uso (Pöll compers).

C. Metabolitos secundarios vegetales

Metabolito secundario, es una sustancia que se produce por rutas metabólicas secundarias del vegetal que normalmente se consideran como no esenciales para el funcionamiento de la célula vegetal (4).

Frecuentemente los metabolitos secundarios son responsables de efectos específicos que un vegetal ejerce sobre otros organismos, por lo que con frecuencia el término “principio activo” se utiliza como un sinónimo de metabolito secundario (4).

Es importante notar, que la síntesis de metabolitos secundarios de una planta, están relacionados con su entorno: animal u otros microorganismos, vegetal, disposición de nutrientes y condiciones climáticas del hábitat. Es por ello, que plantas de distintas especies pueden utilizar un mismo metabolito secundario para adaptarse a su hábitat, mientras que plantas de una misma especie (en cuanto a su clasificación botánica actual), pueden sintetizar metabolitos secundarios distintos, o en distintas concentraciones, como un mecanismo de defensa específico a su nicho (4).

Además, los metabolitos secundarios no se distribuyen de una manera uniforme en la planta, sino en estructuras específicas como en flores, hojas, raíces, tallos o frutos (4).

D. Bioensayos

En términos generales un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos, a su vez se puede señalar como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de una sustancia o material, es medida en términos de la respuesta biológica que produce (9). Los datos obtenidos de un bioensayo utilizan una estadística cuantil, la cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo de n unidades experimentales, donde r unidades responden y $(n - r)$ no lo hacen. El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población (10).

1. **Bioensayo para evaluar citotoxicidad contra *Artemia salina*.** *A. salina* es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas por lo que puede medirse fácilmente la citotoxicidad y se utiliza para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, es una prueba útil aunque no es selectiva para ninguna molécula química y su correlación con otras actividades no ha sido bien estudiada (11).

Como prueba de pretamizaje resulta idónea principalmente en lo referente a la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, citotóxicas, antimicrobianas y/o plaguicidas (10).

El ensayo usando *A. salina* es aplicable para detectar fototoxicidad en plantas que contienen cumarinas, ya que detecta la presencia de compuestos bioactivos en extractos, guía el fraccionamiento químico y se inicia con la caracterización biológica de un compuesto aislado (11). El método también tiene importante correlación con la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* ya que sirve como un ensayo de pretamizaje por su simplicidad y la facilidad de evaluar gran número de plantas, así también por la sensibilidad que demuestra la *A. salina* ante cantidades pequeñas de extractos vegetales (15).

2. **Bioensayo para pesticidas (YFM).** Existen aproximadamente 3200 especies de mosquitos (Phylum Artropoda, Clase Insecta, Orden Dyttera, Familia *Culicidae*). Estos son clasificados en tres subfamilias: *Anaphelinae*, *Culicinae* y *Toxorhynchitinae*. En este caso, se hace referencia a una de las tres subfamilias: la subfamilia *Culicinae* que se clasifica en cinco tribus que son: *Aedini*, *Culicini*, *Culusetini*, *Mansonii* y *Sabethini*. El *A. aegypti* es una especie perteneciente a la tribu *Aedini* (2).

El ensayo (YFM), por sus siglas en inglés, "Yellow Fever Mosquito", es un procedimiento sencillo, validado para determinar la actividad pesticida de extractos botánicos, fracciones y compuestos aislados (8).

Después de incubar los huevecillos se continúa la incubación de las larvas por cuatro días. Las larvas que sobreviven a esta etapa de desarrollo se utilizan para el ensayo (8).

Los extractos, fracciones o compuestos se evalúan en cinco soluciones, empezando en una concentración de 5000 $\mu\text{g/ml}$. Después de cuatro días de incubación con el material a evaluar, se hace un conteo de las larvas que sobreviven y los datos se analizan para determinar el valor de LC_{50} con un límite de 95% de confianza (8).

Las sustancias puras, cuyo $\text{LC}_{50} \leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ son considerablemente valiosas para fines comerciales (8).

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. Caracterizar, como un estudio preliminar, los metabolitos secundarios presentes en raíces, tallos y hojas de *Haplophyton cinereum*, recolectadas en El Rancho, Municipio del Departamento de El Progreso, mediante tamizaje fitoquímico.
2. Determinar la actividad biocida de los extractos etérico, etanólico y acuoso de raíces, hojas y tallos de *Haplophyton cinereum* por medio de la evaluación de citotoxicidad contra *Artemia salina*.
3. Determinar la actividad insecticida de los extractos de interés mediante un ensayo biológico con larvas de *Aedes aegypti*.
4. Caracterizar los metabolitos secundarios de los extractos de interés por medio de cromatografía en capa fina.

B. Hipótesis

Al menos un extracto de las hojas, tallos o raíces de *Haplophyton cinereum* presenta actividad biocida contra *Artemia salina* y *Aedes aegypti*, posible de caracterizar mediante tamizaje fitoquímico.

C. Población

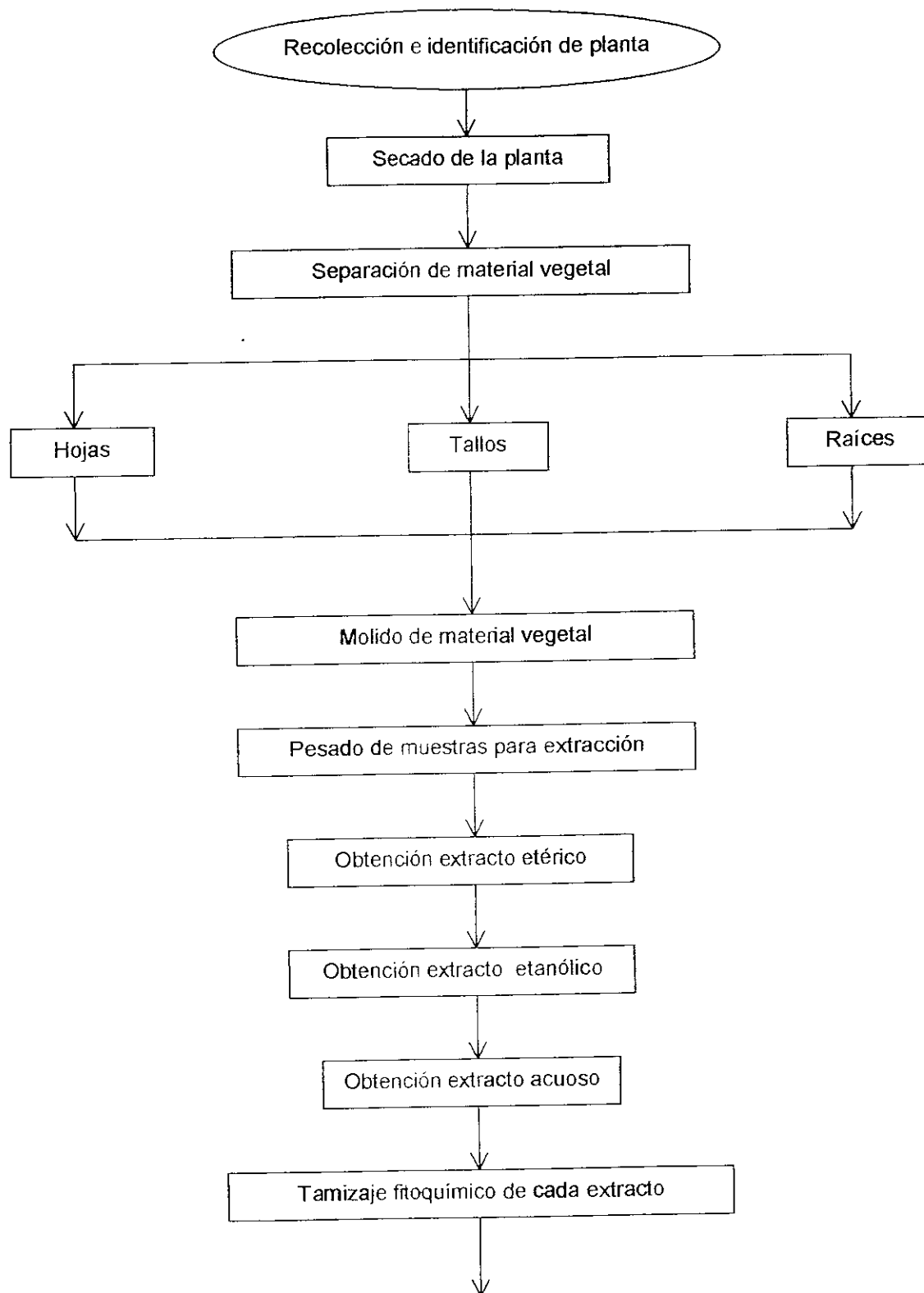
Plantas de *Haplophyton cinereum* que de forma silvestre se encuentran en el bosque espinoso, de 200 metros cuadrados localizado en el kilómetro 87.5 Carretera al Atlántico en el Municipio de El Rancho, Departamento de El Progreso.

D. Muestra

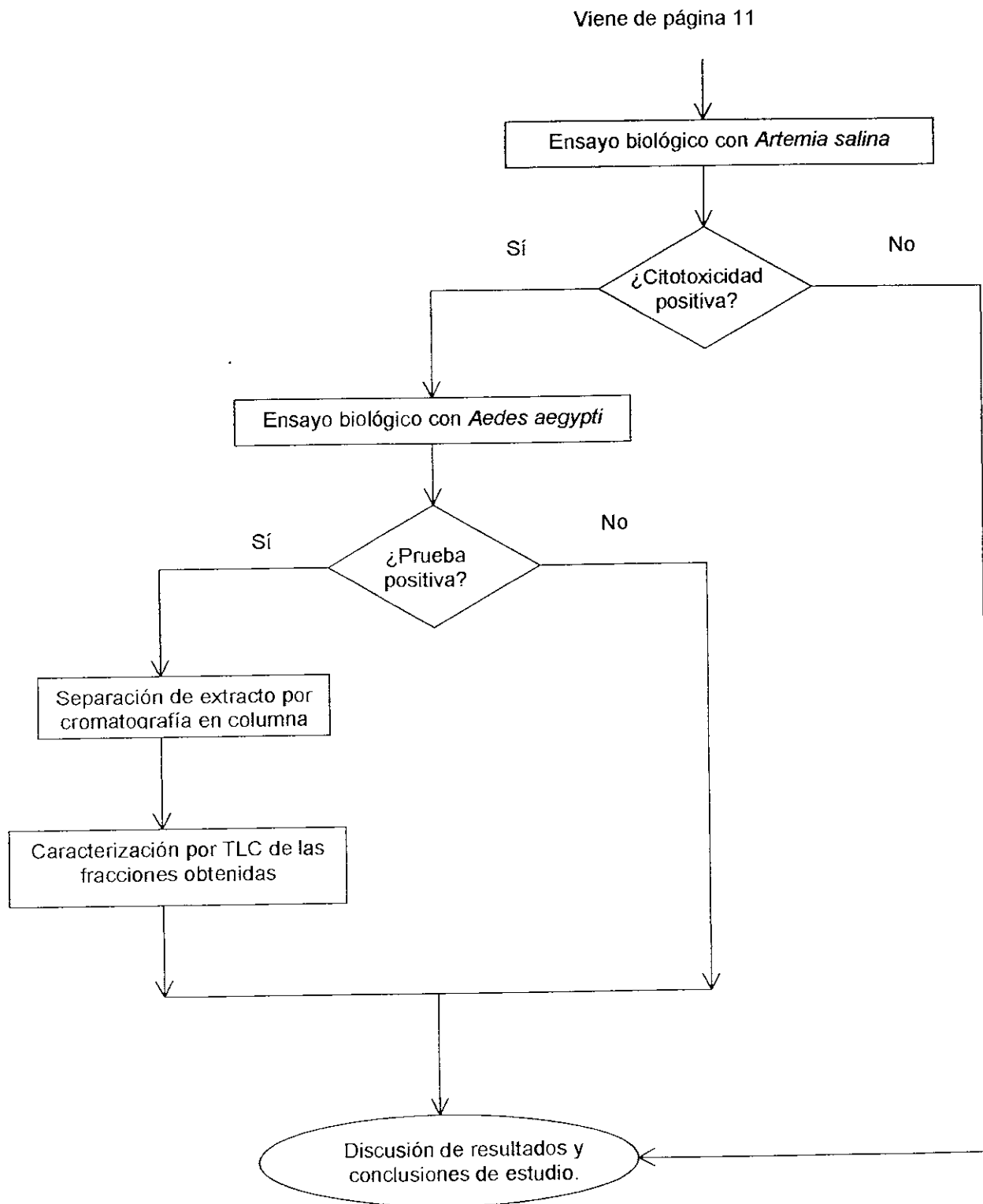
Extractos de tres distintas polaridades obtenidos de raíces, tallos y hojas de *Haplophyton cinereum*, recolectadas en el kilómetro 87.5 Carretera al Atlántico, El Rancho, Municipio del Departamento de El Progreso.

E. Procedimiento

Figura No. 2. Diagrama de procedimiento general.



Continúa en página 12



1. Recolección de la planta. En el kilómetro 87.5 Carretera al Atlántico, El Rancho, Municipio del Departamento de El Progreso, se delimitó un área de 625 metros cuadrados de bosque espinoso. El área fue dividida en cuadrados de 5X5 metros cuadrados cada uno y se realizó un muestreo aleatorio para seleccionar 3 cuadros de terreno.

En cada uno de los cuadros seleccionados, se recolectaron 5 plantas completas (raíz, tallos, hojas, flor y fruto) de aproximadamente 0.5 metros cada una.

Todas las plantas fueron recolectadas entre el 13 y 14 de junio de 2004. La recolección se llevó en ambos casos, por la mañana. Luego de ser recolectadas, las plantas se trasladaron en sacos de tela.

La planta fue identificada como *Haplophyton cinereum* por la Doctora Elfriede de Pöll.

2. Secado de la planta. Se separaron las flores y frutos de las plantas separadas. Los tallos, hojas y raíces de las plantas recolectadas fueron entonces colocadas sobre bandejas de papel y colocadas en horno Memmert R-10 a 30°C. Se consideraron secas cuando el material era quebradizo al tacto (48 horas).

3. Separación de raíces, tallos y hojas. Se separaron las tres partes (raíces, hojas y tallos) de las plantas secas, cortando la raíz desde el inicio de la base leñosa del tallo.

4. Molido de las partes separadas. Se molieron por separado las raíces, tallos y hojas en licuadora industrial, a velocidad media. 50 gramos de hojas se molieron por 5 minutos mientras que 50 gramos de raíces y tallos se molieron por 10 minutos (por la dureza del material vegetal). Por separado, se tamizó el material vegetal por mesh 20.

El material molido y tamizado fue almacenado por separado en bolsas plásticas con cierre hermético. Las bolsas se almacenaron en cajas de cartón corrugado con sobres de sílica gel a temperatura ambiente.

5. Pesado de las muestras de las partes molidas. Por separado se pesaron 25.00 g de las muestras de raíces, tallos y hojas. Estas muestras fueron colocadas de inmediato en el sistema para extracción etérea.

6. Extracción de las muestras.

a. **Extracto etérico.** Se extrajeron las tres muestras por medio de aparato soxhlet utilizando éter etílico como solvente para la extracción. Se concluyó la extracción en un tiempo promedio de 48 horas de reflujo continuo y 200 horas de maceración. El extracto se filtró con papel filtro # 40. Esta extracción no fue exhaustiva, el tiempo fue determinado con base en estudios previos.

b. **Extracto etanólico.** Se obtuvieron los extractos por medio de reflujo con etanol del marco, previamente desengrasado. Se concluyó la extracción en un tiempo promedio de 10 horas de reflujo continuo y 60 horas de maceración. Se filtró el extracto con papel filtro # 40.

En los extractos de tallos y raíces se observó la formación de cristales. Los cristales fueron separados del extracto mediante filtración con vacío, lavados con etanol y guardados en viales sellados.

c. **Extracto acuoso.** El marco desengrasado y extraído con etanol, se extrajo luego por medio de reflujo con agua destilada. Se concluyó la extracción en un tiempo promedio de 10 horas de reflujo continuo y 60 horas de maceración. Se filtró el extracto con papel filtro # 40.

7. **Concentración y pesado de los extractos.** Se concentraron los extractos usando un rotavapor Büchi RE-111 destilando a presión reducida, a una temperatura no mayor de 30°C para los extractos etéricos, 60°C en los extractos etanólicos y 80°C en los acuosos. Se destiló hasta que ya no se recolectó solvente destilado. Luego se pesó el extracto, se colocó en vial de vidrio y se cerró en ambiente de nitrógeno.

8. **Tamizaje fitoquímico de cada una de los extractos.** Se pesó 0.25 g de los extractos concentrados y se diluyó cada muestra con 50 ml de éter etílico, etanol o agua según fuera el caso. Con cada muestra se realizó el tamizaje fitoquímico siguiendo la metodología propuesta por Ortiz, 2003 (Véase Anexo 1).

9. **Evaluación de la actividad citotóxica contra *Artemia salina*.** Todos los extractos y cristales aislados de extractos etanólico de tallos y raíces, se evaluaron según la metodología de McLaughlin *et al.*, 1998 bajo las siguientes condiciones:

a. Los huevecillos de *Artemia salina*, proveídos por el acuario "Mundo Animal", fueron incubados en cajas Petri de plástico por 48 horas.

b. 20.00 mg de los extractos etéricos, etanólicos y cristales aislados fueron disueltos en 2.0 ml de etanol y a partir de esta solución madre fueron preparadas las demás diluciones de prueba como se muestra a continuación en la figura No.3. En cada caso se corrió un blanco preparado con 2.0 ml de etanol como solución madre.

c. 20.00 mg de los extractos acuosos fueron disueltos en 2.0 ml de agua destilada y a partir de esta solución madre fueron preparadas las demás diluciones evaluadas (Véase figura No.2). El blanco en cada caso, se preparó con 2.0 ml de agua destilada.

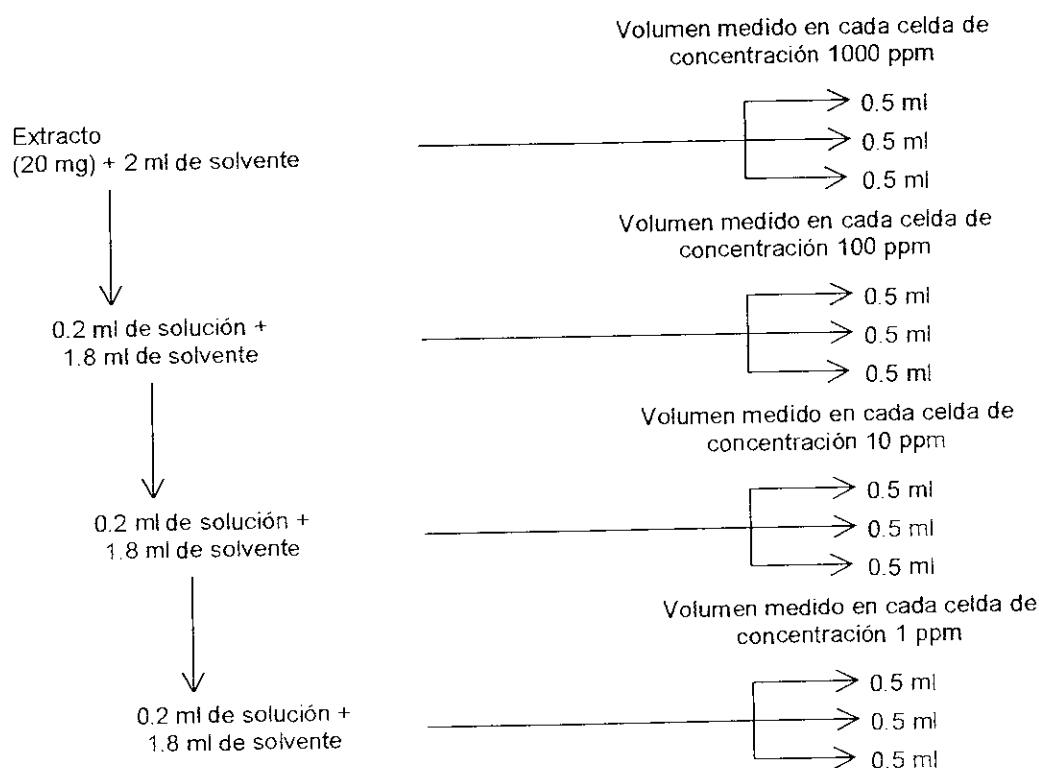


Figura No. 3. Diagrama del procedimiento seguido en la preparación de diluciones para evaluación de citotoxicidad contra *Artemia salina*. Dilución alterna propuesta por McLaughlin *et al.*, 1998.

- d. Los nauplios fueron incubados en las muestras, en tubos de ensayo.

10. Evaluación de la actividad insecticida contra *Aedes aegypti*. Cada uno de los extractos y los cristales aislados de los extractos etanólicos de tallos y raíces, se evaluaron según la metodología propuesta por McLaughlin *et al.*, bajo las siguientes condiciones:

- a. Las larvas de *Aedes aegypti* fueron proporcionadas por la sección de Entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- b. Para incubar las larvas se utilizaron placas plásticas de 18 celdas cada una.

11. Caracterización de extractos por cromatografía en capa fina

a. **Fraccionamiento de extractos en columna cromatográfica.** Se seleccionaron los extractos con un valor de actividad insecticida significativamente mayor a los demás, para caracterización por TLC. Para obtener una mejor resolución en la caracterización, se realizó una separación por columna cromatográfica empacada con sílica gel mesh 60. Se obtuvieron fracciones de acuerdo a los solventes utilizados (véase cuadro No.1). Cada fracción se obtuvo al eluir exhaustivamente con cada solvente.

Cuadro No.1. Solventes utilizados para elución de extractos en columna cromatográfica.

Fracción	Extracto		
	Etérico de raíces	Etanólico de tallos	Etanólico de hojas
Fracción 1	Hexano	Hexano	Hexano
Fracción 2	Cloroforno	Cloroforno	Cloroforno
Fracción 3	Acetato de etilo	Acetato de etilo	Acetato de etilo
Fracción 4	Diclorometano	Diclorometano	Diclorometano
Fracción 5	Acetona	Acetona	Acetona
Fracción 6	Etanol	Etanol	Etanol
Fracción 7	Metanol	Metanol	Metanol
Fracción 8	Metanol – Agua (1:1)	Metanol – Agua (1:1)	Metanol – Agua (1:1)
Fracción 9	Agua	Agua	Agua

b. **Caracterización por TLC.** Se utilizó como fase estacionaria Gel de sílice 60F y como fase móvil el sistema de disolventes con el que se obtuvo una mejor resolución. Se colocaron tres o dos aplicaciones en cada placa y se comieron tres placas por muestra:

- Sin revelador y observada bajo lámpara UV.
- Revelada con "Revelador mágico 1"
- Revelada con "Revelador mágico 2"

Los cristales de los extractos etanólicos de tallos y raíces fueron disueltos, en etanol absoluto y caracterizados por TLC bajo las mismas condiciones de los extractos.

En la sección de resultados sólo se incluyen las placas reveladas.

F. Diseño de investigación

El estudio es de recabación de datos. Para la caracterización fitoquímica, se obtuvo de cada parte de la planta (hojas, tallos y raíces), tres extractos con polaridad creciente: etérico, etanólico y acuoso. A cada uno de los extractos se realizó un tamizaje fitoquímico. A todos los extractos se les determinó la actividad citotóxica contra *A. salina*, evaluando cada extracto por triplicado en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. A todos los extractos, se les determinó su poder biocida contra *A. aegypti*. El bioensayo se llevó a cabo en cinco diluciones, 1:10, empezando a una concentración de 5000 µg/ml.

En ambos casos, el valor de LC_{50} se determinó con el programa de computadora Finney. Los extractos que presentaron actividad insecticida fueron analizados por medio de cromatografía en capa fina. Para lograr una buena resolución de los extractos, se separó cada uno de ellos por cromatografía en columna utilizando los solventes citados en el cuadro No. 1, eluyendo exhaustivamente con cada uno de ellos.

G. Análisis estadístico

- Las pruebas de tamizaje fitoquímico no requieren de un análisis estadístico.
- La determinación de la LC_{50} requiere de la estadística cuantil, para lo cual fue necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Probit y las dosis suministradas en unidades logarítmicas conocidas como dosis metamétricas. Para el efecto se utilizó el programa de computadora Finney.
- El análisis de cromatoplasmas no requiere de un análisis estadístico.

V. MARCO OPERATIVO

A. Recabación y tratamiento de datos

1. **Tamizaje fitoquímico.** Siguiendo la metodología de Ortíz, se llevaron a cabo las reacciones químicas para cada extracto. Los resultados cualitativos de cada prueba se compararon con los resultados estándar respectivos.

2. **Bioensayos.** Siguiendo la metodología de McLaughlin *et al.*, se determinó el número de nauplios y larvas de *A. aegypti* vivas y muertas. Los valores de LC₅₀ fueron determinados por medio del programa de computadora Finney y los resultados comparados con los estándar, reportados por McLaughlin *et al.*

3. **Caracterización por cromatografía en capa fina.** De la separación de cada extracto se obtuvieron, por elución exhaustiva (determinado por TLC), nueve fracciones que se caracterizaron por TLC.

De las cromatoplasas se realizó un análisis iconográfico. Se compararon los resultados obtenidos con los resultados estándar del "Revelador Mágico" (Véase Anexo II).

B. Recursos

1. Recursos Humanos

- Autora del trabajo: Ana Judith Enríquez Valenzuela.
- Asesores: Químico Sergio Ortíz y Doctora Elfriede de Pöll.

2. Recursos materiales

a. **Institucionales.** Todo el procedimiento de tamizaje y caracterización por cromatografía en capa fina se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Química de Productos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala. Equipo, materiales y reactivos fueron proporcionados por el Departamento de Química de la Universidad.

La incubación de larvas fue llevada a cabo por la Sección de Entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

b. **Materiales y equipo**

- Reactivos y equipo del laboratorio de Química de Productos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala.
- Sal marina.
- Huevecillos de *A. salina*
- Revelador "Mágico" proporcionado por Químico Sergio Ortíz.
- Larvas de *A. aegypti* de cuatro días de vida, incubadas por la sección de Entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

C. Aspectos económicos

Los reactivos para tamizaje fitoquímico y depreciación por cristalería, equipo y otros suministros de laboratorio, fueron financiados por el Departamento de Química de la Universidad del Valle de Guatemala, con la aprobación del Director del Departamento, Doctor Adrián Gil.

A excepción de los de reactivos para tamizaje fitoquímico y depreciación por cristalería, equipo y otros suministros de laboratorio, los gastos fueron cubiertos por la autora (Ana Judith Enríquez Valenzuela).

VI. RESULTADOS

A. Obtención de extractos

Cuadro No.2. Apariencia de extractos obtenidos y observaciones adicionales

Tipo de extracto	Marco		
	Hojas	Tallos	Raíces
Etérico	Color verde muy intenso. Elástico.	Color verde muy intenso y elástico.	Color verde muy claro. Oleoso.
Etanólico	Color verde. Muy elástico	Color verde. En 18 días se forman cristales.	Color café claro. En 16 días se forman cristales.
Acuoso	Color café claro.	Color café claro.	Color café claro.

Cuadro No.3. Peso de extractos a grado miel obtenidos

Tipo de extracto	Marco		
	Hojas	Tallos	Raíces
Etérico	0.93 g	0.84 g	0.68 g
Etanólico	1.54 g	1.76 g	1.55 g
Acuoso	0.99 g	0.90 g	1.13 g

B. Resultados de tamizaje fitoquímico

Cuadro No.4. Tamizaje de extractos etéricos

Prueba		Hojas	Tallos	Raíces
Saponificables	Aceites esenciales	Negativo	Negativo	Negativo
	Lípidos y ácidos grasos	Positivo	Positivo	Positivo
	Algiconas de Esteroles o triterpenos	Positivo	Positivo	Positivo
	Carotenoides	Positivo	Positivo	Positivo
No saponificables	Alcaloides como bases libres	Positivo	Positivo	Positivo
	Algiconas de flavonas	Positivo	Positivo	Negativo
	Emodoles	Negativo	Negativo	Negativo
	Cumarnas	Negativo	Negativo	Negativo
	Esteroles o triterpenos	Positivo	Positivo	Positivo
	Carotenoides	Positivo	Positivo	Positivo

Cuadro No.5 Tamizaje de extractos etanólicos

Prueba		Hojas	Tallos	Raíces
Extracto alcohólico	Galotaninos	Negativo	Positivo	Positivo
	Taninos catequínicos	Negativo	Positivo	Positivo
	Compuestos reductores	Negativo	Negativo	Negativo
	Sales de alcaloides	Positivo	Positivo	Positivo
	Alcaloides como bases cuatemanias, y aminas oxidadas	Positivo	Positivo	Positivo
	Confirmación presencia alcaloides	Positivo	Positivo	Positivo
Extracto hidrolizado	Confirmación bases cuatemanias y óxidos de aminos	Positivo	Positivo	Positivo
	Antracenósidos	Negativo	Negativo	Negativo
	Derivados de cumannas	Positivo	Positivo	Positivo
	Glicósidos esteroidales (cardiotónicos)	Positivo	Positivo	Positivo
	Flavonósidos	Negativo	Negativo	Negativo
	Antocianósidos	Negativo	Negativo	Negativo

Cuadro No.6. Tamizaje de extractos acuosos

Prueba		Hojas	Tallos	Raíces
Extracto acuoso	Poliurónidos	Positivo	Positivo	Positivo
	Compuestos reductores	Negativo	Negativo	Negativo
	Glúsidos	Positivo	Positivo	Positivo
	Saponinas	Negativo	Negativo	Negativo
	Alcaloides	Negativo	Negativo	Positivo
	Galotaninos	Positivo	Positivo	Positivo
	Taninos catequínicos	Negativo	Negativo	Negativo
Extracto hidrolizado	Antracenósidos	Negativo	Negativo	Negativo
	Cumannas	Positivo	Positivo	Positivo
	Glicósidos esteroidales	Negativo	Negativo	Negativo
	Flavononas	Positivo	Negativo	Negativo
	Flavonoles	Negativo	Positivo	Negativo
	Antocianósidos	Negativo	Negativo	Negativo

C. Actividad citotóxica contra *Artemia salina*

Cuadro No. 7. Nauplios muertos en cada extracto (de un total de 30 nauplios)

Extracto	Concentración de muestra (ppm)			
	1000 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	Blanco
Etérico de hojas	0	0	0	0
Etérico de tallos	11	1	0	0
Etérico de raíces	14	2	0	0
Etanólico de hojas	7	2	0	0
Etanólico de tallos	27	9	1	0
Etanólico de raíces	28	7	4	0
Acuoso de hojas	0	0	0	0
Acuoso de tallos	0	0	0	0
Acuoso de raíces	7	0	0	0
Cristales de extracto etanólico de tallos	1	0	0	0
Cristales de extracto etanólico de raíces	0	0	0	0

Cuadro No.8. Resultados finales de citotoxicidad contra *Artemia salina*

Extracto	LD ₅₀ (µg/ml)
Etérico de hojas	1.7011*10 ³⁸
Etérico de tallos	2057.0550
Etérico de raíces	1225.9730
Etanólico de hojas	8252.5730
Etanólico de tallos	181.8153
Etanólico de raíces	151.2919
Acuoso de hojas	1.7011*10 ³⁸
Acuoso de tallos	1.7011*10 ³⁸
Acuoso de raíces	5413.7360
Cristales de extracto etanólico de tallos	1.7011*10 ³⁸
Cristales de extracto etanólico de raíces	1.7011*10 ³⁸

D. Actividad insecticida contra *Aedes aegypti*

Cuadro No.9. Larvas muertas en cada extracto

Extracto	Concentración de muestra (ppm)					
	5000	500	50	5	0.5	Blanco
Etérico de hojas	0	0	0	0	0	0
Etanólico de hojas	3	1	0	0	0	0
Acuoso de hojas	0	0	0	0	0	0
Etérico de tallos	4	2	0	0	0	0
Etanólico de tallos	8	7	3	0	0	0
Acuoso de tallos	0	0	0	0	0	0
Etérico de raíz	8	8	5	1	0	0
Etanólico de raíz	8	8	6	2	0	0
Acuoso de raíz	5	2	0	0	0	0
Cristales de extracto etanólico de tallos	0	0	0	0	0	0
Cristales de extracto etanólico de raíces	0	0	0	0	0	0

Cuadro No.10. Resultados finales de bioactividad contra *Aedes aegypti*

Extracto	LD ₅₀ (µg/ml)
Etérico de hojas	1.7011*10 ³⁸
Etérico de tallos	5956.8990
Etérico de raíces	233.9391
Etanólico de hojas	19126.4300
Etanólico de tallos	266.7965
Etanólico de raíces	69.0678
Acuoso de hojas	1.7011*10 ³⁸
Acuoso de tallos	1.7011*10 ³⁸
Acuoso de raíces	5856.8890
Cristales de extracto etanólico de tallos	1.7011*10 ³⁸
Cristales de extracto etanólico de raíces	1.7011*10 ³⁸

E. Caracterización de extractos por cromatografía en capa fina:

A partir de los resultados del bioensayo con larvas de *Aedes aegypti*, se seleccionaron los extractos etanólicos de tallos y raíz y el extracto etérico de raíz para caracterización por TLC.

1. Extracto etérico de raíz

a. Fracción de hexano

- Sistema de disolventes: Acetato de etilo – Hexano – Benceno (1:6:1).
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 4 y Mágico 2 en figura No. 5.

Cuadro No: 11. Caracterización de fracción hexánica de extracto etérico de raíces

Figura No. 4		Figura No. 5	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.97	Naranja	0.97	Naranja
0.85	Naranja	0.85	Naranja
0.68	Lila	0.68	Café
0.31	Lila	0.31	Café
0.26	Lila	0.26	Café
0.04	Lila	0.04	Café

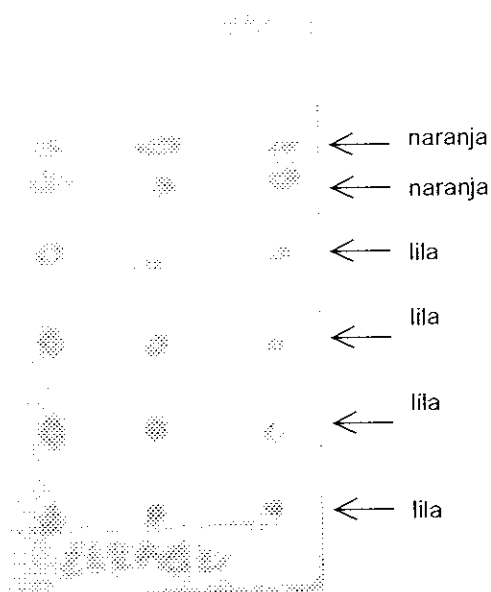


Figura No.4. Fracción hexánica 1.

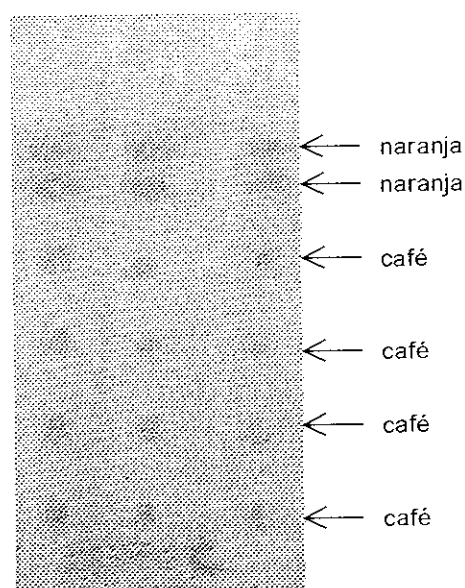


Figura No.5. Fracción hexánica No. 2.

b. Fracción de cloroformo

- Sistema de disolventes: Acetona – Diclorometano (1:1)

- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 6 y Mágico 2 en figura No. 7.

Cuadro No. 12. Caracterización de fracción clorofórmica de extracto etérico de raíces

Figura No. 6		Figura No. 7	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.88	Naranja	0.88	Naranja
0.82	Naranja	0.82	Naranja
0.61	Lila	0.78	Lila
0.08	Rojo	0.70	Lila
-	-	0.03	Café
-	-	0.08	Café

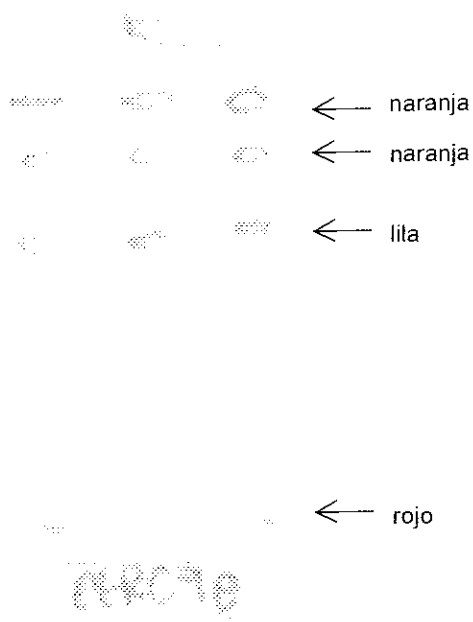


Figura No. 6. Fracción cloroformo 1.

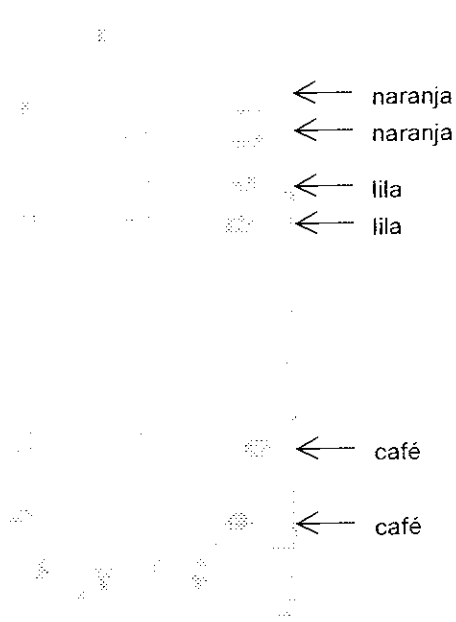


Figura No. 7. Fracción cloroformo 2.

c. Fracción de acetato de etilo

- Sistema de disolventes: Acetona – Diclorometano (5:3)

- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 8 y Mágico 2 en figura No. 9.

Cuadro No. 13. Caracterización de fracción acetato de etilo de extracto etérico de raíces

Figura No. 8		Figura No. 9	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.94	Naranja	0.94	Café
0.84	Naranja	0.84	Café
0.76	Morado	0.76	Café
0.65	Morado	0.65	Café
0.05	Rojo	-	-

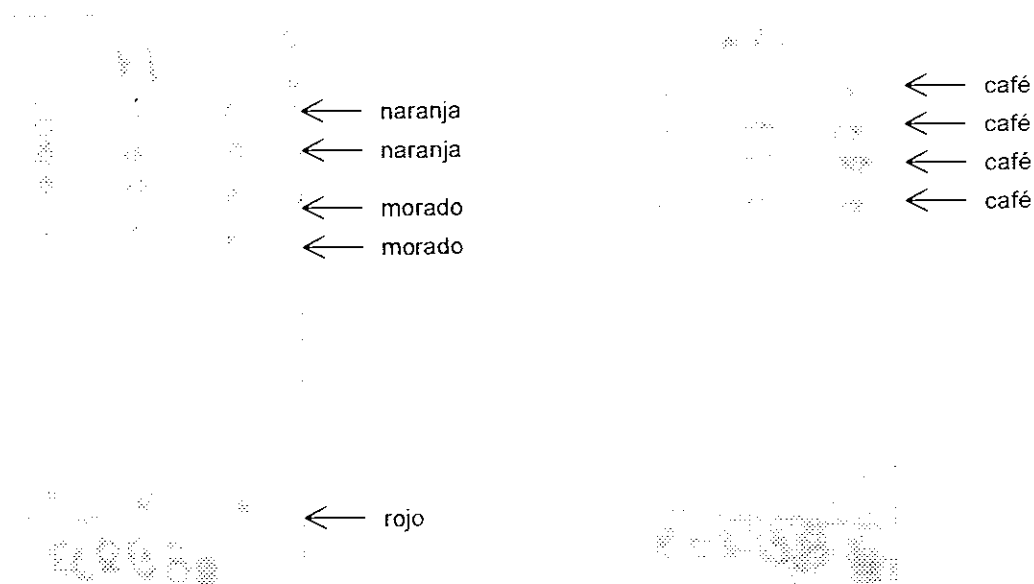


Figura No.8. Fracción acetato de etilo 1.

Figura No.9. Fracción acetato de etilo 2.

d. Fracción de diclorometano

- Sistema de disolventes: Acetona – Diclorometano (7:4)

- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 10 y Mágico 2 en figura No. 11.

Cuadro No. 14. Caracterización de fracción diclorometano de extracto etérico de raíces

Figura No. 10		Figura No. 11	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.93	Café	0.93	Café
0.67	Morado	0.67	Café
0.04	Rojo	0.04	Café

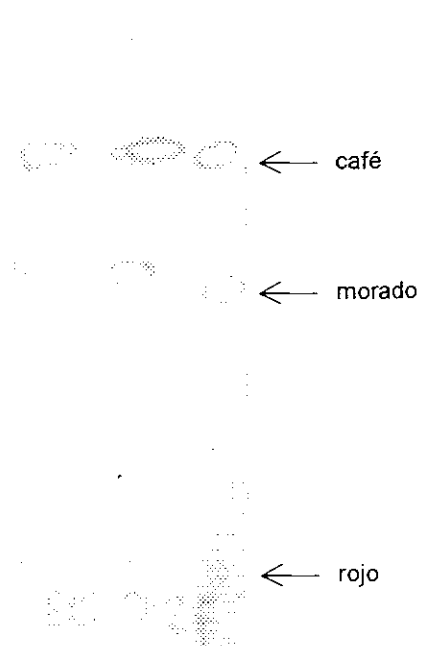


Figura No.10. Fracción diclorometano 1.

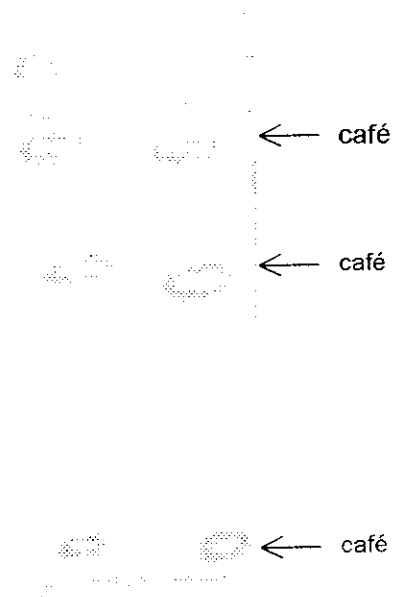


Figura No. 11. Fracción diclorometano 2.

e. Fracción de acetona

- Sistema de disolventes: Metanol – Acetona (1:1)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 12 y Mágico 2 en figura No. 13

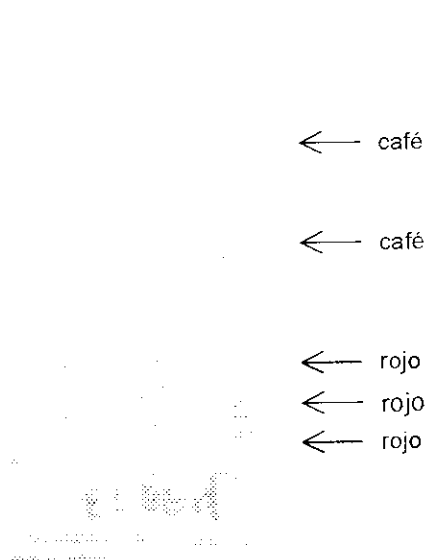


Figura No.12. Fracción acetona 1.

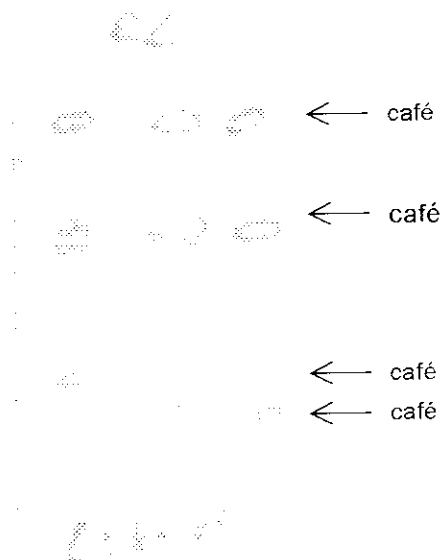


Figura No.13. Fracción acetona 2.

Cuadro No. 15. Caracterización de fracción acetona de extracto etérico de raíces

Figura No. 12		Figura No. 13	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.84	Café	0.84	Café
0.55	Café	0.55	Café
0.23	Rojo	0.23	Café
0.18	Rojo	0.18	Café
0.09	Rojo	-	

f. Fracción de etanol

- Sistema de disolventes: Metanol – Acetona (1:1)
- Reveladores: Mágico 1 lado izquierdo de figura 14 y Mágico 2 en lado derecho.

Cuadro No. 16. Caracterización de fracción etanólica de extracto etérico de raíces.

Izquierda		Derecha	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.87	Verde	0.87	Morado
0.72	Morado	0.72	Morado
0.26	Rojo	-	-
0.21	Rojo	-	-
0.13	Rojo	-	-

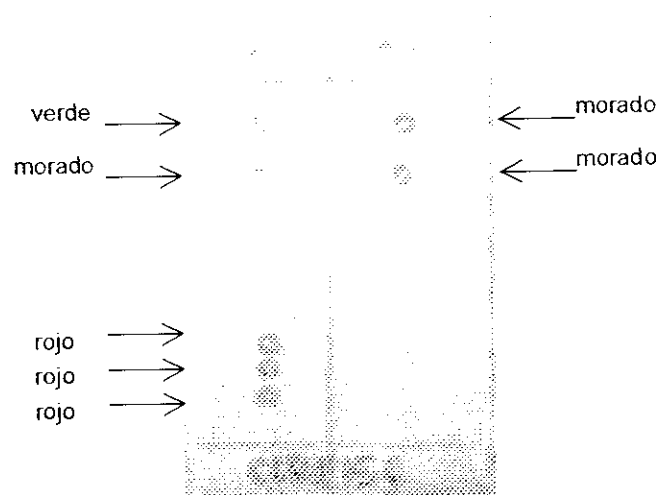


Figura No. 14. Fracción etanol.

g. Fracción de metanol

- Sistema de disolventes: Metanol puro.
- Reveladores: Sólo se observa un componente con Revelador mágico 1.

Cuadro No. 17. Caracterización de fracción metanólica de extracto etérico de raíces

Figura No. 15		Revelador mágico 2	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.72	Morado	No se observa ningún componente	

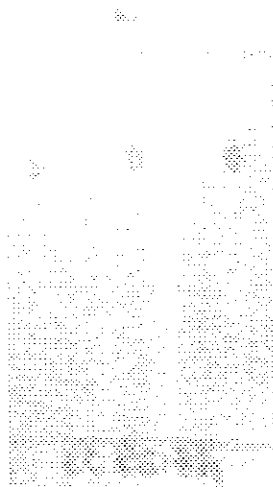


Figura No.15. Fracción metanol.

- h. Fracción metanol – agua (1:1).** No se detecta ningún componente.
- i. Fracción de agua.** No se detecta ningún componente.

2. Extracto etanólico de raíz

a. Fracción de hexano

- Sistema de disolventes: Acetato de etilo – Hexano – Benceno (1:6:1)
- Reveladores: Mágico 1 figura No. 16 y Mágico 2 en figura No. 17.

Cuadro No. 18. Caracterización de fracción hexánica de extracto etanólico de raíces

Figura No. 16		Figura No. 17	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.97	Naranja	0.97	Amarillo
0.85	Naranja	0.85	Amarillo
0.68	Morado	0.68	Morado
0.57	Morado	0.57	Morado
0.41	Morado	0.41	Morado
0.12	Café	0.12	Verde
0.04	Café	0.04	Verde

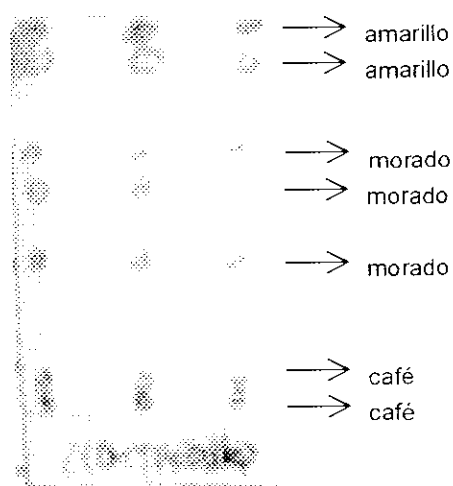


Figura No. 16. Fracción hexano 3.

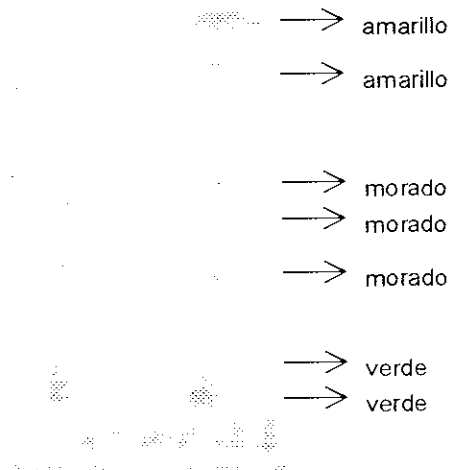


Figura No. 17. Fracción hexano 4.

b. Fracción de cloroformo

- Sistema de disolventes: Metanol – Agua (1:1)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 18 y Mágico 2 en figura No. 19.

Cuadro No. 19. Caracterización de fracción clorofórmica de extracto etanólico de raíces.

Figura No. 18		Figura No. 19	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.49	Lila	0.84	Verde
0.11	Rojo	0.11	Café
0.05	Rojo	0.04	Café

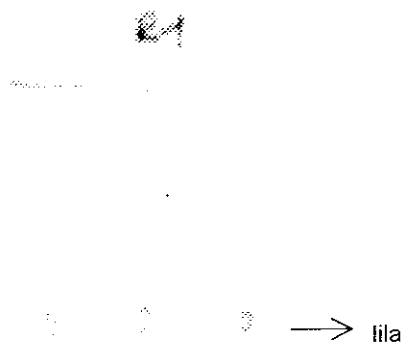


Figura No.18. Fracción cloroformo 3.

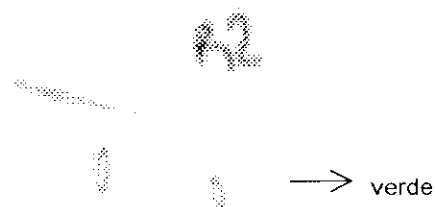


Figura No. 19. Fracción cloroformo 4.



c. Fracción de acetato de etilo:

- Sistema de disolventes: Metanol – Acetona (1:2)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 20 y Mágico 2 en figura No. 21.

Cuadro No. 20. Caracterización de fracción acetato de etilo de extracto etanólico de raíces.

Figura No. 20		Figura No. 21	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.89	Verde	0.89	Verde
0.79	Verde	0.84	Verde
0.71	Verde	0.79	Verde
0.21	Rojo	0.15	Café
0.15	Rojo	-	-
0.06	Rojo	-	-

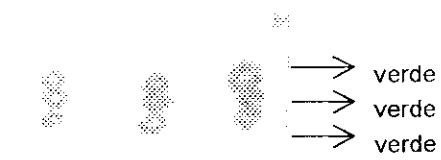
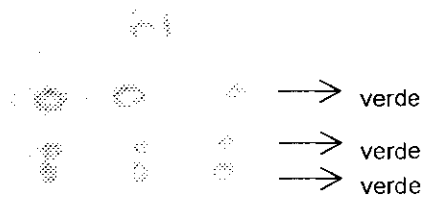


Figura No.20. Fracción acetato de etilo 3.

Figura No.21. Fracción acetato de etilo 4.

d. Fracción de diclorometano

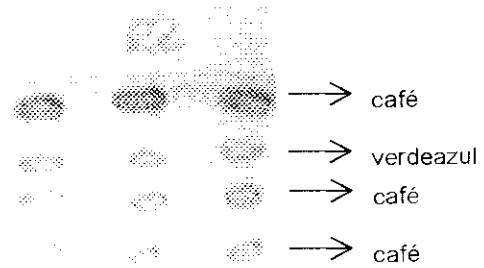
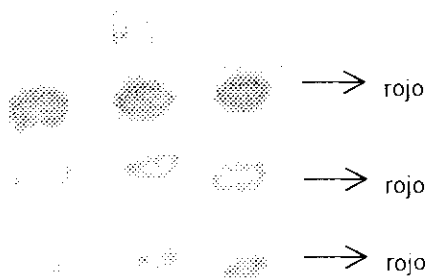


Figura No. 22. Fracción diclorometano 3.

Figura No. 23. Fracción diclorometano 4.

- Sistema de disolventes: Acetona – Diclorometano (1:2)

- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 22 y Mágico 2 en figura No. 23

Cuadro No. 21. Caracterización de fracción diclorometano extracto etanólico de raíces

Figura No. 22		Figura No. 23	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.93	Rojo	0.93	Café
0.73	Rojo	0.73	Verdeazul
0.61	Rojo	0.61	Café
0.07	Café	0.82	Café
-	-	0.10	Rojo
-	-	0.07	Rojo

e. Fracción de acetona

- Sistema de disolventes: Acetona – Agua - Diclorometano (3:1:1)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 24 y Mágico 2 en figura No. 25.

Cuadro No. 22. Caracterización de fracción acetona de extracto etanólico de raíces.

Figura No. 24		Figura No. 25	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.94	Café	0.94	Verdeazul
0.38	Rojo	0.16	Café
0.26	Rojo	-	-
0.23	Rojo	-	-
0.16	Rojo	-	-
0.08	Rojo	-	-

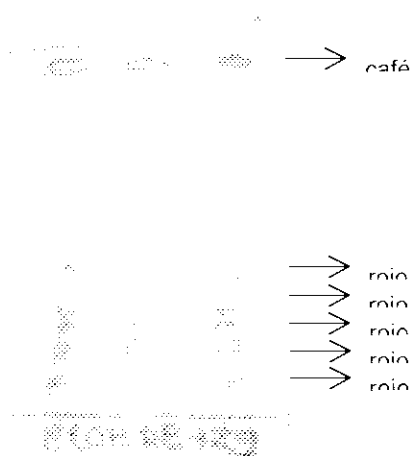


Figura No.24. Fracción acetona 3.

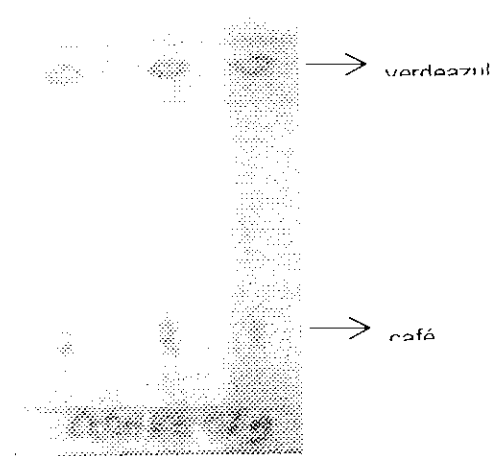


Figura No. 25. Fracción acetona 4.

f. Fracción de etanol

- Sistema de disolventes: Metanol – Acetona (1:1)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 26 y Mágico 2 en figura No. 27.

Cuadro No. 23. Caracterización de fracción etanólica de extracto etanólico de raíces.

Figura No. 26		Figura No. 27	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.89	Café	0.89	Verdeazul
0.77	Café	0.77	Verdeazul
0.52	Café	0.52	Verdeazul
0.26	Rojo	0.26	Café
0.17	Rojo	-	-
0.10	Rojo	-	-
0.04	Rojo	-	-

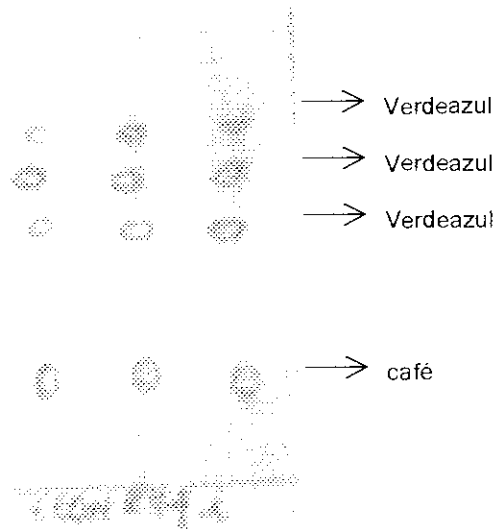
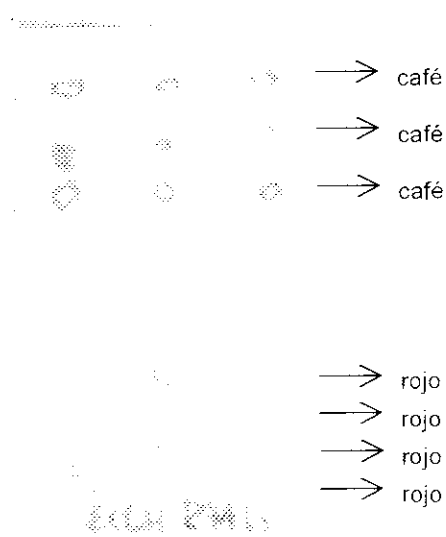


Figura No.26. Fracción etanol 2.

Figura No. 27. Fracción etanol 3.

g. Fracción de metanol

- Sistema de disolventes: Acetona pura
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 28; con Mágico 2 no se detecta ningún componente.

Cuadro No. 24. Caracterización de fracción metanólica de extracto etanólico de raíces

Figura No. 28		Revelador mágico 2	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.47	Café	No se observa ningún componente	

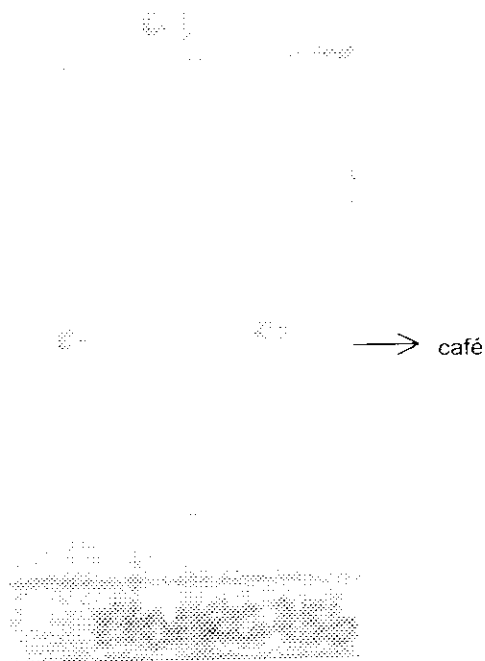


Figura No. 28. Fracción metanol 2.

- h. *Fracción metanol – agua (1:1)*. No se detecta ningún componente.
- i. *Fracción de agua*. No se detecta ningún componente.

3. Extracto etanólico de tallos

a. *Fracción de hexano:*

- Sistema de disolventes: Hexano – Benceno – Acetato de etilo (6:1:1)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 29 y Mágico 2 en figura No. 30.

Cuadro No. 25. Caracterización de fracción hexánica de extracto etanólico de tallos

Figura No. 29		Figura No. 30	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.97	Amarillo	0.97	Amarillo
0.85	Amarillo	0.85	Amarillo
0.68	Morado	0.68	Morado
0.57	Morado	0.57	Morado
0.41	Morado	0.41	Morado
0.12	Café	0.12	Verde
0.04	Café	0.04	Verde

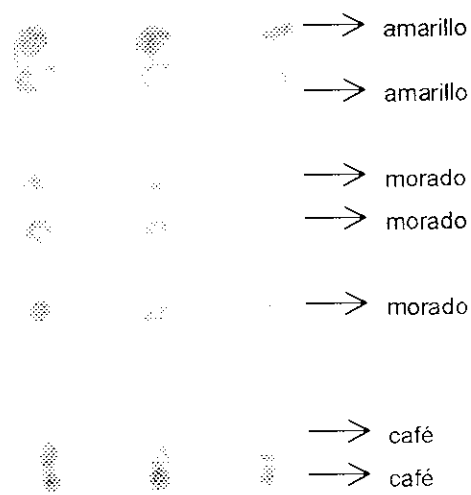


Figura No. 29. Fracción hexano 5.

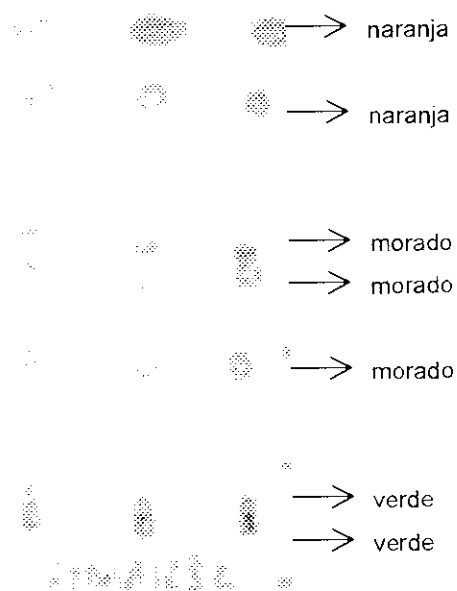


Figura No. 30. Fracción hexano 6.

b. Fracción de cloroformo

- Sistema de disolventes: Diclorometano – Acetona (3:2)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 31 y Mágico 2 en figura No. 32.

Cuadro No. 26. Caracterización de fracción clorofórmica de extracto etanólico de tallos

Figura No. 31		Figura No. 32	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.96	Café	0.96	Verde
0.12	Rojo	0.78	Verde
0.07	Rojo	0.71	Verde
-	-	0.21	Lila
-	-	0.12	Café

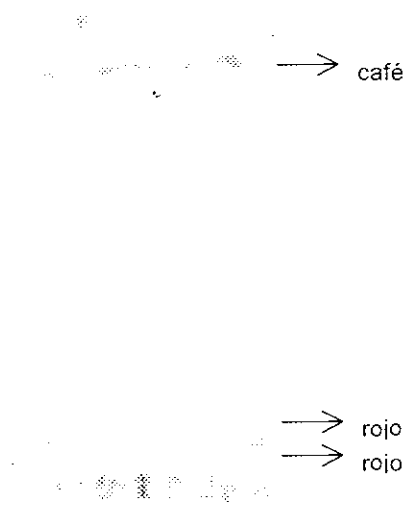


Figura No.31. Fracción cloroformo 5.

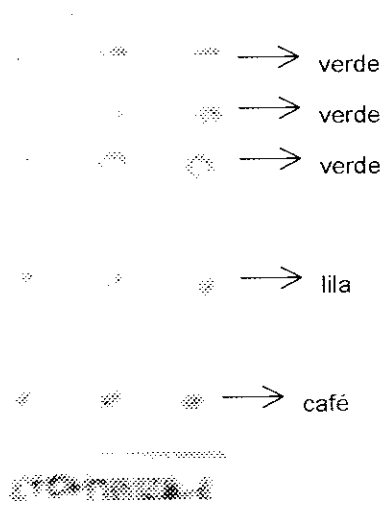


Figura No.32. Fracción cloroformo 6.

c. Fracción de acetato de etilo

- Sistema de disolventes: Metanol – Cloroformo (3:10)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 33 y Mágico 2 en figura No. 34

Cuadro No. 27. Caracterización de fracción acetato de etilo extracto etanólico de tallos.

Figura No. 33		Figura No. 34	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.96	Café	0.96	Verde
0.12	Rojo	0.78	Verde
0.07	Rojo	0.71	Verde
-	-	0.21	Lila
-	-	0.12	Café

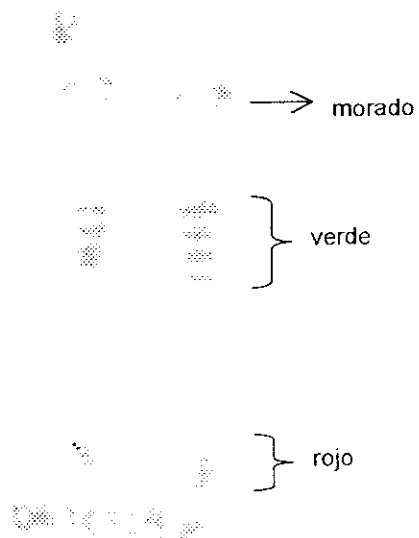


Figura No.33. Fracción acetato de etilo 5.

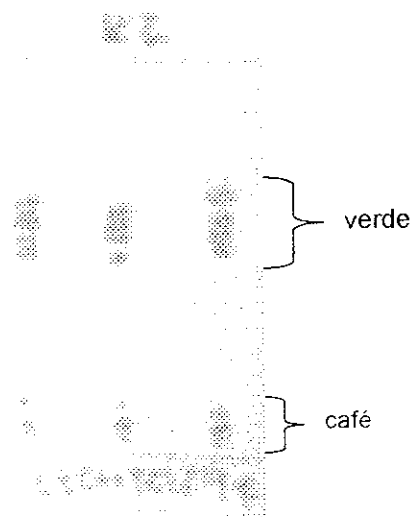


Figura No. 34. Fracción acetato de etilo 6.

d. *Fracción de diclorometano*

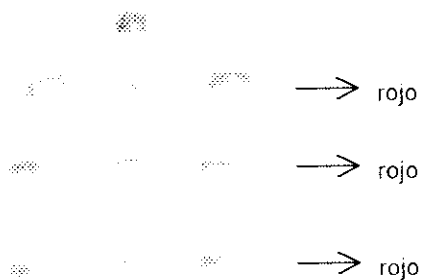


Figura No.35. Fracción diclorometano 5.

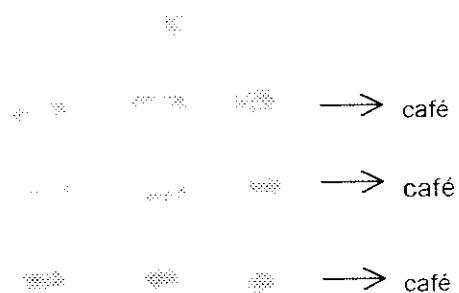


Figura 36. Fracción diclorometano 6.

- Sistema de disolventes: Acetona – Diclorometano (1:2)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 35 y Mágico 2 en figura No. 36.

Cuadro No. 28. Caracterización de fracción diclorometano de extracto etanólico de tallos

Figura No. 35		Figura No. 36	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.93	Rojo	0.93	Café
0.73	Rojo	0.73	Café
0.61	Rojo	0.61	Café
-	-	0.10	Rojo
-	-	0.07	Rojo

e. Fracción de acetona

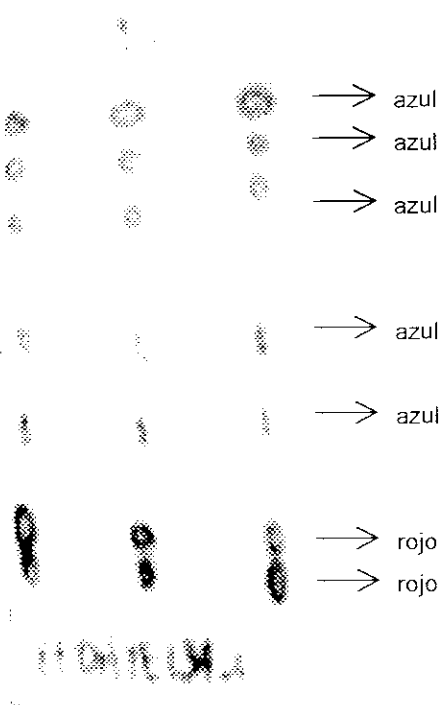


Figura No.37. Fracción acetona 5.

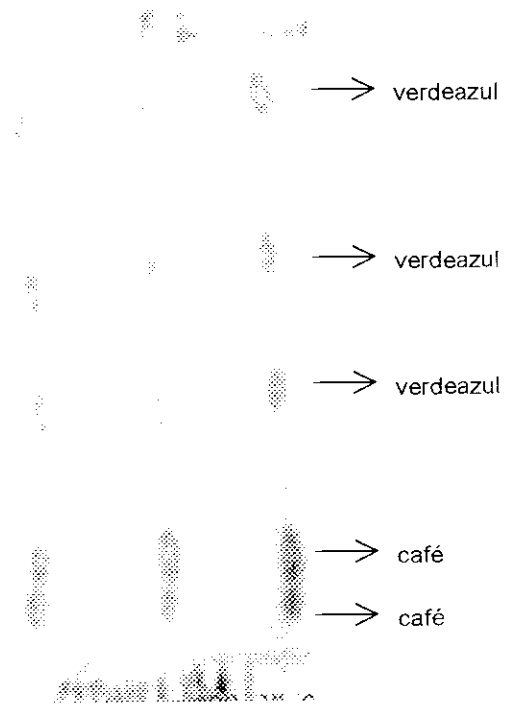


Figura No. 38. Fracción acetona 6.

- Sistema de disolventes: Cloroformo – Metanol (5:2)
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 37 y Mágico 2 en figura No. 38.

Cuadro No. 29. Caracterización de fracción acetona de extracto etanólico de tallos

Figura No. 37		Figura No. 38	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.95	Azul	0.89	Verdeazul
0.87	Azul	0.61	Verdeazul
0.76	Azul	0.4	Verdeazul
0.68	Azul	0.18	Café
0.35	Azul	0.07	Café
0.18	Rojo	-	-
0.07	Rojo	-	-

f. *Fracción de etanol*

- Sistema de disolventes: Metanol – Acetona (1:1)

- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 39 y Mágico 2 en figura No. 40.

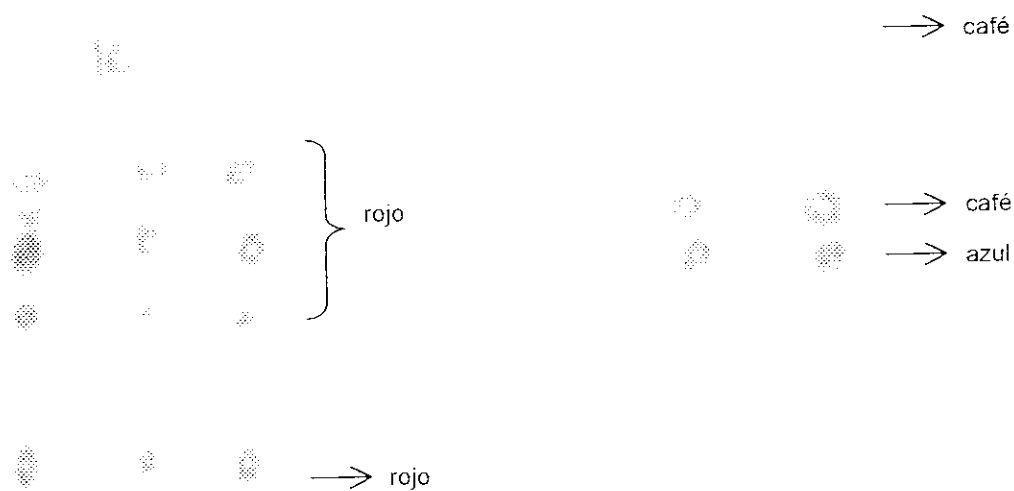


Figura No. 39. Fracción etanol 5.



Figura No. 40. Fracción etanol 6.

Cuadro No. 30. Caracterización de fracción etanólica de extracto etanólico de tallos

Figura No. 39		Figura No. 40	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.86	Rojo	0.86	Café
0.80	Rojo	0.62	Café
0.74	Rojo	0.51	Azul
0.62	Rojo	-	-
0.31	Rojo	-	-

g. Fracción de metanol

- Sistema de disolventes: Acetona pura
- Reveladores: Mágico 1 en figura No. 41 y Mágico 2 en figura No. 42

Cuadro No. 31. Caracterización de fracción metanólica de extracto etanólico de tallos

Figura No. 41		Figura No. 42	
Rf	Coloración	Rf	Coloración
0.85	Café	0.12	Café
0.12	Rojo	0.05	Café
0.05	Rojo	-	-

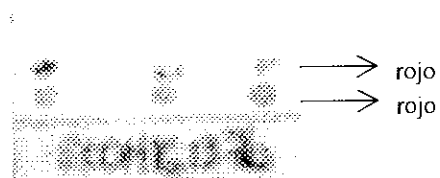


Figura No.41. Fracción metanol 5.

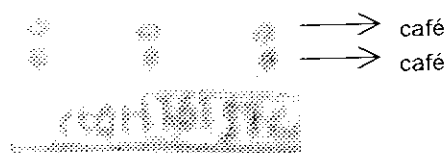


Figura No. 42. Fracción metanol 6.

- h. *Fracción metanol – agua (1:1)*. No se observa ningún componente.
- i. *Fracción de agua*. No se observa ningún componente.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La composición fitoquímica de una especie vegetal está influenciada por factores tales como la edad de la planta, época de recolección y características del nicho. Es por ello que los resultados del estudio aplican únicamente a la planta que de forma silvestre se encuentra en el lugar de recolección.

Dado que *Haplophyton cinereum* es una planta con un ciclo de vida muy corto (generalmente vive sólo durante época de lluvia), la época de recolección puede no ser una variable determinante en los resultados de caracterización obtenidos. Para controlar en una forma sencilla el factor de la edad de la planta, se recolectaron plantas de una longitud (sin considerar la raíz) similar, con flores y fruto. Sin embargo, en estudios posteriores, sería interesante determinar la variación de la actividad biocida (tanto contra *Artemia salina* como *Aedes aegypti*), en distintos meses de recolección y edad de la planta, y su posible relación con la variación de componentes o concentración de los mismos. Esta variación podría también observarse en el rendimiento de los extractos (grado miel) obtenidos.

Con el fin de extraer de la planta todos los compuestos de distintas polaridades, se obtuvieron los extractos etérico, etanólico y acuoso del material vegetal. En todos los casos, el tiempo de extracción fue determinado con base en un estudio preliminar de la planta.

Con el tiempo, se observó la formación de cristales en los extractos etanólicos de tallos y raíces. Una porción de los cristales fue separada y ensayada contra *Artemia salina* y *Aedes aegypti*, sin embargo, no presentaron citotoxicidad o actividad insecticida significativa.

Al analizar los constituyentes de los extractos etéricos por medio de tamizaje fitoquímico, se identificaron lípidos, agliconas de esteroides o triterpenos, esteroides y triterpenos no saponificables, carotenoides saponificables y no saponificables y alcaloides como bases libres. En el extracto etérico de hojas y tallos se determinaron además agliconas de flavonas.

El resultado observado en la determinación de alcaloides (abundancia de precipitado formado con reactivo de Mayer) permitió además observar que los alcaloides son significativamente más abundantes en el extracto de raíces, luego en el de tallos y en menor concentración en el extracto de hojas (en el que sólo se observó opalescencia).

En los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces se encontraron sales de alcaloides, alcaloides como bases cuaternarias y aminas oxidadas, derivados de cumarinas y glicósidos esteroidales.

En estos extractos, al igual que en los etéricos, se observó que los alcaloides son más abundantes en las raíces, luego en los tallos y en menor concentración en las hojas. También se determinó, a partir de la abundancia del precipitado obtenido con el reactivo de Mayer, que las sales de alcaloides son significativamente más abundantes que los alcaloides como bases cuaternarias y aminas oxidadas.

En los extractos etanólicos de tallos y raíces se determinó también la presencia de galotaninos y taninos catequínicos.

Se determinó la presencia de poliurónidos, glúsidos, galotaninos y cumarinas en los extractos acuosos de hojas, tallos y raíces. En el extracto acuoso de raíces se encuentran además alcaloides pero en una concentración menor que en los demás extractos puesto que no se obtuvo un precipitado abundante sino simplemente opalescencia al agregar el reactivo de Mayer.

En el extracto etanólico de tallos se obtuvo además, una prueba positiva de flavonoles y en el de hojas, flavononas.

La presencia de alcaloides y compuestos esteroidales, es típica en las especies de la familia de las Apocináceas. Además, en estas especies, generalmente la mayoría de alcaloides se almacena en las vacuolas de las raíces de las plantas. A partir de la prueba de alcaloides realizadas, se observó que los extractos de raíz, desde el etérico hasta el acuoso, presentaron una concentración de alcaloides más alta que el resto de extractos.

A partir de los componentes encontrados en las hojas, tallos y raíces de *Haplophyton cinereum*, puede afirmarse que la planta podría poseer un gran potencial, puesto que estos componentes, en general, poseen propiedades farmacológicas e industriales importantes. A los alcaloides, presentes en las especies de la familia de las apocináceas, principalmente se les atribuye la función de protección contra depredadores; sin embargo también se consideran funciones fisiológicas tales como inhibición del crecimiento (por lo que se encuentran también en meristemas primarios), mantenimiento del balance iónico, como reserva de nitrógeno y como productos de desecho nitrogenados (almacenados en vacuolas). Los alcaloides en general, tienen una acción farmacológica en el sistema nervioso central de los animales.

Los compuestos fenólicos también poseen acción insecticida, edulcorante, espasmolítica, antimicrobiana y antifúngica. Los compuestos esteroidales y específicamente los cardíacos tienen un efecto sobre miocardio generalmente cardiotónico. Las cumarinas se han caracterizado por su acción anticoagulante, antibacteriana, hepatotóxica y carcinogénica. Y algunos taninos poseen actividad citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, entre otras.

La actividad biocida y en particular insecticida, atribuida popularmente a la planta, se comprobó mediante los bioensayos realizados.

A partir de los resultados de *Artemia salina*, se observa que los extractos etanólicos de tallos y raíces presentaron una actividad citotóxica muy potente contra *Artemia salina* (LD_{50} igual a 181.8 $\mu\text{g/ml}$ y 151.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) ; los extractos etéricos de tallos y raíces, etanólico de hojas y acuoso de raíces un efecto moderado y los demás extractos y cristales aislados, un efecto biocida insignificante. Dado que este ensayo no es específico en la determinación de actividad pesticida, estos resultados sólo fueron útiles para guiar el siguiente bioensayo específico en la evaluación de insecticidas.

Para corroborar los datos del bioensayo de *Artemia salina*, no sólo se efectuó el bioensayo a los extractos más citotóxicos sino a todos los extractos y cristales aislados. Se determinó que solamente los extractos etanólicos de tallos y raíces y etérico de raíces, presentaron un efecto insecticida muy potente contra *Aedes aegypti* comparado con los demás extractos. Los resultados del bioensayo YFM corroboran los resultados del ensayo contra *Artemia salina*.

Aunque los demás extractos no presentaron una actividad insecticida significativa (en comparación con los más potentes) cabe mencionar que según el ensayo de *Artemia salina*, no son inocuos el extracto etérico de tallos, etanólico de hojas y acuoso de raíces, por lo que se recomienda la evaluación de otras actividades biológicas.

Según McLaughlin *et al.*, las sustancias puras con valores de LD_{50} menores o iguales a 1 $\mu\text{g/ml}$ son útiles con fines comerciales. Con base en este estándar, se considera que el o los activos presentes en el extracto etérico de raíz y los etanólicos de hojas y tallos son muy potentes puesto que los valores de LD_{50} obtenidos corresponden a un extracto y no a un activo puro.

Con base en estos resultados y a la metodología propuesta, se seleccionaron para caracterización por cromatografía en capa fina, los extractos etanólicos de raíces y tallos y el etérico de raíz. En un estudio preliminar (Enríquez, 2003), se realizaron pruebas de cromatografía en capa fina con todos los extractos puros, sin embargo, no fue posible obtener una resolución adecuada para la caracterización de los compuestos. Por esta razón, previa caracterización por cromatografía en capa fina, se realizó una separación por cromatografía en columna.

En la fracción hexánica del extracto etanólico de raíz (Ver figuras 16 y 17), se observan los mismos carotenoides y agliconas de esteroides y triterpenos de la fracción hexánica del extracto etérico de raíz (Ver figuras 4 y 5). Esto revela que las extracciones del material vegetal no fueron exhaustivas. Por el contrario, las eluciones en cada columna cromatográfica fueron exhaustivas con cada solvente y por lo tanto, se puede afirmar que cada uno de los compuestos detectados en cada fracción, no corresponden a los mismos compuestos de la siguiente fracción.

Según se muestra en las cromatoplasmas, los compuestos caracterizados corresponden a los tipos de compuestos determinados mediante el tamizaje fitoquímico previo.

En el extracto etérico de raíces se observan abundantes carotenoides y agliconas de esteroides y triterpenos, poco polares en su mayoría y alcaloides relativamente más polares. En ninguna cromatoplasma se observó la formación de colas por lo que es posible que los compuestos caracterizados tengan pocos grupos polares en su estructura.

Dada la disposición de los alcaloides de las fracciones de acetona y etanol, es posible que los mismos tengan estructuras químicas muy semejantes. Obsérvese que el alcaloide mayoritario (por intensidad de coloración) en la fracción de etanol (Ver figura No. 14), también está presente (abundante), en fracción de etanol de extracto etanólico de tallos (Ver figura No. 25); sin embargo, por los valores de R_f obtenidos, los demás compuestos no son los mismos y estos valores no se obtuvieron en la fracción de etanol del extracto etanólico de raíces. Estos resultados sugieren una molécula mayoritaria en los extractos, de mediana polaridad y posiblemente muy compleja y por lo tanto, con varios posibles isómeros o compuestos con estructuras químicas muy semejantes entre sí.

Las fracciones hexánicas de los extractos etanólicos de raíces (Ver figuras 16 y 17) y tallos (Ver figuras 28 y 29) son idénticas en su composición y en ambos casos, la presencia de carotenoides (también presentes en el extracto etérico de raíces) denota una extracción etérica no exhaustiva, previa extracción etanólica.

En las fracciones de diclorometano de los extractos etanólicos, se observa la presencia de los mismos alcaloides y en las demás fracciones, posiblemente compuestos parecidos pero de diferente polaridad. En el caso de los dos extractos etanólicos caracterizados, se corrieron placas de ambos extractos con el mismo sistema de solventes, pero solamente en las fracciones hexánicas y de diclorometano se logró una buena resolución con el mismo sistema de disolventes. Esto sugiere que en ambos extractos se encuentra el mismo tipo de compuestos y de estructura posiblemente muy parecida pero con variaciones de polaridad, o bien, que por la presencia de uno o más compuestos diferentes en ambos extractos, se modifica la solubilidad de los compuestos comunes a ambos extractos, y por lo tanto, no tienen la misma afinidad por las fases móviles ensayadas.

En los extractos etanólicos se observó que son abundantes los alcaloides y compuestos esteroidales, composición característica de las Apocináceas.

Con base en los resultados obtenidos, se puede afirmar entonces que las decocciones, infusiones y lociones utilizadas popularmente, si poseen un efecto insecticida; sin embargo, no es posible determinar el tipo de compuesto responsable de la actividad. Para el efecto, se recomienda la evaluación biológica de cada una de las fracciones obtenidas de las columnas

cromatográficas. A partir de los resultados que se obtengan, se recomienda una segunda evaluación de las fracciones de interés, procurando la evaluación de cada uno de los componentes de la fracción. Esta evaluación permite proponer posteriormente un método de separación del principio activo, basado en las características del mismo.

VIII. CONCLUSIONES

- Los extractos etéricos, de hojas, tallos y raíces de *Haplophyton cinereum* contienen lípidos, agliconas de esteroides o triterpenos, esteroides y triterpenos no saponificables, carotenoides saponificables y no saponificables y alcaloides como bases libres. Los extractos etéricos de hojas y tallos contienen además agliconas de flavonas.
- En los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces se encontraron sales de alcaloides, alcaloides como bases cuaternarias y aminas oxidadas, derivados de cumarinas y glicósidos esteroidales. En los extractos etanólicos de tallos y raíces se determinó también la presencia de galotaninos y taninos catequínicos.
- Se determinó la presencia de poliurónidos, glúcidos, galotaninos y cumarinas en los extractos acuosos de hojas, tallos y raíces. En el extracto acuoso de raíces se encuentran además alcaloides; en el de tallos flavonoles y en el de hojas flavononas.
- De todos los extractos obtenidos, los extractos etanólicos de tallos y raíces presentaron una actividad citotóxica muy potente contra *Artemia salina* (LD_{50} igual a 181.8 $\mu\text{g/ml}$ y 151.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente); los extractos etéricos de tallos y raíces, etanólico de hojas y acuoso de raíces un efecto moderado y los demás extractos un efecto biocida insignificante.
- Solamente los extractos etanólicos de tallos y raíces y etérico de raíces, presentaron un efecto insecticida muy potente contra *Aedes aegypti* con valores de LD_{50} igual a 266.8 $\mu\text{g/ml}$, 69.1 $\mu\text{g/ml}$ y 233.9 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.
- A partir de los resultados obtenidos del bioensayo YFM, y considerando que las preparaciones populares reportadas, incluyen distintas partes de las plantas en lociones, infusiones y decocciones, el efecto insecticida es muy probable.
- La caracterización por cromatografía en capa fina, de los extractos etanólicos de tallos y raíces y etérico de raíces confirmó el tamizaje fitoquímico por medio de reacciones químicas.
- El extracto etérico de raíz se caracterizó por la presencia abundante de agliconas de esteroides y triterpenos, carotenoides y alcaloides.

- Los extractos etanólicos de raíces y tallos se caracterizaron por la presencia abundante de alcaloides y compuestos esteroidales.
- No fue posible determinar el número de metabolitos secundarios presentes en la planta, posiblemente debido a la presencia de uno o más metabolitos distintos en cada fracción, que modifican la solubilidad de los demás.

IX. RECOMENDACIONES

- Caracterizar cada uno de los compuestos detectados en las placas cromatográficas, con el fin de obtener una descripción completa de los metabolitos secundarios presentes en la especie.
- Con el fin de determinar el o los principios activos con actividad insecticida, efectuar el bioensayo FMY a cada una de las fracciones caracterizadas mediante TLC y posteriormente, de cada uno de los compuestos presentes en las fracciones de interés para luego aislar y elucidar la estructura química del (los) principio(s) activo(s).
- Evaluar otras posibles actividades biológicas, incluyendo los extractos etanólico de hojas, acuoso de raíces y etérico de tallos puesto que también presentan actividad citotóxica contra *Artemia salina*.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, Jean, *et al.* 1991. «A blind comparison of simple benchtop Biossay and human tumor cell citotoxicities as antitumor prescreens». *Phytochemical Analysis*. [Estados Unidos de América]. 12 (2): 107-11.
2. Arana, Swizzly. 2002. *Deteminación de la actividad larvicida de 18 especies de plantas detectadas por etnobotánica y bioprospección en Guatemala*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 54 págs.
3. Berger, Ingeborg. 2001. *Antiprotozoal Activity of Guatemala Medicinal Plants*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala y del Instituto de Farmacognosia de la Universidad de Viena. Guatemala. 330 págs.
4. Dominguez, Xorge. 1974. *Métodos de Investigación en Fitoquímica*. 14ª ed. México, Limusa. 281 págs.
5. Enríquez Ana. Datos no publicados obtenidos en el estudio fitoquímico de *Haplophyton cinereum*, en el curso de Química de Productos Vegetales, Universidad del Valle de Guatemala, 2003.
6. Hedin, Paul. 1994. *Bioregulators for Crop Protection and Pest Control*. Estados Unidos de América, American Chemical Society. 221 págs.
7. *ITIS Report*. 2004. ITIS Corporation. Estados Unidos de América. 71 págs.
8. McLaughlin, Jerry, *et al.* 1998. «The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals» *Drug Information Journal*. 32: 513-524.
9. Meyer, Bryan, *et al.* 1982. «Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents». *Planta médica*. [Estados Unidos de América]. 7 (45): 31-34.
10. Michael, Andrew, *et al.* 1956. «Artemia salina as a test organismo for bioassay». *Science*. [Estados Unidos de América]. 104 (123): 464-10.

11. Ojala, Theodor, *et al.* 1999. «A bioassay Using *Artemia salina* for detecting Phototoxicity of Plant cumarins». *Planta Medica*. [Estados Unidos de América]. 10 (65): 715-718.
12. Ortiz, Sergio, 2003. *Determinación Cualitativa de Constituyentes Químicos en Extractos Vegetales. Manual para curso de Química de Productos Vegetales*. Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala. 13 págs.
13. *Desert Ecology of Tucson*. 2004. Primma Community College. Estados Unidos de América. 254 págs.
14. Standley, Peter y L. Williams. 1966. «Flora of Guatemala». *Fieldiana Botany* [Estados Unidos de América]. 24 (4): 354-355.
15. Zani, Sean, *et al.* 1995. «Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for *Trypanosoma cruzi* activity». *Phytomedicine*. [Estados Unidos de América]. 2 (1): 47-50.

XI. ANEXOS

A. ANEXO 1: TAMIZAJE FITOQUÍMICO (Ortiz, 2003)

1. **Extracto etérico (desengrase de material vegetal).** 25g del material vegetal, seco y molido, se extraen exhaustivamente con éter en un aparato soxhlet o por maceración en frío, hasta que no exista residuo después de la evaporación del éter. El extracto se concentra hasta un volumen final de 40 - 50mL. 20mL del extracto etérico se evaporan a sequedad y se le hacen pruebas de aceites esenciales, compuestos saponificables y no saponificables. El resto de los 30mL del extracto etérico, se utilizan para la identificación de los alcaloides como bases, agliconas libres, esteroides, triterpenos y carotenoides que pueden estar presentes en el material vegetal.

a. **Aceites esenciales.** 20mL del extracto etérico se evaporan a sequedad. Cuando el residuo tenga olor agradable, se tratará de disolver en pequeñas cantidades de etanol, por diluciones repetidas y luego separar por decantación el residuo y el decantado. El decantado (disolución etanólica) se evapora a sequedad y este nuevo residuo deberá tener olor agradable si el material vegetal contiene aceites esenciales (volátiles). En tal caso y por aparte, 50g de material vegetal original, se destilan con agua (arrastre con vapor) para conocer el porcentaje de aceites esenciales presentes y sus propiedades fisicoquímicas. Las determinaciones cuali-cuantitativas se hacen por CCF o CG.

b. **Lípidos y ácidos grasos.** La identificación de los constituyentes de sustancias grasas se lleva a cabo en el residuo obtenido después de decantar la dilución alcohólica, seguida por saponificación. Para este fin, se añade a este residuo una solución de KOH (10mL de 0.5 N) en etanol y se refluxa en un baño de agua a ebullición hasta que no aparezcan gotas de aceite en la superficie líquida (1-2 horas). Se elimina el etanol por destilación y el residuo se redisuelve en agua caliente (15-20 mL). La solución se transfiere cuantitativamente a una ampolla de separación. El matraz donde se efectuó la saponificación se lava primero con agua destilada caliente, en pequeñas cantidades, transfiriendo a la misma ampolla de decantación y luego de enfriado, lavado con éter. El éter se transfiere a la ampolla sobre la solución acuosa (alcalina, a causa del KOH en exceso) para extraer los constituyentes lipofílicos insaponificables del extracto. La extracción se deberá repetir por dos veces más, cada vez con 8mL de éter. Como resultado de la hidrólisis se tiene una fracción etérica (Et1) y una fracción alcalina acuosa (Ac 1). En esta fracción etérica (Et1) podrán identificarse esteroides, triterpenos y carotenoides.

c. **Agliconas de esteroides y triterpenos.** 10 mL de fracción etérica (Et1) se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve en 0.5 mL de anhídrido acético y luego en 0.5 mL de cloroformo. La solución se transfiere a un tubo de ensayo seco y se adiciona, por medio de una pipeta, 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado por un lado del tubo (reacción de Liebermann-Burchard). En la zona de contacto de los dos líquidos se forma un anillo café-rojizo o violeta, la capa sobrenadante llega a ser verde o violeta denotando la presencia de esteroides o triterpenos. Cuando exista la presencia de clorofila, el ensayo se efectúa dividiendo la solución en dos y tomando un tubo como patrón de color.

d. **Carotenoides.** 10 mL de fracción etérica (Et1) se evaporan a sequedad y se agrega 2-3 gotas de una solución de tricloruro de antimonio en cloroformo (reacción de Carl Price). Los carotenoides se colorean primero de azul y luego llegan a ser rojos. Con ácido sulfúrico concentrado los carotenoides llegan a ser azulprofundo o azul-verdoso.

Tanto como los carotenoides, las agliconas de esteroides y triterpenos presentes en el material vegetal, pueden ser identificados por las reacciones específicas indicadas anteriormente. En la mayoría de los casos, la presencia de pigmentos de clorofila interfieren en la observación de formación de reacciones coloreadas. Para remover éstos pigmentos de clorofila presentes, el extracto etérico es transferido a una columna con absorbente (sílica o lúmina).

e. **Ácidos grasos.** La solución alcalina acuosa (Ac1) es acidificada con HCl hasta un pH=3-4. Bajo estas condiciones, los ácidos grasos son liberados de sus sales alcalinas. La solución acuosa ácida, llega a ser opalescente. Los ácidos grasos son extraídos de la solución acuosa con pequeñas proporciones de éter, al ser agitada en una ampolla. Esta nueva fase etérica es evaporada hasta sequedad. Los ácidos grasos están presentes si el residuo es aceitoso. Los ácidos grasos se identifican por CCF o por índices específicos.

f. **Alcaloides como bases libres.** La identificación se lleva a cabo en el residuo obtenido por la evaporación de 10 mL del extracto etérico. El residuo se disuelve en 1.5 mL de HCl al 2%. La solución así obtenida se divide en tres tubos de ensayo en igual volumen (0.5 mL c/u): Una muestra (0.5 mL) de solución acuosa ácida servirá como patrón de comparación. A un tubo de ensayo (0.5 mL de solución acuosa) se le añaden 2- 3 gotas de reactivo de Bertrand. Al otro tubo (0.5 mL de la solución acuosa) se le añaden 2-3 gotas de reactivo de Mayer (o bien reactivo de Dragendroff).

Una opalescencia o un precipitado (amarillo-blanco con reactivo de Mayer o de Bertrand) indica la presencia de alcaloides.

g. Agliconas de flavonas. 3 mL del extracto etérico se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en caliente con 1-2 mL de metanol al 50%, se le añade magnesio metálico y 4-5 gotas de HCl concentrado. Una coloración roja o amarilla indica la presencia de flavonoides en forma de agliconas (reacción de Shibata o prueba de cianidina).

h. Emodoles (agliconas de antracenósidos). 3 mL del extracto etérico (naranja-amarillo) se transfiere a un tubo de ensayo y se le añade 1 mL de amoníaco al 25% (o bien NaOH al 10%) y luego se agita (reacción de Bomtrager). Una coloración roja indica la presencia de emodoles.

i. Cumarinas. 3 mL del extracto etérico se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en agua caliente. Después de enfriada, la solución se divide por igual en dos tubos de ensayo. Un tubo de ensayo se usará como referencia y la solución acuosa del segundo se alcaliniza con 0.5 mL de amoníaco al 10%. El aparecimiento de una intensa fluorescencia bajo luz ultravioleta, indica la presencia de cumarinas y sus derivados. La presencia de estas sustancias puede ser confrontada con la reacción Feigl-Frehden-Anger (formación de ácido hidroxámico).

La reacción de Feigl-Frehden-Anger es específica para lactonas hexatómicas presentes en las moléculas de cumarinas. La solución investigada bajo luz ultra-violeta se transfiere a una cápsula y se añaden 4-5 gotas de solución de clorhidrato de hidroxilamina añadiéndosele luego una solución alcohólica de KOH al 10% hasta obtener un pH de 8-9. La solución se concentra y a este residuo se le agrega una solución de HCl 10% hasta un pH de 3-4 agregándosele luego 1-2 gotas de solución de cloruro férrico al 3%. La formación rápida de una coloración violeta indica la presencia de derivado lactónico.

2. Extracto etanólico (blando). El resto del material vegetal seco, después de la extracción con éter (u otro disolvente apolar), se extrae por reflujo (20-30 min), dos o tres veces con alcohol. La solución filtrada se combina y concentra hasta 50 mL.

Los constituyentes químicos presentes en el extracto pueden ser identificados por medio de algunas reacciones específicas en el extracto alcohólico o el hidrolizado.

a. Reacciones que se llevan a cabo en el extracto etanólico sin hidrolizar

1) Taninos. 0.5 - 1 mL del extracto alcohólico se disuelven con agua (1-2 mL) y se le añade 2-3 gotas de solución diluida de cloruro férrico. El desarrollo de un color azul oscuro muestra la presencia de galotaninos y un color verde oscuro indica taninos catequínicos (no hidrolizables). En caso ocurra la existencia de ambos taninos en el extracto, pueden ser separados con ayuda del reactivo de Styassny.

Styassny: Una solución de formaldehído en ácido clorhídrico y una cantidad del extracto etanólico se ebulle a reflujo. Bajo estas condiciones, los taninos tipo catequinas se condensan formando un precipitado color rojo, el cual se filtra. El filtrado se neutraliza con acetato de sodio y se agregan unas gotas de cloruro férrico. El desarrollo de un color azul profundo indica la presencia de galotaninos.

2) Compuestos reductores. 0.5-1 mL del extracto alcohólico se diluyen con agua (1-2 mL); se adiciona 0.5-1 mL de reactivo de Fehling I + II y luego se calienta. Un precipitado rojo ladrillo indica la presencia de compuestos reductores.

3) Sales de alcaloides. 20mL del extracto alcohólico se transfieren a una cápsula de porcelana y se evapora en baño-maría o arena caliente. Se añade HCl 10% (5-10 mL) al residuo conteniendo los alcaloides como sales de algunos ácidos orgánicos. Los alcaloides son ahora sales de ácido mineral. De la solución acuosa, los alcaloides se precipitan como bases con la ayuda de hidróxido de amonio al 10% (pH = 8-9) y luego se extraen con un disolvente apolar (éter, clorofomo, etc). La solución etérica o clorofórmica se evapora a sequedad en una cápsula de porcelana. El residuo se disuelve en HCl 2% (1.5 mL aproximadamente). La solución ácida, que contiene los alcaloides bajo la forma de sales se divide en tres tubos de ensayo: uno se toma como referencia, a otro tubo se le adiciona unas gotas de reactivo de Bertrand y al tercero, unas gotas de reactivo de Mayer. El aparecimiento de una opalescencia o un precipitado amarillo-claro, con reactivo de Mayer o de Bertrand muestra la presencia de alcaloides.

4) Alcaloides como bases cuaternarias, y aminas oxidadas. 20 g del producto vegetal desengrasado, se extrae con alcohol al 80% usando el método descrito para la preparación del extracto etanólico. Cuando se utiliza alcohol al 80%, para la preparación del extracto etanólico, se puede concentrar el extracto hasta grado miel. Se añade 8 mL de HCl 10%: se calienta y agita con una varilla de vidrio, y luego de enfriado se añade 0.5 g de cloruro de

sodio y se agita de nuevo. La solución se filtra y se lava el papel filtro con 2-3 mL de HCl 10%. Al filtrado se le hacen pruebas con reactivo de Bertrand y Mayer. El apareamiento de abundante precipitado, puede denotar la presencia de alcaloides y sales cuaternarias u óxidos de aminas.

Para confirmar la presencia de alcaloides, el remanente extracto acuoso ácido, se transfiere a una pequeña ampolla de decantación, se adiciona hidróxido de amonio (pH = 8-9) y se agita con pequeñas porciones de éter o cloroformo. El extracto clorofórmico o etérico (a1) y la solución alcalina (a2) se separan. La identificación de alcaloides en la fase etérica o clorofórmica se lleva a cabo siguiendo la metodología expuesta anteriormente.

Para confirmar la presencia de bases cuaternarias y óxidos de aminas, la solución alcalina (Ac2) se acidifica con HCl 10% y luego se filtra. El filtrado se divide y se le hacen pruebas con los reactivos de Bertrand y Mayer. El apareamiento de un precipitado, denota la presencia de bases cuaternarias u óxidos de aminas.

b. Reacciones en el extracto etanólico hidrolizado. A 25 mL de extracto alcohólico, se añaden 15 mL de HCl 10% y se coloca la solución a reflujo por 1 hr. Durante la hidrólisis la solución llega a ser opalescente debido a la precipitación de agliconas obtenidas por la ruptura de los glicósidos. Después de enfriado, la solución se extrae con éter por 3 veces (10-15 mL) en una ampolla de decantación. Las fracciones etéricas (30-36 mL) se colocan juntas y se secan con sulfato de sodio anhidrido. De este reflujo resulta una fracción etérica (Et2) y una acuosa ácida (Ac2). La fracción etérica (Et2) servirá para identificar antracenósidos, cumarinas, flavonoides, glicósido de esferoides y triterpenos. La fracción acuosa ácida (Ac 2) para la identificación de antocianósidos, siguiendo las siguientes pruebas:

1) Antracenósidos. La fracción etérica (Et2) (4mL) se concentra a 2 mL y luego se le adiciona, agitando, 1-2 mL de amoníaco al 25%. La producción de un color cereza-rojo en la solución alcalina indica la presencia de emodoles (agliconas de antracenósidos) en una forma oxidada (reacción de Borntrager).

2) Derivados de cumarinas. La fracción etérica (Et2) (5mL) se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve, calentando, en 1-2 mL de agua. La solución acuosa se divide en dos tubos de ensayo con igual volumen. A uno de los tubos se le adiciona 0.5 mL de amoníaco al 10%, y el otro sirve de referencia. El apareamiento de fluorescencia azul o verde bajo luz ultravioleta, más fuerte para la solución alcalina, indica la presencia de cumarinas.

La reacción de Feigl-Frehden-Anger es específica para lactona hexatómicas presentes en las moléculas de cumarinas. La solución investigada bajo luz ultravioleta se transfiere a una cápsula y se añaden 4-5 gotas de solución de clorhidrato de hidroxilamina añadiéndosele luego una solución alcohólica de KOH al 10% hasta obtener un pH de 8-9. La solución se concentra y a este residuo se le agrega una solución de HCl 10% hasta un pH de 3-4 agregándosele luego 1-2 gotas de solución de cloruro férrico al 3%. La formación rápida de una coloración violeta indica la presencia de derivado lactónico.

3) Glicósidos esteroidales (glicósidos cardiotónicos o saponinas). La fracción etérica (Et₂) (10mL) se evaporan a sequedad, el residuo se disuelve sucesivamente en 0.5 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de cloroformo. La solución se trasfiere a un tubo de ensayo seco y por medio de una pipeta se adiciona hasta el fondo del tubo, 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado (reacción de Lieberman Burchard). En la interfase de ambos líquidos, se forma un anillo de color rojo-café o violeta-café; la capa superior se toma de color verde-azulado o violeta cuando están presentes esteróles y triterpenos.

La identificación de glicósidos cardiotónicos, agliconas de cardenólidos, es posible por medio del test de Keddee. El residuo obtenido por la evaporación de 4 mL de la fracción etérica (Et₂) se disuelve en metanol (1-2-mL) y se le añade 1-2 mL de una solución etanólica de KOH 1N y 3-4 gotas de una solución alcohólica del ácido 3,5-dinitrobenzoico al 1%. Por calentamiento se obtiene el desaparecimiento de una coloración violeta.

Las saponinas presentes pueden detectarse por medio del test de la espuma o por el test de hemólisis usando la solución acuosa de el residuo perteneciente a la solución sin hidrolizar.

4) Flavonósidos (glicósidos de flavonas). 5 mL de la fracción etérica (Et₂) se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve, con calentamiento, en 1-2 mL de metanol al 50%, luego se adiciona magnesio metálico y 5-6 gotas de HCl concentrado.

c. Fracción acuosa ácida (Ac₂)

1) antocianósidos (pigmentos de antocianina). Si la fracción acuosa ácida (Ac₂) es color rojo y se torna violeta a un pH neutro, o de verde a azul en un medio alcalino, las antocianinas están presentes.

3. Extracto acuoso (duro). El producto vegetal extraído con éter y luego con etanol es secado y extraído en un recipiente cónico con agua caliente por 20 minutos. La solución, después de filtrada, se concentra hasta un volumen de 50 mL. De nuevo en este caso, una parte de la reacción toma lugar directamente en el extracto, pero para la identificar otros principios activos es necesaria una hidrólisis.

a. Reacciones que se llevan a cabo en el extracto acuoso sin hidrolizar

1) Poliurónidos (pectinas, mucílagos, gomas). 2 mL del extracto acuoso se adicionan gota a gota en un tubo de ensayo donde han sido colocados 10 mL de etanol o acetona, si se forma un precipitado denso, deberá separarse por filtración o centrifugación y lavado con alcohol, luego se colorea con un colorante específico (hematoxilina, azul de toluidina, azul de metileno, etc.). La formación de un precipitado violeta o azul denota la presencia de mucílagos.

2) Compuestos reductores. La identificación se hace con solución de Feling (I y II) bajo las condiciones descritas para el extracto etanólico. Se utiliza 1 mL del extracto acuoso.

3) Glúcidos (osas y poliosas). 2 mL del extracto acuoso se transfieren a una cápsula de porcelana y se evaporan a sequedad, se adicionan 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se deja reposar por 3-5 minutos. Por deshidratación se forma furfural (a partir de pentosas) o hidroximetilfurfural (a partir de hexosas). Se adiciona luego, 3-4 gotas de una solución etanólica saturada con Timol (reactivo de Molish). La formación de un color rojo, denota la presencia de glúcidos (osas, poliosas). A aproximadamente 1 mL del extracto acuoso, decantado y diluido, se le adiciona 1-3 gotas de solución de Lugol. Si el almidón está presente, aparecerá una coloración azul.

4) Saponinas (saponósidos). Agite por 15 minutos 2 mL de solución diluida (1:1) en un tubo de ensayo de 1.6 cm de diámetro. La formación de una columna de espuma de 1 cm de altura, persistiendo por 15 minutos indica la presencia de saponinas. Las pruebas positivas de Liebermann- Burchard y la de Hemólisis debe confirmar la estructura esferoidal.

5) Taninos. La identificación se lleva a cabo en 1 mL del extracto acuoso, se le añade 2-3 gotas de solución diluida de cloruro férrico. El desarrollo de un color azul oscuro muestra la presencia de galitaninos y un color verde oscuro indica taninos catequínicos (no hidrolizables). En caso ocurra la existencia de taninos tipo gálico y catequina en el extracto, pueden ser separados con ayuda del reactivo de Styassny.

6) Alcaloides. 15 mL del extracto acuoso se lleva a pH 8-9 con una solución de hidróxido de amonio 10% y se extrae con un disolvente apolar (éter, cloroformo, etc.). La solución etérica o clorofórmica se evapora a sequedad en una cápsula de porcelana. El residuo se disuelve en HCl 2% (1.5 mL aproximadamente). La solución ácida, que contiene los alcaloides bajo la forma de sales se divide en tres tubos de ensayo: uno se toma como referencia; a un tubo se le adiciona unas gotas de reactivo de Bertrand y al otro, unas gotas de reactivo de Meyer. El aparecimiento de una opalescencia o un precipitado amarillo-claro, con un reactivo de Meyer o de Bertrand muestra la presencia de alcaloides.

b. Reacciones que se hacen en el extracto acuoso hidrolizado. Para la hidrólisis e identificación de antracenósidos, cumarinas, flavonoides, glicósidos esteroidales y triterpenos en el extracto acuoso se sigue la siguiente técnica.

A 25 mL de extracto acuoso, se añaden 15 mL de HCL10% en etanol y se coloca la solución a reflujo por 1 hr. Durante la hidrólisis la solución llega a ser opalescente debido a la precipitación de agliconas obtenidas por la ruptura de los glicósidos. Después de enfriado, la solución se extrae con éter 3 veces (10-15 mL) en una ampolla de decantación. Las fracciones etéricas (30-36 mL) se colocan juntas y se secan con sulfato de sodio anhidrido. De este reflujo resulta una fracción etérica (Et3) y una acuosa (Ac3). La fracción etérica (Et3) servirá para identificar antracenósidos, cumarinas, flavonoides, glicósidos de esteroides y triterpenos, y la solución acuosa acida (Ac3) los antocianósidos, haciendo las siguientes pruebas:

1) Antracenósidos. La fracción etérica (Et3) (4mL) se concentra a 2 mL y luego se le adiciona, agitando, 1-2 mL de amoníaco al 25%. La producción de un color cereza-rojo en la solución alcalina indica la presencia de emodoles (agliconas de antracenósidos) en una forma oxidada (reacción de Bomtrager).

2) Cumarinas. La fracción etérica (Et3) (5mL) se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve, calentando, en 1-2 mL de agua. La solución acuosa se divide en dos tubos de

ensayo con igual volumen: A uno de los tubos se le adiciona 0.5 mL de amoniaco al 10%, y el otro sirve de referencia. El aparecimiento de una fluorescencia azul o verde bajo luz ultravioleta, más fuerte para la solución alcalina, indica la presencia de cumarinas.

La reacción de Feigl-Frehden-Anger es específica para lactona hexatomicas presentes en las moléculas de cumarinas. La solución investigada bajo luz ultra-violeta se transfiere a una cápsula y se añaden 4-5 gotas de solución de clorhidrato de hidroxilamina añadiéndosele luego una solución alcohólica de KOH al 10% hasta obtener un pH de 8-9. La solución se concentra y a este residuo se le agrega una solución de HCl 10% hasta un pH de 3-4 agregándosele luego 1-2 gotas de solución de cloruro férrico al 3%. La formación rápida de una coloración violeta indica la presencia de derivado lactónico.

3) Glicósidos esteroidales (glicósidos cardiotónicos o saponinas). La fracción etérica (Et3) (10mL) se evaporan a sequedad, el residuo se disuelve sucesivamente en 0.5 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de cloroformo. La solución se transfiere a un tubo de ensayo seco por medio de una pipeta se adiciona hasta el fondo del tubo, 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado (reacción de Lieberman Burchard). En la interfase de ambos líquidos, se forma un anillo de color rojo-café o violeta-café; la capa superior se toma de color verde-azulado o violeta cuando esta presentes esteroides y triterpenos.

La identificación de glicósidos cardiotónicos, agliconas de cardenólidos, es posible por medio del test de Keddee. El residuo obtenido por la evaporación de 4 mL de la fracción etérica (Et3) se disuelve en metanol (1-2 mL) y se le añade 1-2 mL de una solución etanólica de KOH 1N y 3 gotas de una solución alcohólica del ácido 3,5-dinitrobenzoico al 1%. Por calentamiento se obtiene aparecimiento de una coloración violeta.

Las saponinas presentes pueden detectarse por medio del test de la espuma o por el test hemólisis usando la solución acuosa del residuo perteneciente a la solución sin hidrolizar.

4) Flavonósidos (glicósidos de flavonas). 5 mL de la fracción etérica (Et3) se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve, con calentamiento, en 1-2 mL de metanol al 50%, luego se adiciona magnesio metálico y 5-6 gotas de HCl concentrado. La solución se toma de color rojo cuando están presentes flavonoles y amarilla cuando flavanonas (reacción de Shibata).

d. Fracción acuosa ácida (Ac2)

1) antocianósidos (pigmentos de antocianina). Si la fracción acuosa acida (Ac3) es color rojo y se toma a violeta a un pH neutro, o de verde a azul en una medio alcalino, las antocianinas están presentes.

B. ANEXO 2: Coloraciones obtenidas con reveladores Mágico 1 y Mágico 2.

Cuadro No. 32. Coloraciones obtenidas con reveladores Mágico 1 y Mágico 2

Color observado	Tipo de compuesto más probable
Amarillo - Naranja	<ul style="list-style-type: none">- Carotenoides- Glicósidos de flavonoides- Polifenoles- Agliconas de flavonoides
Violeta - Morado	<ul style="list-style-type: none">- Triterpenoides glicosídicos- Agliconas de triterpenos- Compuestos esteroidales
Rojo	<ul style="list-style-type: none">- Alcaloides- Compuestos del fenilpropano con grupos cromóforos.

C. ANEXO 3: Reactivos para tamizaje fitoquímico.

Cuadro No. 33. Reactivos utilizados para tamizaje fitoquímico u precio estimado

Reactivo	Cantidad necesaria ¹	Precio en quetzales
Acetaldehído	100	105.52
Acetato de etilo	300	95.16
Acetato de sodio	120	95.91
Acetona	2000	84.28
Ácido 3,5-dinitrobenzóico	5	12.50
Ácido acético glacial	300	29.80
Ácido clorhídrico 36%	700	48.28
Ácido sulfúrico	42	4.29
Amonio	100	15.78
Anhídrido acético	220	39.19
Azul de metileno	15	55.79
Benceno	300	103.40
Butanol	300	56.30
Ciclohexano	300	75.07
Clorhidrato de hidroxilamina	1	41.14
Cloroformo	700	338.91
Cloruro de mercurio (II)	2	14.19
Cloruro de sodio	5	0.98
Cloruro férrico (III)	3	1.31
Diclorometano	300	56.71
Dimetil sulfóxido	300	91.39
Etanol 70%	4 ²	200.00
Etanol 95%	300	49.50
Éter sulfúrico	4 ³	1076.00
Formaldehído	120	30.10
Hexano	300	148.51
Hidróxido de potasio	75	25.84
Hidróxido de sodio	25	36.04
Magnesio metálico	9	21.55
Metanol	60	13.07
Nitrato de bismuto	4	58.50
Pentano	300	113.22
Sulfato de sodio anhidro	15	3.39
Timol	6	9.09
Tolueno	300	61.20
Tricloruro de antimonio	5	11.23
Trietanolamina	100	24.28
Vainillina	10	32.11
Yoduro de potasio	160	208.00

¹ Cantidad expresada en gramos o bien mililitros según sea el caso.

² Cantidad dada en galones.

