

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

IDENTIFICACIÓN DE FAMILIAS DE METABOLITOS
SECUNDARIOS EN *Myrica cerifera*

Informe final de tesis

Elaborado por

Ivo Mahelly Santizo Rodas

Para optar por el titulo de

Químico Biólogo

Guatemala, Febrero 2004

INDICE

I.	RESUMEN	1	
II.	INTRODUCCION	3	
III.	ANTECEDENTES	5	
	A. Descripción	5	
	B. Determinación de familias de metabolitos secundarios		5
	C. Características representativas de cada familia de compuestos		6
IV.	JUSTIFICACION	47	
V.	OBJETIVOS	48	
VI.	HIPOTESIS	49	
VII.	MATERIALES Y METODOS	50	
	A. Universo	50	
	B. Muestra	50	
	C. Recursos		50
	D. Métodos	53	
	E. Diseño experimental	71	
VIII.	RESULTADOS	72	
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	75	
X.	CONCLUSIONES	78	
XI.	RECOMENDACIONES	79	
XII.	BIBLIOGRAFIA	80	
XIII.	ANEXOS	83	

I. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de implementar metodologías para determinar la presencia de familias de metabolitos secundarios; que sean viables y factibles en nuestro medio, tomando en consideración la técnica de extracción utilizada para obtener los extractos, comparando los extractos obtenidos por lixiviación (agitación en frío) y los extractos obtenidos por extracción Soxhlet (en caliente). Para tal fin se realizó la determinación de metabolitos secundarios en la planta *Myrica cerifera*, utilizando técnicas químicas cualitativas en tres extractos utilizando solventes diferentes, que fueron obtenidos por un grupo de investigadores en el Centro de Investigaciones de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala; la primera etapa del tamizaje consistió en realizar 6 extracciones con tres solventes distintos y dos tipos diferentes de técnicas extractivas.

Para la técnica de lixiviación, 60 gr. del fruto del Arrayán (*Myrica cerifera*) fueron colocados en tres erlenmeyer con una capacidad de 250 ml y se agregaron 200 ml del solvente extractor (hexano, metanol y agua) en este caso cada erlenmeyer tenía un solvente diferente; se mantuvo en agitación en frío con un magneto mecánico (lixiviación) durante 72 horas, reemplazando el volumen del solvente cada 24 horas, el solvente reemplazado era colectado. Para la preparación del extracto en caliente se pesaron 10 gr. del fruto y fueron divididas en tres porciones; cada una de las porciones se colocó en un dedal de extractor Soxhlet, previamente seco y tarado; al sistema Soxhlet armado se le agregaron 100 ml de solvente, usando hexano, metanol y agua, cada uno por separado. A cada sistema se le aplicó 40, 60, 100°C respectivamente durante 24 horas continuas en reflujo, colectando el extracto al final de este periodo.

Los extractos obtenidos en ambos procedimientos, en caliente y en frío, se filtraron, para eliminar ceras y fueron guardados en frío (4°C) hasta el momento de su utilización para el tamizaje. Los extractos se catalogaron de la siguiente forma:

hexánicos H_f y H_c, el primero relaciona el extracto obtenido a temperatura ambiente (frio) y el segundo relaciona al extracto obtenido en caliente o por extracción en Soxhlet. De la misma manera se marcaron extractos A_f y A_c, relacionados a los extractos metanólicos y AC_f y AC_c, relacionados al extracto de agua o acuoso a temperatura ambiente y en caliente.

Posterior a la obtención de los extractos, se realizaron las técnicas químicas cualitativas correspondientes a cada una de las familias de metabolitos secundarios, estas técnicas fueron obtenidas de ensayos hechos por Sharapin. N. y Tally. W., así como técnicas utilizadas por Santa Cruz L.; el resultado es la fusión de estas tres técnicas, que resultó en una técnica de un mayor espectro de identificación.

El estudio permitió establecer la presencia de las siguientes familias de metabolitos secundarios en la planta *Myrica cerifera*, de naturaleza apolar en frio: aceites esenciales, carotenoides, ácidos grasos, cumarinas; de naturaleza apolar a 40 grados Celsius: carotenoides, ácidos grasos, cumarinas; de naturaleza semipolar en frio: taninos catéquicos, taninos rojos, compuestos reductores, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracenoides, chalconas, uronas, esteroides, triterpenos, esteroides insaturados, lactonas insaturadas, azúcares 2 desoxigenados y principios amargos; de naturaleza semipolar a 60 grados Celsius: taninos catéquicos, taninos rojos, compuestos reductores, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracenoides, chalconas, uronas, azúcares 2 desoxigenados y principios amargos; de naturaleza polar en frio: polisacáridos, saponinas, taninos gálicos, taninos catéquicos, compuestos reductores, antocianinas, antracenoides, cumarinas, chalconas, uronas, esteroides triterpenos; de naturaleza polar a 100°C: polisacáridos, saponinas, taninos catéquicos, antocianinas, cumarinas, chalconas, uronas y esteroides triterpenos.

Con los resultados obtenidos se logró concluir que los métodos y técnicas utilizadas en la identificación de familias de metabolitos secundarios de la planta *Myrica cerifera* son: a) realizables bajo las condiciones utilizando materiales y

equipo que refiere el método de extracción, disponible en nuestro medio b) que la técnica de lixiviación es la mejor para obtener los extractos, y al realizar la extracción de los metabolitos secundarios de la *Myrica cerifera* aplicando calor, se volatilizan los aceites esenciales de la planta, degradándose los esteroides, triterpenos, esteroides insaturados, lactonas insaturadas, taninos gálicos, además los compuestos reductores y antracénoides son degradados a temperaturas superiores a los 60 grados Celsius.

II INTRODUCCION

Las plantas han jugado un papel importante y fundamental en el desarrollo de la humanidad, tanto en la utilización artesanal de las mismas como en su posterior estudio como fuente de materia prima para industria farmacéutica, alimenticia, etc.

El recurso natural de Guatemala ha sido y sigue siendo utilizado por los habitantes de cultura indígena para el tratamiento de diversas afecciones del hombre e incluso de animales, y dicho conocimiento ha sido transmitido de generación en generación como un conocimiento empírico de las propiedades curativas de un cierto tipo de plantas que pueden ser estacionarias o perennes.

De esta manera la medicina tradicional o como se le ha dado el nuevo calificativo de medicina alternativa, ocupa en la actualidad un sitio preponderante en la cultura Guatemalteca.

Sin embargo, la cultura curativa indígena, no coincide con los sistemas de terapia médica convencional, que son apoyados oficialmente por las autoridades del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y que en la actualidad no existen indicios de una fusión o integración del sistema de curación maya o indígena, con el sistema de curación convencional.

La investigación de plantas utilizadas por los curanderos, ha influenciado la manera en que se realizan las formulaciones de nuevas drogas, permitiendo la recopilación del amplio conocimiento de la variada gama de plantas utilizadas en el país, surgiendo así los estudios de tamizajes fitoquímicos, para determinar la presencia de principios activos de familias químicas conocidas, que darán posteriores formulaciones farmacológicas.

El tamizaje fitoquímico preliminar de plantas se hace en muchos países que tienen una amplia biodiversidad y una cultura de técnicas curativas por productos naturales, para un posterior aislamiento del compuesto responsable de la curación o alivio de alguna patología.

En el presente estudio se realizó la determinación de la presencia de familias de compuestos químicos de importancia farmacológica en la planta conocida como Arrayán

(*Myrica cerifera*), utilizando tres extractos realizados por un grupo de investigadores del centro de investigaciones de ingeniería de la universidad de San Carlos de Guatemala, los extractos fueron obtenidos por dos técnicas diferentes y en tres solventes de distinta naturaleza polar.

Las técnicas utilizadas en las extracciones fueron: por medio de extractores Soxhlet, donde se utiliza calor como condición física de la extracción y por lixiviación, donde se utiliza agitación como medio físico de extracción, posteriormente se comparó la presencia de los compuestos en ambas extracciones, con lo cual al realizar la determinación de compuestos químicos se determinó que el factor temperatura altera la presencia de una o algunas de las familias químicas de compuestos que posea el Arrayán.

El diseño del proceso se orientó de tal manera que la determinación de las familias de compuestos presentes en la planta sea lo más amplia posible, con un método sencillo no instrumental y rápido de implementar.

Los métodos de tamizaje que se utilizaron son pruebas químicas, específicas para la determinación de las familias químicas de compuestos presentes, ello permitió determinar su presencia o ausencia en los diferentes extractos obtenidos de la planta.

En el extracto hexánico fue posible determinar la presencia de: aceites esenciales, triterpenos, esteroides, carotenoides, ácidos grasos, alcaloides, agliconas flavonoides, cumarinas, catequinas, emoides; en el extracto acuoso: polisacáridos, amidas, saponinas, mucílagos, taninos gálicos, taninos catéquicos, compuestos reductores, alcaloides, antocianinas, antracenoides, cumarinas, flavonoides y glucósido cianogénicos; en el extracto alcohólico: taninos gálicos, taninos catéquicos, taninos rojos, compuestos reductores, alcaloides, aminos cuaternarios, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracenoides, flavonoides, antraquinonas chalconas, esteroides, uronas, triterpenos, cardenólicos y bufadienólicos como esteroides insaturados, lactonas insaturadas y azúcares 2-desoxigenados.

III ANTECEDENTES

A. Descripción

El Arrayán (*Myrica cerifera*), es un arbusto imperecedero que llega a medir 2.5 m., crece en latitudes entre 1000 a 2500 m., cubierto con una corteza gris, lisa; presenta ramificaciones lanceoladas alternas, hojas lanceoladas, oblongas, la superficie inferior de la hoja es de textura suave, presenta amentos masculinos alargados, y amentos femeninos globosos, las flores amarillas crecen en los amentos escamosos, el fruto es grisáceo-blانquecino redondo, con una cubierta cerosa (1).

En la región templada-fría en la que crece el Arrayán, la cosecha del fruto se da en los meses de octubre a enero, los nativos de dichos lugares, lo cocinan para extraer la cera que posteriormente venden. El extracto que queda posterior a la extracción de cera se utiliza artesanalmente en la medicina alternativa que practican los nativos de la región, se utiliza como estimulante astringente local, estimulante circulatorio, diaforético suave; se prescribe para diarrea, cólicos, dolor de garganta, leucorrea y úlceras indolentes (2).

B. Determinación de familias de compuestos químicos

1. Quimiotaxonomía

Ciencia que usa las características químicas, en particular de los llamados metabolitos secundarios (alcaloides, triterpenos, etc.) de un conjunto de organismos para determinar su posición en una clase jerarquizada evolutiva de los seres vivos (2).

2. Definición de los fitonutrientes

a) Principios activos - La importancia terapéutica de las plantas radica en la presencia de familias de compuestos químicos que poseen propiedades farmacológicas variadas. La lista de estas familias de compuestos es amplia y variada, por lo que en esta oportunidad se presentan las familias de compuestos de mayor importancia, y que son consideradas como importantes por la industria

farmacéutica, el orden de presentación es por el orden en que los metabolitos son determinados en el proceso de tamizaje. (3).

C. Características representativas de cada familia de compuestos

1. Triterpenos

a) Características generales - Los triterpenos son productos naturales que se encuentran en las plantas, son unidades de isopreno. Los triterpenos tienen 6 unidades isoprenicas (30 átomos de carbono). Estos compuestos existen en variedad de tipos estructurales (3).

Constituyen los llamados aceites esenciales, que son compuestos de varias sustancias orgánicas volátiles o aromáticas, que pueden estar constituidos por alcoholes, acetonas, cetonas, éteres aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae, preferentemente, por arrastre de vapor o por solventes orgánicos. Las plantas con aceites esenciales se ubican principalmente en las familias de las Labiadas y las Umbelíferas. Las propiedades curativas son variadas y abundantes. Por lo general, poseen propiedades sedantes, antiespasmódicas y desinfectantes. Dado que son compuestos volátiles, son eliminados por las vías respiratorias y actúan como expectorantes. Algunas plantas poseen aceites esenciales que aumentan la diuresis (Caléndula) y otras poseen efectos anti-histamínicos (Manzanilla). Útiles en perfumería, farmacia y en preparación de determinados alimentos. Previenen las caries y actúan como agentes anti-ulcerativos. Se unen al estrógeno e inhiben los procesos inflamatorios por supresión de la actividad de ciertas enzimas (3-5).

2. Aceites esenciales

a) Características generales - Son fracciones llamadas poliinsaturadas, contenidos en ciertos aceites vegetales. Son llamados "esenciales" ya que por un lado son virtualmente esenciales al organismo humano debido a que no pueden ser sintetizados en el cuerpo a partir de otros elementos y por otro lado nos son "esenciales" ya que nuestro organismo no los requiere sí o sí para poder funcionar correctamente. Lo que se entiende normalmente bajo esta definición, debería de ser

llamado en realidad aceites etéreos o aceites volátiles pero debido a una mala costumbre idiomática se generalizó esa mala definición de "aceite esencial" (3,6).

Son aceites muy livianos, contenidos en diferentes partes de las así llamadas plantas aromáticas, algunas de las cuáles contienen la esencia principalmente en sus semillas (anís, eneldo, coriandro), otras en las cáscaras de su fruto (limón, bergamota, naranja), otras en las hojas (menta, eucalipto, té), otras en la madera (canela, sándalo, cedro), otras en las flores (jazmín, lavanda, ylang-ylang) otras en sus raíces (vetiver, jengibre, angélica) y otras finalmente en su resina (incienso, benjuí, mirra) (3,4,6).

Estos aceites son, debido a su estructura molecular específica, tan livianos, que algunas de sus fracciones se evaporan a temperatura ambiente, hecho que es determinante para su uso en perfumes. Los "aceites esenciales" generalmente no dejan manchas, tal como sus parientes mas pesados que son los aceites vegetales normales (girasol, sésamo, soja, etc.), los que a su vez tampoco dejarían manchas (por lo menos no de grasa), si se "evaporan" en su punto de evaporación, valga la redundancia, el cuál, a presión atmosférica, está arriba de 700 grados Celsius. Se obtienen a partir de diferentes plantas mediante destilación, prensado o extracción por agentes. Usados preferentemente para fabricar fragancias, también tienen aplicación como sustancia beneficiosa en la aromaterapia y son muy apreciados para perfumar ambientes o como productos de baño (3-6).

Desempeñan un papel clave en la bioquímica de las plantas, ya que actúan como:

- Reguladores y mensajeros
- Protegen a la planta de parásitos y enfermedades
- Son muy importantes para la fertilización
- Llevan información inter-celular y se relacionan con la respuesta hormonal de la planta
- Controlan la multiplicación y renovación de las células.

La composición química de los aceites esenciales es muy variada, rica y compleja por lo que son de alto valor terapéutico. Son llamados “El Alma de las Plantas” ya que representan su “Energía Vital” (3-7).

b) Naturaleza química - Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)
- Monoterpenos,
- Sesquiterpenos,
- ☐ Fenilpropanos.

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los componentes que forman parte de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados. Los aceites pueden estar asociados formando mezclas con otros productos naturales como es el caso de las resinas y productos relacionados (3-4,6-8).

i. Clasificación de los aceites esenciales - Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su **consistencia** los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc.

Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, oleorresina de páprika, de pimienta negra, de clavel, etc.) (3-6,9).

De acuerdo a su **origen** los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencia de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, frutilla, etc.) (3-6,9).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por Ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (por ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ej. clavo, canela, anís, etc.).

Aunque esta clasificación es muy general resulta útil para estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos, sin embargo existen clasificaciones más complejas que tienen en cuenta otros aspectos químicos (3-6,9).

ii. Distribución y estado natural - Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc.

Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, pachulí, romero, salvia, etc.), en las raíces (angélica, cúrcuma, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en

las flores (lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, rosa, etc.) y en los frutos (nuez moscada, perejil, pimienta, etc.) (3, 7, 10).

Aunque en los aceites esenciales tanto los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal (3, 7, 11).

c) Actividad farmacológica - Los aromas contenidos en los aceites esenciales son los productos mas elaborados del reino vegetal, cada planta o árbol guarda en si el conocimiento acumulado durante millones de años, adaptándose a los cambios que ha sufrido el planeta.

La composición química de los aceites esenciales es muy rica, variada y compleja, por lo que son potentes antisépticos, bactericidas y analgésicos entre otras propiedades terapéuticas los aceites esenciales representan la energía vital de las plantas, es el pulso de su mundo y quizá la sustancia de la vida, este pulso fue creado para entregar a cada célula del organismo humano la energía y los nutrientes para reforzar la habilidad de regeneración, fuerza y protección (3-7, 9-12).

La eficiencia de los tratamientos aromaterapéuticos depende de la pureza y calidad de los aceites esenciales y de la manera de usarlos.

i. Por inhalación - Mediante la aspiración directa de los aromas, a través del sentido del olfato llegando al cerebro. La región olfativa es el único lugar de nuestro cuerpo donde el sistema nervioso central esta relacionado estrechamente con el mundo exterior, en esta forma, los estímulos olfativos llegan directamente a las centrales de conexión internas, las neuronas de la región olfatoria son neuronas sensitivas primarias y forman parte de las neuronas cerebrales, los mensajes olfatorios atraviesan la corteza cerebral por medio de fibras nerviosas que llegan a las neuronas centrales de control superior del cerebro (3-7, 9-12).

Nuestro bienestar general depende mucho más de nuestro olfato de lo que se suponía. El olfato no solo controla funciones corporales que no están sometidas a nuestra voluntad consiente, sino que influyen en nuestro mundo emotivo, esto se explica analizando las funciones de varias estructuras cerebrales como el sistema

límbico, el hipotálamo y el tálamo que se ocupan tanto de procesos emocionales como físicos y están relacionados con el sentido del olfato (3-7, 9-12).

ii. Por uso tópico a través de la piel (percutáneo) - Por la composición orgánica de las moléculas de los aceites esenciales, estas son absorbidas por la piel de donde acceden por medio de los capilares del torrente sanguíneo, para llevar sus efectos a todo el organismo, al mismo tiempo estimulan la regeneración celular de los tejidos, y la salud de la piel matando bacterias nocivas (3-7, 9-12).

Cuando el cuerpo recibe masaje con aceites esenciales los efectos tanto fisiológicos como psicológicos son asombrosos, el masaje actúa en las terminaciones nerviosas del cuerpo, al mismo tiempo produce calma y estimula el flujo energético que alivia la tensión, elimina toxinas y a la vez crea tejidos sanos, disminuyendo el proceso de envejecimiento (3-7, 9-12).

iii. Por ingestión - Este uso esta dirigido a tomar (ingerir) directamente los aceites esenciales, es el método menos común ya que sus efectos son menos rápidos y las dosificaciones deben de ser muy precisas, controladas y prescritas por un medico aromaterapeuta. La manera tradicional es la de tomar infusiones de hierbas aromáticas y la de incluirlas en la preparación de alimentos (3-7, 9-12).

3. Esteroles

a) Características generales - En la naturaleza se encuentran una gran cantidad y diversidad de sustancias con el núcleo esteroide, las cuales incluyen a los esteroides (o 3-hidroxiesteroides), los esteroides con grupos carbonilo (también denominados oxa- o cetoesteroides), los esteroides con grupos amino en el núcleo o la cadena lateral (alcaloides esteroidales) y los cardenólidos (o cardiotónicos) entre otros. Estos a su vez se les encuentra en forma libre, esterificados con ácidos grasos o glicosidados. A continuación se describen algunos aspectos generales de los esteroides más distribuidos, haciendo un énfasis especial en su elucidación estructural (3-6, 9).

Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas esteroideas), como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales o esteroides insaturados poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5 como se muestra en la figura 1 (3, 7, 10).

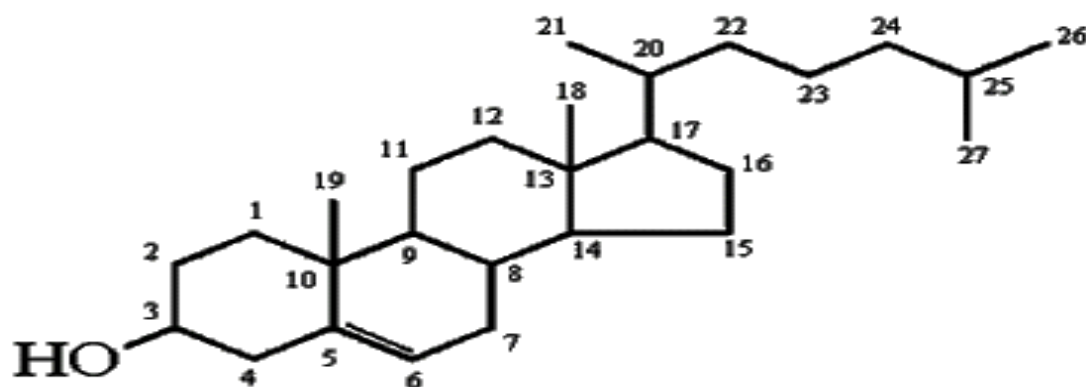


Figura 1 Enumeración de los átomos de carbono en la molécula de colesterol,
se observan cadenas laterales de 8 carbonos y un doble enlace en el C-5 (3).

En los animales superiores (incluido el hombre) se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un constituyente importante de membranas y precursor de sustancias fisiológicamente importantes (Hormonas, Ácidos biliares, Vitamina D, etc.). En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroides: β -Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol. Un esteroide menos común

es el Fucosterol, el cual es el esteroide principal de muchas algas pardas y también se le ha detectado en el coco (*Cocos nucifera* L) (3, 7, 10).

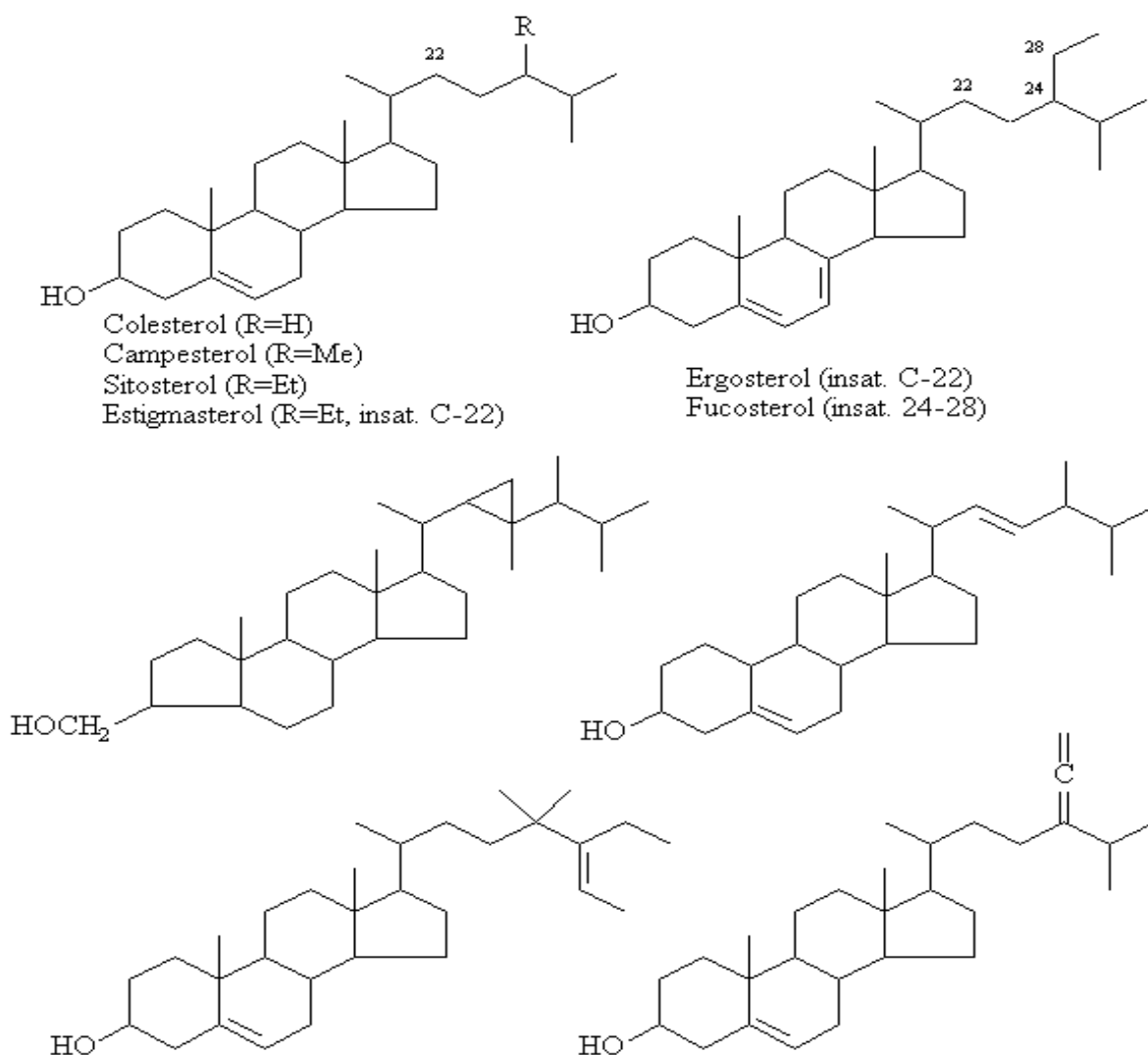


Figura 2 Mezclas complejas de estructuras de esteroides (9).

En los hongos y levaduras se encuentra principalmente el Ergosterol, en cambio, los animales inferiores (principalmente invertebrados marinos tales como esponjas, estrellas, corales, etc.) y ciertas plantas filogenéticamente poco evolucionadas (P.ej. algunas *Orchidaceae*) contienen mezclas complejas de esteroides con modificaciones estructurales variadas tales como núcleos sin el carbono 4 (A-nor-esteroides), sin el carbono 19 (19-Nor-esteroides), con varias insaturaciones; cadenas laterales con más

de 10 carbonos, con anillos ciclopropano, con enlaces alénicos, etc. En la figura 2 se presentan algunos ejemplos. Con base en la diversidad estructural observada para los esteroides terrestres y marinos identificados hasta 1988, y trabajando sobre consideraciones biosintéticas, es interesante resaltar que a través de un programa de computador denominado REACT se logró predecir la existencia de 1778 esteroides naturales (3, 7, 11).

La gran mayoría de esteroides conocidos son sólidos cristalinos incoloros, solubles en solventes orgánicos relativamente apolares (Cloroformo, Benceno, etc.), menos solubles en alcoholes de bajo peso molecular, y que funden sin descomponerse (en forma libre o esterificada). Presentan además actividad óptica debido a los carbonos asimétricos que poseen. Los esteroides se pueden recrystalizar en metanol caliente o en la mezcla metanol-tetrahidrofurano 10:1, formando cristales en forma de agujas brillantes incoloras. Los que presentan dobles enlaces conjugados son de color amarillento y tienden a descomponerse por acción de la luz como por ejemplo los esteroides con insaturaciones en C-5 y C-7, los cuales son susceptibles a la reacción de oxidación fotoquímica y se presenta en la figura 3. (3-6, 9).

Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoA (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol, mientras que los animales tienen al lanosterol que se muestra en la figura 4. De una forma análoga se originan los triterpenoides. En la biogénesis de los esteroides también están implicados procesos tales como hidrogenaciones y deshidrogenaciones C-C, metilaciones (vía S-adenosilmetionina), hidroxilaciones, etc. (3-6, 9).

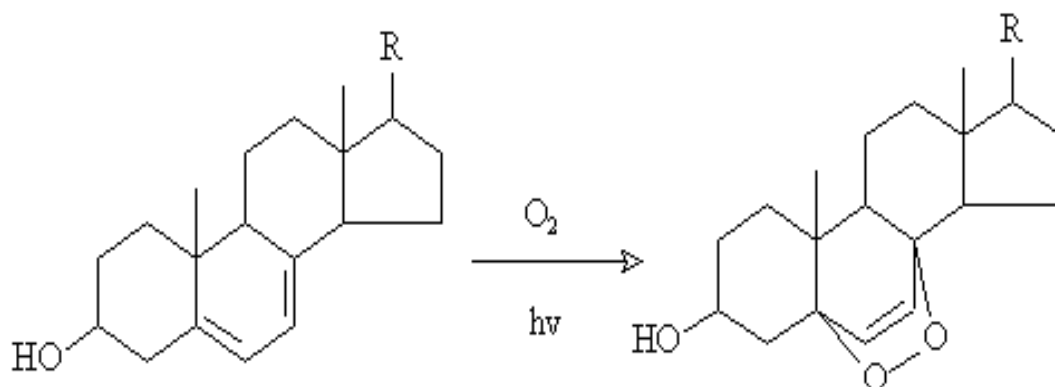


Figura 3. Descomposición de esteroides por la presencia de luz solar (6).

Un hecho estructural notable es que la gran mayoría de esteroides naturales tienen sustituyentes alquílicos sobre los carbonos 4 y 24 fundamentalmente, y este hecho es justificado por la misma biogénesis. El conocimiento de la biosíntesis de esteroides ha contribuido al desarrollo de la quimiotaxonomía vegetal, particularmente en el caso de las algas, y ha servido para correlacionar la estructura de estas sustancias con aspectos evolutivos (3-6, 9).

b) Naturaleza química - Los esteroides naturales conocidos presentan las siguientes características estructurales:

- Los enlaces dobles en el núcleo se presentan principalmente en C-5, C-7, C-8 y C-9.
- Los enlaces dobles en la cadena lateral se presentan especialmente en C-22, y con menor frecuencia en C-24 y C-25.
- Además de los grupos metilos 18, 19, 21, 26 y 27, es frecuente encontrar grupos metilo en C-24, menos frecuente en el C-4.
- La cadena lateral presenta grupos alquilo (metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc.) principalmente en C-24.

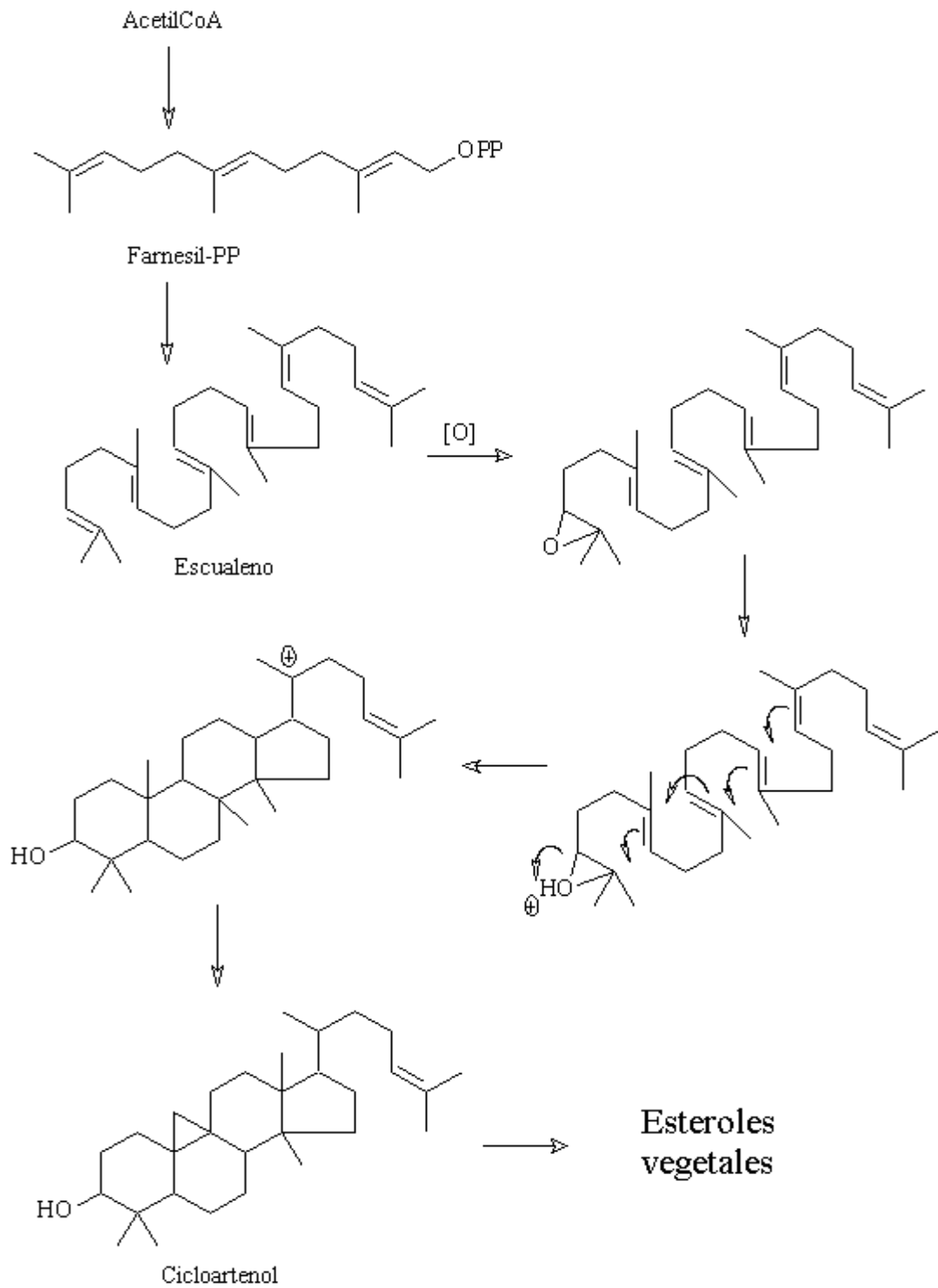


Figura 4. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol, a diferencia de los esteroides animales, en los cuales el precursor inmediato es el lanosterol (3).

- Algunos organismos poco evolucionados (invertebrados marinos, orquídeas, etc.) presentan esteroides con modificaciones en la cadena lateral (anillos ciclopropano, dobles enlaces alénicos, metilaciones en C-26 y C-27, ausencia del C-25, etc.), y con núcleos modificados como se muestra en la figura 2. (3-8, 11- 13).

4. Carotenoides

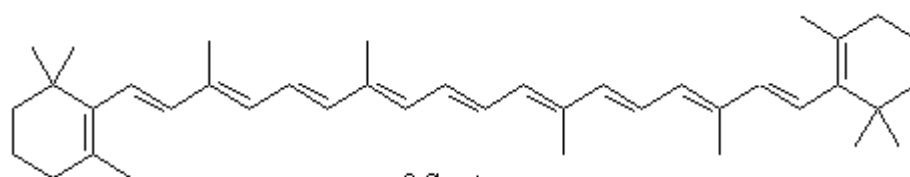
a) Características generales - Los carotenoides están presentes en muchas de los alimentos que se consumen a diario, particularmente frutas y ensaladas.

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranil-pirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno). La figura 5 muestra algunos ejemplos de los carotenoides más distribuidos en la naturaleza y la tabla 1 el valor de sus Rf. (3-6, 9).

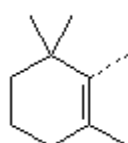
PIGMENTO	Rf en eluente					
	1	2	3	4	5	6
α -Caroteno	66	80	88	-	-	-
β -Caroteno	49	74	84	-	-	-
Licopeno	01	13	15	-	-	-
Luteína	-	-	-	10	35	56
Zeaxantina	-	-	-	05	24	55
Violaxantina	-	-	-	05	21	84
Criptoxantina	-	-	-	54	75	07
Capsantina	-	-	-	06	16	-
Neoxantina	-	-	-	-	-	93

Tabla 1. Rf. de carotenoides en diferentes fases móviles y estacionarias. Fases estacionarias y eluentes: 1. MgO activado, éter de petróleo (90-110 grados Celsius)-Benceno (1:1), 2. MgO activado, éter de petróleo (90-110 grados Celsius)-Benceno (1:9), 3. Sílica gel-Hidróxido de calcio (1:6), éter de

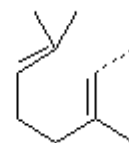
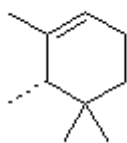
petróleo-benceno (49:1), 4. Fosfato de magnesio, éter de petróleo (40-60 grados celsius)-benceno (9:1), 5. Sílica gel, Diclorometano-Acetato de etilo (4:1) (3-6, 9).



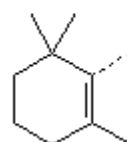
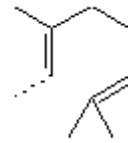
β -Caroteno



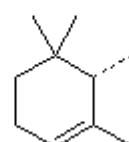
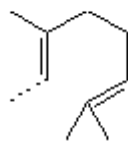
α -Caroteno



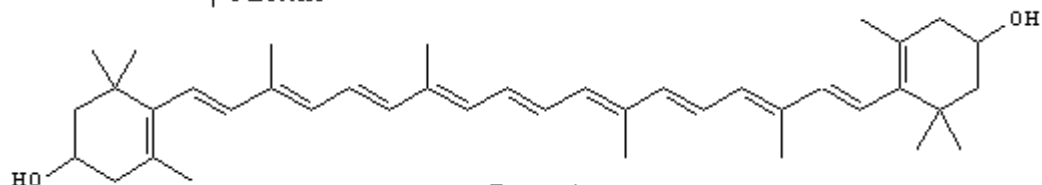
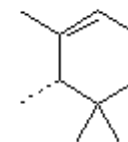
Licopeno



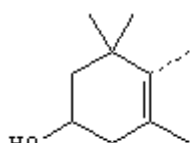
γ -Caroteno



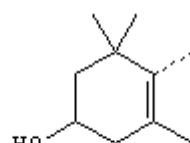
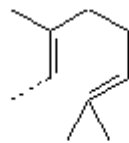
ϵ -Caroteno



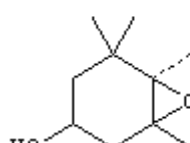
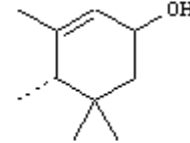
Zeaxantina



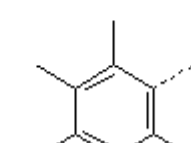
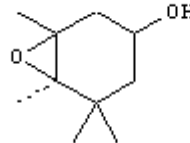
Rubixantina



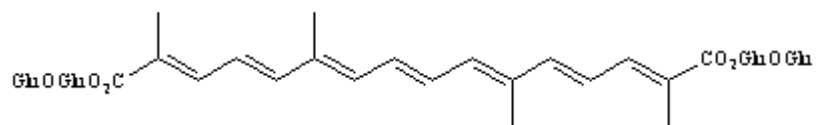
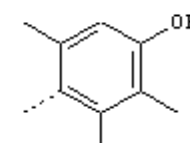
Luteína



Violaxantina



3,3'-Dihidroisorenierateno



Crocina

Figura 5. Ejemplos de carotenoides naturales que se encuentran ampliamente distribuidos (6).

Los carotenoides son hidrocarburos liposolubles altamente insaturados derivados del poliisopreno. Se sabe que en las grasas animales y vegetales están presentes más de 75 carotenoides diferentes. Los más frecuentes son los carotenos α , β y γ , la licopina, la luteína y las xantofilas. Los carotenoides y sus derivados son normalmente los que dan el color amarillo a rojo intenso a las frutas, hortalizas, cereales y aceite de palma bruto, los que se muestran en la figura 6. Los carotenoides son los precursores de la vitamina A, presentando el α -caroteno la mayor actividad de provitamina A (3, 7, 10).

En la figura 6. se presenta el espectro visible del β caroteno utilizando hexano, observándose que el pico de absorción máxima es a 451 nanómetros.



Figura 6. Espectro visible del β -caroteno en *n*-hexano (7).

b) Distribución y estado natural - Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamenco son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar, y otros. En los animales superiores el β -caroteno es un requerimiento dietario esencial pues es precursor de la vitamina A. A los carotenoides se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo los glicósidos carotenoides son

muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina que se presenta en la figura 5. Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, etc.), y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria) (3-6, 11-14).

c) Biosíntesis - Los carotenoides son tetraterpenoides (terpenoides con 40 átomos de carbono) que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico a través de dos unidades C₂₀ de geranil-geranil-pirofosfato (GGPP) (15).

d) Actividad biológica - El β -caroteno suplementado en la dieta ha mostrado alguna evidencia de acción antitumoral en ratas. Las bastadinas aisladas de esponjas marinas presentan acción antitumoral, contra el cáncer de la piel y en leucoplasias orales (3).

5. Ácidos grasos

a) Características generales - Las grasas comestibles incluyen todos los lípidos de los tejidos vegetales y animales que se ingieren como alimentos. Las grasas (sólidas) o aceites (líquidos) más frecuentes son una mezcla de triacilglicéridos (triglicéridos) con cantidades menores de otros lípidos. Los ácidos grasos presentes en varias moléculas de lípidos constituyen la parte con mayor interés nutritivo (3, 5).

b) Naturaleza química - Los ácidos grasos más abundantes presentan cadenas lineales con un número par de átomos de carbono. Existe un amplio espectro de longitudes de cadena, que varían entre un ácido graso de la leche con cuatro átomos de carbono, y los ácidos grasos de algunos aceites de pescado, con 30 átomos de carbono. Son frecuentes los ácidos grasos con 18 átomos de carbono. Los dobles enlaces situados en la cadena de carbonos o los sustituyentes de la misma se designan químicamente asignando al carbono del grupo carboxilo la posición 1. Así, los dobles enlaces del ácido linoléico le proporcionan el nombre químico sistemático de ácido 9,12-octadecadienoico. Una abreviatura taquigráfica para designar el ácido linoléico sería 18:2 (18 átomos de carbono: dos dobles enlaces). Su último doble enlace se encuentra a seis átomos de carbono del metilo terminal, una

característica importante para algunas enzimas. Este ácido se considera un ácido graso n-6 (3, 8, 16).

En el Cuadro 1 se presenta el nombre común (vulgar), el nombre químico sistemático y la abreviatura de varios ácidos grasos de la dieta. Los dobles enlaces de los ácidos grasos están en configuración *cis*. El primer miembro de la serie n-6 de los ácidos grasos es el ácido linoléico, y el primer miembro de la serie n-3 es el ácido α -linolénico (ácido 9, 12, 15-octadecatrienoico). Los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3 presentan dobles enlaces en *cis* separados por grupos metileno. Un doble enlace puede cambiar de configuración *cis* a *trans* (isomerización geométrica), o bien puede desplazarse a otra posición de la cadena de carbonos (isomerización posicional), según se ilustra en la figura 7. El perfil de un ácido graso en *trans* es similar al de un ácido graso saturado. Como resultado de esto, los ácidos grasos en *trans* presentan puntos de fusión más elevados que sus isómeros en *cis*. El isómero en *trans* puede considerarse como un intermedio entre el ácido graso insaturado en *cis* original, y un ácido graso completamente saturado (3, 10, 15).



Figura 7. - Estructura en *cis* y en *trans* de los dobles enlaces (8)

i. Acilglicéridos - El tipo de ácido graso y la posición en la cual se esterifica a glicerol determinan las características de los acilglicéridos. Además de los glicéridos que presentan tres ácidos grasos esterificados, los diacilglicéridos (diglicéridos) y los monoacilglicéridos (monoglicéridos) también están presentes en los alimentos crudos o en los ingredientes de los alimentos. Se observan características específicas en cuanto a la posición que ocupan los ácidos grasos.

Las grasas de reserva de origen animal tienden a presentar un ácido graso saturado en la posición 1 y un ácido graso insaturado en la posición 2.

Los ácidos grasos de la posición 3 parecen presentar una distribución fortuita, aunque con frecuencia aquí se acumulan ácidos grasos poliinsaturados (6).

ii. Fosfolípidos - Los fosfolípidos son componentes de la membrana que están presentes en los alimentos y aceites obtenidos por extracción. La estructura general de los fosfoglicéridos se muestra en la figura 8.

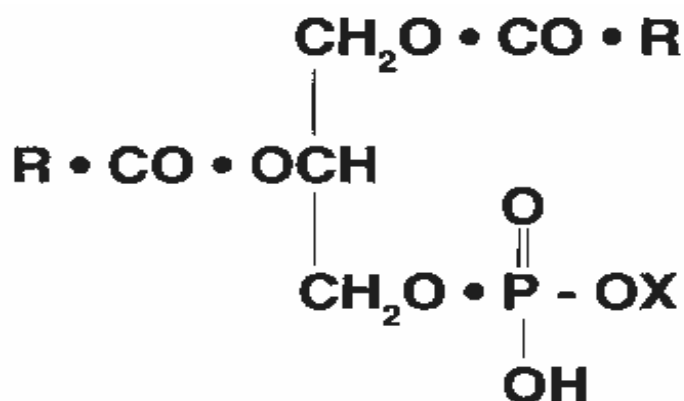
Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Familia de ácido graso
Cáprico	Decanoico	10:0	
Láurico	Dodecanoico	12:0	
Mirístico	Tetradecanoico	14:0	
Palmítico	Hexadecanoico	16:0	
Estéarico	Octadecanoico	18:0	
Araquídico	Eicosanoico	20:0	
Behénico	Docosanoico	22:0	
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0	
Palmitoleico	9-hexadecenoico	16:1	n-7
Oleico	9-octadecenoico	18:1	n-9
Gadoleico	11-eicosaenoico	20:1	n-9
Cetoleico	11-docasaenoico	22:1	n-11
Erúcico	13-docasaenoico	22:1	n-9
Nervónico	15-tetracosanoico	24:1	n-9
Linoleico	9,12-octadecadienoico	18:2	n-6
α -linolénico	9,12,15-octadecatrienoico	18:3	n-3
β -linolénico	6,9,12-octadecatrienoico	18:3	n-6
Dihomo- γ -	8,11,14-eicosatrienoico	20:3	n-6
	5,8,11-eicosatrienoico	20:3	n-9
Araquidónico	5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4	n-6
AEP	5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5	n-3
Adrénico	7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4	n-6
	7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5	n-3
ADP	4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5	n-6
ADH	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6	n-3

Cuadro 1. Algunos nombre comunes de ácidos grasos encontrados en los alimentos (15).

Normalmente, en la posición 1 se esterifica un ácido graso saturado, y en la posición 2 un ácido graso poliinsaturado. Los grupos polares que contienen fósforo y una base orgánica proporcionan a la molécula lipídica una región hidrofílica. Además de los fosfoglicéridos, los fosfolípidos incluyen esfingomielinas y cerebrósido, que se basan en la esfingosina en lugar del glicerol.

Aunque los fosfolípidos constituyen sólo una pequeña fracción de la grasa

total de la dieta, pueden constituir una fuente importante de ácidos grasos esenciales (3, 9, 15).



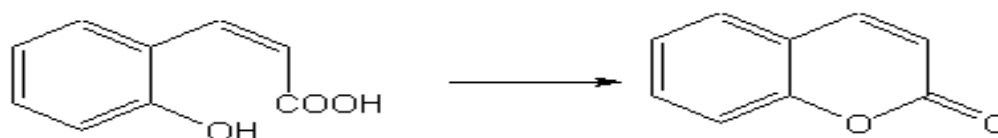
Fosfolípidos, donde X representa la colina, etanolamina, serina, inositol, glicerol

Figura 8. Estructura de fosfolípidos (9).

6. Cumarinas.

a) Características generales

Compuestos ampliamente repartidos en el reino vegetal, siendo más abundante cuando se secan. Presentan una estructura básica de 2H-1-benzopiran-2-ona. Se originan por lactonización del ácido cis-O-hidroxicinámico o ácido cumárico (figura 9). Se encuentran en hojas, frutos, semilla y raíces, mayormente en las Gramineas y Umbilíferas. Da un olor agradable en el espliego, la aspenilla olorosa, el tabaco, etc. Tipo de lactona, se prohíbe su uso como saborizante por ser tóxico, tienen propiedades anticoagulante y aromatizante (14,16).



Lactonización del ácido cumárico

Figura 9. – Lactonización del ácido cumarico (14).

b) Clasificación

- **Hidroxi o metoxi cumarinas**
- **Cumarinas isoprenílicas**
- **Piranocumarinas**
- **Uranocumarinas**

c) **Actividad farmacológica** - Venotónicas, protectoras vasculares, antibiótica, espasmolíticas y vasodilatadores, fotosensibilizantes utilizados en el tratamiento de la psoriasis (10,13).

7. **Taninos**

a) **Características generales** - Los taninos son polifenoles hidrosolubles, que se utilizan desde la antigüedad por sus propiedades curtientes y antisépticas, ya que estos presentan la propiedad de precipitar las macromoléculas como las proteínas (16).

b) Distribución en la naturaleza

- **Hidrolizables**
 - **Monocotiledóneas**
 - **Dicotiledóneas**
- **No hidrolizables**
 - **Más frecuentes en dicotiledóneas**

c) **Clasificación**

Clásicamente se clasifican en dos grandes grupos:

- Hidrolizables Gálicos
- Elágicos Condensados (catéquicos) (3,5)

d) Actividad farmacológica - Astringentes tanto por vía tópica, como interna, antidiarreicos, antioxidantes naturales, antisépticos y vasoconstrictores (para el tratamiento de hemorroides) (9,12).

8. Taninos Rojos

Suelen aparecer en las familias de las Fanerógamas (robles, encinas) y en algunas Criptógamas. Son solubles en agua, acetona y alcohol. En medicina se emplean para combatir la tos, la bronquitis, las quemaduras, heridas (coagulantes), hemorroides, diarreas, excesiva sudoración. Industrialmente se usan para curtir cuero.

Los taninos catéquicos son sustancias que los ácidos no hidrolizan; los ácidos fuertes con calor o los agentes de oxidación, los convierten en rojos u oscuros. Tienen propiedades astringentes de uso externo y antidiarreico. Los taninos gálicos son ésteres de ácido gálico y ácido digálico con dos osas, generalmente la glucosa y la hemamelosa (derivado de la ribosa) (3, 7, 9, 16).

9. Compuestos reductores

Compuestos que poseen una o varias funciones alcohólicas y una función pseudo aldehídica (aldosa) o cetónica (cetosas). Son importantes en la alimentación, la glucosa y la fructosa, que son directamente asimilables. La glucosa es producida en la escala industrial por hidrólisis ácida de almidón. Se utiliza para preparar el suero glucósado en medicina y líquidos fisiológicos (13).

10. Alcaloides

a) Características generales - Son sustancias orgánicas de origen vegetal con una actividad fisiológica muy intensa en dosis pequeñas. Contienen nitrógeno en su molécula y con frecuencia se presentan combinados con ácidos orgánicos o taninos. Representan entre el 0,1-3% del peso seco de la planta. En 1803, Derosne aisló por primera vez un alcaloide: la morfina. Su gran actividad exige una gran precaución en su empleo por causar intoxicaciones en muchas ocasiones mortales. Actualmente se conocen más de 4000 alcaloides, aunque su presencia probablemente quede reducida

a menos del 10% de las especies botánicas. Algunas familias botánicas destacan por su riqueza en alcaloides: Buxacáceas, Amarilidáceas, Euforbiáceas, leguminosas, Liliáceas, Papaveraceas, Ranunculáceas, Solanáceas y Asteráceas entre otras (3, 17).

b) Naturaleza química - Los alcaloides son sustancias más o menos tóxicas que actúan primariamente sobre el sistema nervioso central, tienen un carácter básico, contienen nitrógeno heterocíclico y son sintetizados en plantas partiendo de aminoácidos y derivados inmediatos (3).

Los alcaloides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal aunque se ha demostrado que ciertos grupos están característicamente exentos de ellos (5).

Pueden ser sólidos, solubles en alcohol o insolubles en el agua. Se extraen mediante el agua, alcohol, con álcalis y con disolventes orgánicos apolares. Su función es reguladora y protege a la planta contra los insectos y parásitos (6).

Los alcaloides son solubles en agua, se manejan procedimientos donde el agua acidulada puede conducir a un extracto que pueda ser testificado directamente con uno o más reactivos estándar precipitadores de alcaloides (6).

c) Actividad farmacológica - En medicina, farmacología y fitoterapia se emplean en estado puro o por químsíntesis como drogas vegetales (quinina, morfina), Aproximadamente 30 de los alcaloides conocidos se usan en **medicina**. Por ejemplo, la atropina, que se obtiene de la **belladona**, dilata las pupilas; la morfina es un calmante; la **quinina** es un remedio específico para la **malaria**; la **nicotina** es un insecticida potente y la **reserpina** un tranquilizador. También para infusiones se utilizan (cafeína, té) y en bebidas refrescantes (colas). Existen innumerables plantas que tienen alcaloides: opio, cafeto, té, comezuelo del centeno, ruda, cicuta, belladona, eléboro, etc. (13).

11. Flavonoides y derivados

a) Características generales

i. Propiedades físicas - Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son sólidos con

colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo.

Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul.

Las flavanonas y flavanoles debido al carbono quiral C-2 presentan rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos (3, 13, 17).

b) Naturaleza química - La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona.

Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo (3, 15, 16).

Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural (13).

Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos (13).

i. Distribución y estado natural - Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en plantas verdes (especialmente angiospermas), y solo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas flavonoides), como glicósidos, como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de encontrar. Las antocianinas

por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul. Muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal, sin embargo de las raíces de *Lonchocarpus subglauscens* (Leguminosae) se aislaron varias flavonas, flavonoles, isoflavonas, rotenoides, leucoantocianinas, charconas, uronas y flavanoles (5, 13, 19).

c) Clasificación - **Según la estructura química de la cadena intermedia como se muestra en la figura 10.**

- **Flavonas**
- **Flavanonas**
- **Flavonoles**
- **Flavandioles (leucoantocianos)**
- **Antocianos**
- **Chalconas**
- **Uronas (19).**

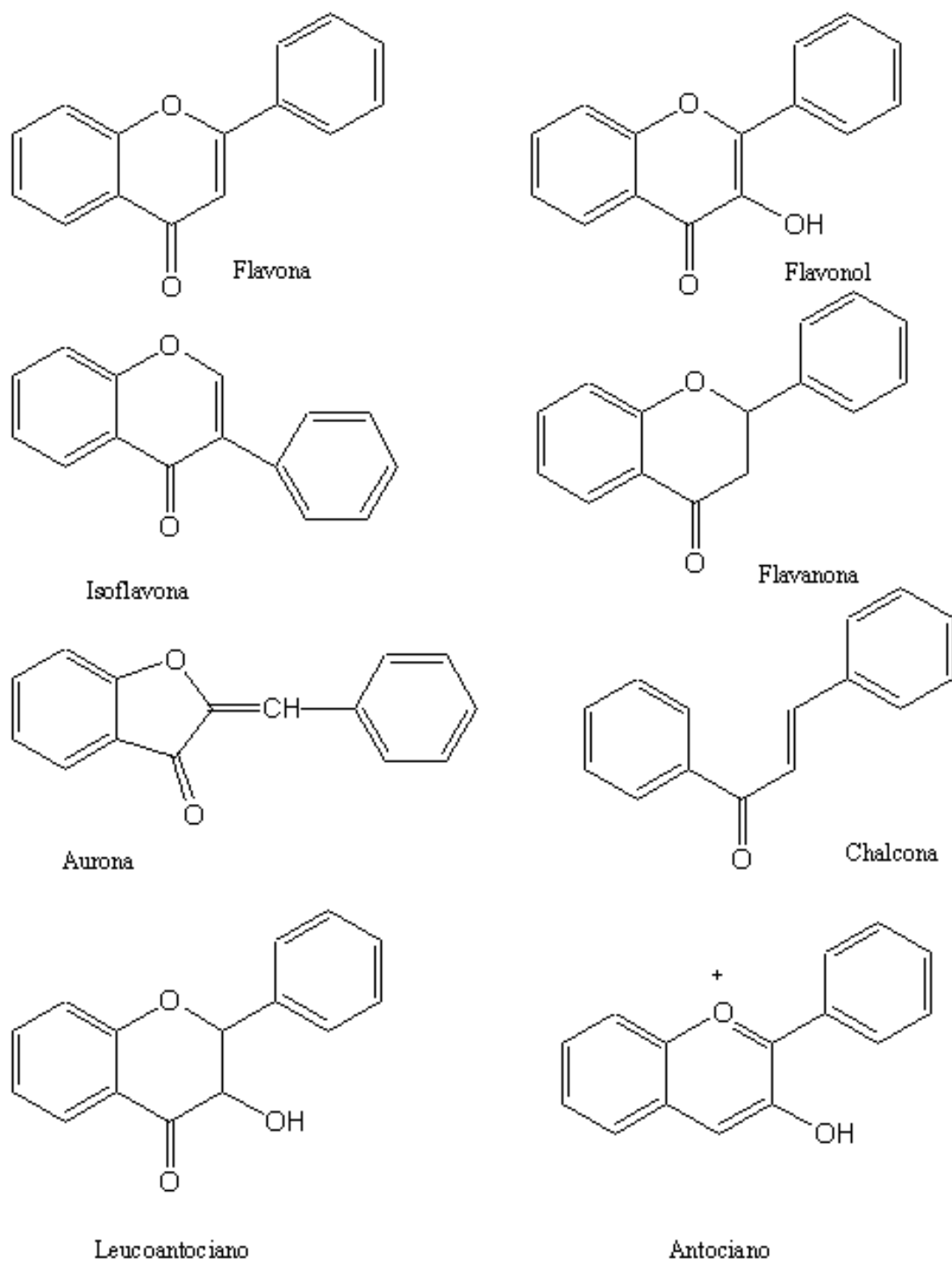


Figura 10. Clasificación de los flavonoides (19).

d) Actividad farmacológica

i. Actividad biológica de los flavonoides - Los flavonoides se han aislado de muchas drogas vegetales debido a que son productos naturales muy comunes. Su presencia en una droga vegetal no necesariamente explica sus propiedades farmacológicas. Se les ha atribuido una cantidad de propiedades farmacológicas, incluyendo actividades inhibitorias de enzimas (hidrolasas, ciclooxigenasas, fosfatasa alcalina, cAMP fosfodiesterasas, ATP-ases, liasas, hidroxilasas, transferasas, oxidoreductasas y kinasas), antiinflamatoria, anticancerígena, antibacterial y antiviral. La crisina se encuentra en el álamo (*Populus sp.*) y en la cereza salvaje (*Prunus sp.*), la apigenina en el perejil, el kaempferol en el sen, y la liquiritigenina en el regaliz. La rutina presente en la cáscara de los cítricos fue alguna vez considerada como la vitamina P, pero actualmente no se le reconoce como tal (13, 16, 20).

El uso de la rutina para el tratamiento de la fragilidad capilar es motivo de controversia, pero sin embargo es utilizada para el tratamiento de la hipertensión y en geriatría. Las flores de saúco (*Sambucus niger*), usadas para el tratamiento de resfriados, influenza y reumatismo, contiene varios glicósidos flavonoides (3, 20).

Una cantidad de isoflavonas (derivados de la 3-fenil--cromona) posee actividad estrogénica y produce esterilidad en las ovejas que consumen trébol. La silibina y la silimarina son flavolignanos constituyentes del cardosanto (*Silybum marianum*) el cual se utiliza ampliamente en Alemania para la protección del hígado. Algunos dímeros flavonoides (biflavonoides) como el diinsininol tienen acción antiinflamatoria (16, 20).

La quercetina y la rutina tienen efectos anticancerígenos potenciales (16).

También existen algunas evidencias que los consumidores de vinos rojos y vino tinto presentan baja mortalidad por enfermedad coronaria, y que ello se debe a los compuestos fenólicos presentes, entre los cuales están los flavonoides catequina, epicatequina y quercetina. Las procianidinas presentes en las uvas tienen uso potencial en isquemias cardíacas (3, 12, 16, 17, 20).

También se han reportado flavonoides que inhiben la agregación plaquetaria, con acción vasodilatadora (naringenina, eriodictyol y luteolina), con acción antiarrítmica, chalconas con acción antimicótica y antibacteriana, la 3-ramnosilquercetina presenta actividad antidiarréica, isoflavanquinonas con potente actividad antiinflamatoria y antialérgica, flavonoles con actividad antiespasmolítica, isoflavonas y flavanonas antimicóticas, isoflavanos antimicrobianos y flavanos con actividad leishmanicida. Las antocianinas por sus características se han sugerido como colorantes de alimentos. Además se ha informado el uso potencial de ciertos flavonoides en cosméticos (3, 13, 20).

ii. Función Biológica - Aunque todavía no se conoce exactamente el papel que desempeñan los flavonoides en los vegetales, se tienen algunas evidencias experimentales que sugieren que cumplen una o varias de las siguientes funciones:

- Su capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta, los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de radiaciones dañinas, y además se ha sugerido que participan en el proceso de la fotosíntesis.
- Sus variados colores y su presencia en tejidos como los de las flores, sugieren que participan en procesos como la reproducción favoreciendo la atracción de insectos polinizadores.
- Las diferentes actividades biológicas halladas para algunos de los flavonoides (antimicrobiana, antimicótica, etc.) y las evidencias experimentales de que algunos aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales (es decir que actúan como fitoalexinas), sugieren que estas sustancias también son un mecanismo químico de defensa vegetal.
- La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales presentada por algunos flavonoides sugiere que actúan como reguladores del crecimiento vegetal (19).

12. Antraquinonas y antracenosoides

a) Características generales - Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad p-quinoide en un núcleo antracénico, cuyos carbonos se enumeran tal como se muestra en la figura 11 (21).

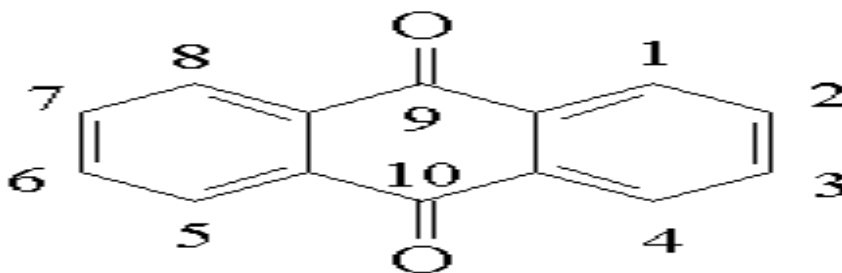


Figura 11. Enumeración de los carbonos en el núcleo de las antraquinonas (21).

b) Clasificación - Los compuestos antracénicos vegetales pueden clasificarse según su estado de oxidación en siete grupos estructurales:

- Antraquinonas
- Antronas
- Diantronas
- Antranoles
- Oxantronas
- Naftodiantronas
- Antrahidroquinonas
- Emoides

La figura 12 muestra las estructuras básicas de estas siete clases de compuestos antracénicos. Puede observarse en el caso de las diantronas (dímeros de las antronas), que el enlace que une las dos unidades básicas, es decir el enlace entre los carbonos 10 y 10', genera la posibilidad de isómeros CIS y TRANS a través del mismo. Además, si las dos unidades básicas son idénticas, se dice que son **homodiantronas** (por ejemplo las senidinas A y B), mientras que si son diferentes, se las llama **heterodiantronas** (por ejemplo las senidinas C y D), los emoides son derivados de ácido de la antraquinona, relacionado con pigmentos en plantas, hongos, líquenes e insectos (3, 21).

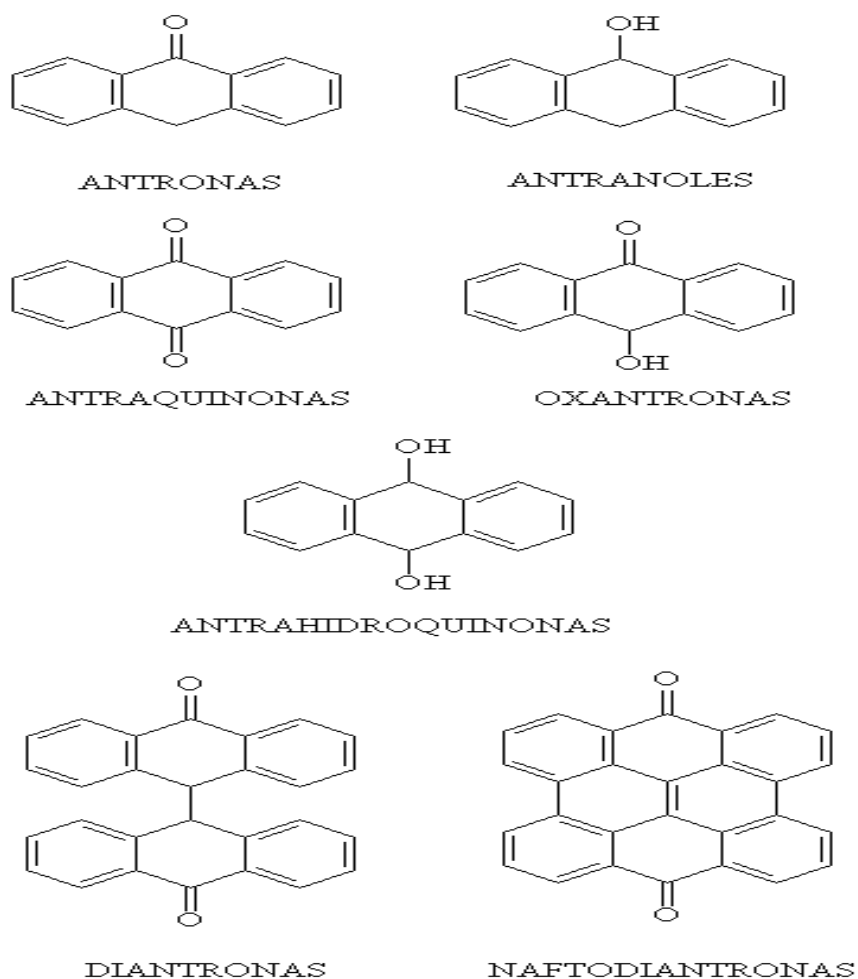


Figura 12. Núcleos básicos de compuestos antracénicos (21).

c) **Biogénesis** - Las antraquinonas y demás compuestos antracénicos citados, son biosintetizados por la ruta de la malonil-Coenzima A en el caso de los hongos, líquenes y plantas superiores de las familias *Ramnáceas*, *Poligonáceas* y *Leguminosas*; mientras que en las Rubiáceas, las Gesneriáceas, las Escrofulariáceas, las Verbenáceas y las Bignoniáceas, se biosintetizan a partir de ácido shikímico y ácido mevalónico (14, 16, 19, 21).

i. **Biogénesis vía MalonilCoA** - En este proceso, una molécula de AcetilCoA se condensa sucesivamente con 7 moléculas de MalonilCoA para producir una cadena poliketídica de 16 carbonos u octacétido. Luego, el octacétido se pliega de la manera mostrada en la figura 13, y se cicliza por condensaciones entre los grupos metilenos y sus vecinos carbonilos para dar el triciclo cetónico. Este intermedio

enoliza para generar el núcleo de las antronas. El núcleo de las antronas puede dimerizarse enzimáticamente para producir diantronas, o puede oxidarse para dar antranoles y/o antraquinonas (21-23).

ii. Biogénesis vía ácido shikímico + ácido mevalónico - La figura 14 esquematiza el proceso de biogénesis de antraquinonas por combinación de las rutas del ácido shikímico y la AcetilCoA (a través de su derivado ácido mevalónico). Inicialmente, una molécula de ácido shikímico se condensa con una molécula de ácido -cetoglutarico (proveniente del ciclo de los ácidos cítricos). Posteriormente, el anillo del ácido shikímico es deshidratado y aromatizado. Luego, ocurre una condensación intramolecular entre el carbonilo proveniente del ácido shikímico y el metileno al grupo carbonilo proveniente del ácido -cetoglutarico, para formar el biciclo. Después, al biciclo se une una cadena de 5 carbonos denominada isopentenilo (proveniente de AcetilCoA vía ácido mevalónico). Esta cadena se cicliza al anterior anillo formado, y luego de procesos de oxidación y aromatización se llega a las antraquinonas (21-23).

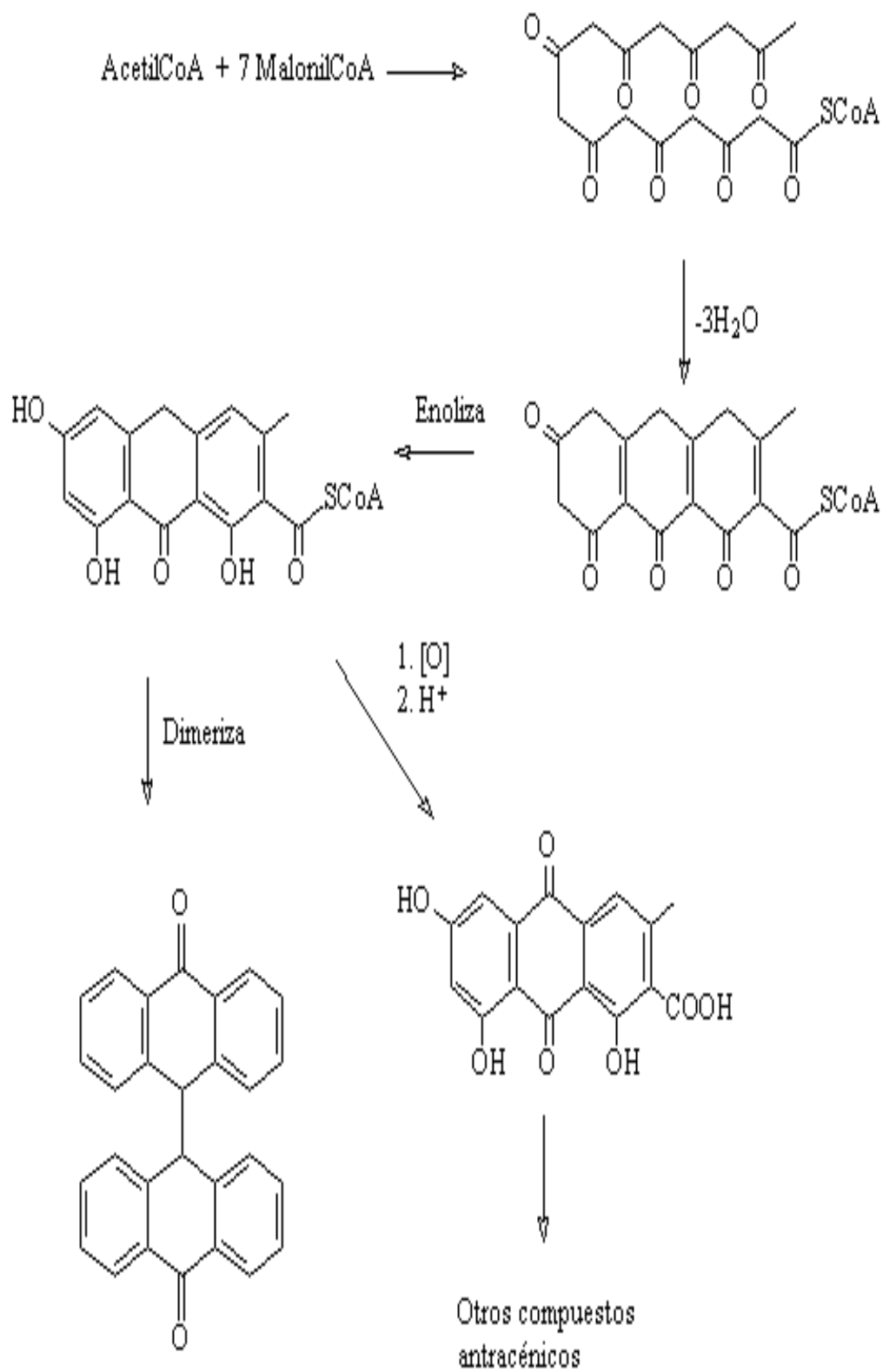


Figura 13. Biogénesis de compuestos antracénicos vía MalonilCoA (23).

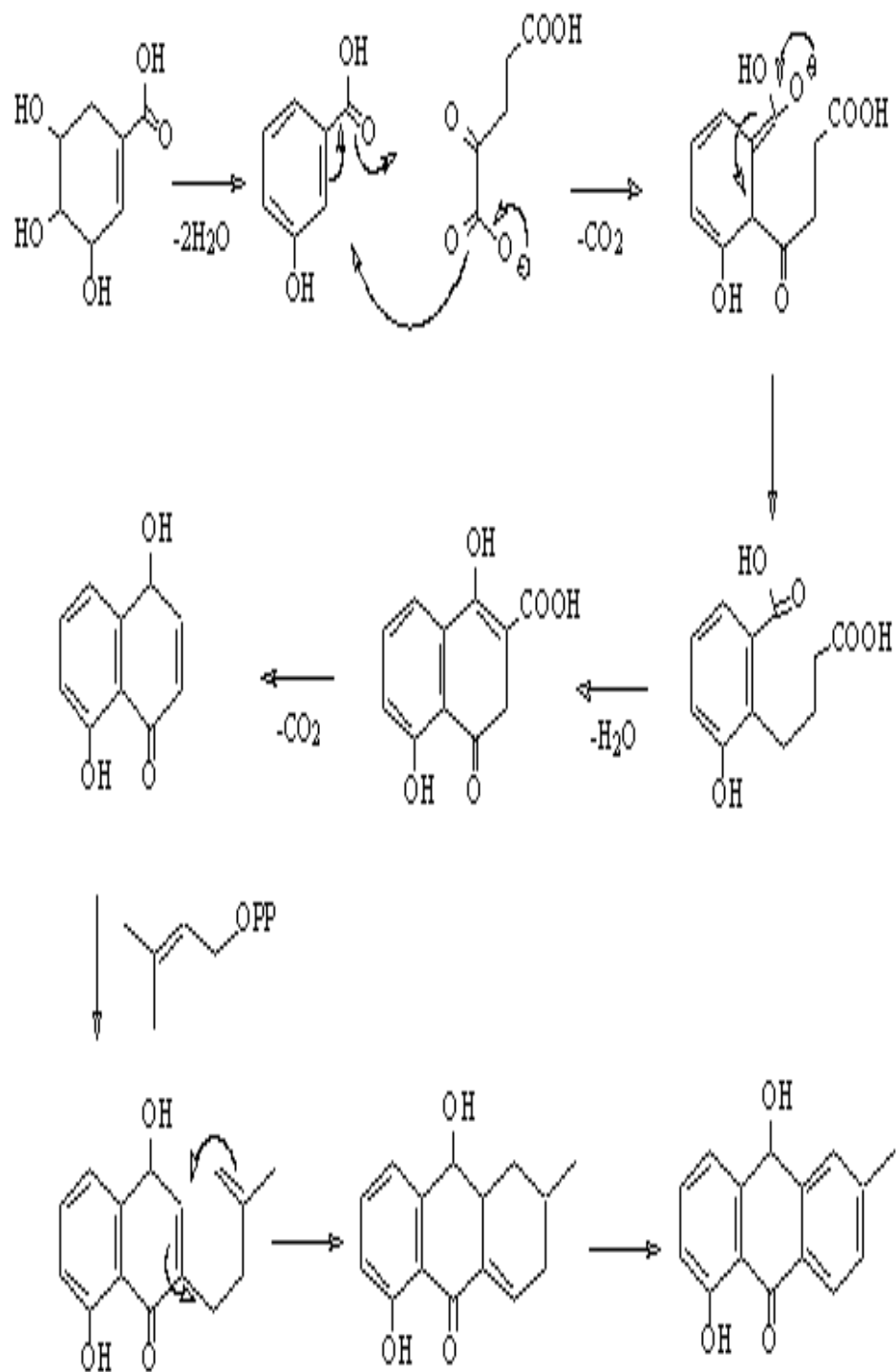


Figura 14. Biogénesis de compuestos antracénicos vía ácido shikímico + Ácido mevalónico (23).

d) Distribución y estado natural - Las antraquinonas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas, equinodermos e insectos (23).

Las familias vegetales más ricas en compuestos antracénicos son las rubiáceas, las ramnáceas y las polygonáceas; y en una menor proporción las liliáceas, leguminosas, bignoniáceas, melastomatáceas, droseráceas, vismiáceas, etc. (3, 23).

En las plantas inferiores como los líquenes se conoce una gran variedad de antraquinonas, incluyendo antraquinonas halogenadas como por ejemplo la 7-cloroemodina. Estas sustancias pueden encontrarse en diferentes partes de la planta como hojas, tallos, madera y frutos (13).

Se las encuentra principalmente en forma de glicósidos (por ejemplo las senidinas y la barbaloina), y en menor proporción en forma libre o agliconas (por ejemplo alizarina y crisofanol). También se han reportado compuestos antracénicos sulfatados. Sin embargo, existen todavía dudas acerca del verdadero estado natural de estas sustancias, pues existen evidencias experimentales de ciertas plantas, las cuales demuestran que las antraquinonas no se encuentran como tales en ellas, sino que son productos de degradación enzimática de las correspondientes formas reducidas (es decir, las antronas y los antranoles) (4, 24).

Según esto, las antraquinonas aisladas corresponden a productos de oxidación o dimerización de antronas o antranoles. Por lo anterior, antes de realizarse reportes de antraquinonas vegetales debe considerarse esta posibilidad (24).

e) Naturaleza química

i. Hechos estructurales - Las antraquinonas naturales generalmente presentan las siguientes características estructurales:

- Tienen grupos OH en C-1 y C-8.
- Tienen un grupo Metilo, hidroximetileno o carboxilo sobre el carbono 3.
- Tienen un grupo OH u OMe en el C-6.
- Los carbohidratos ligados son principalmente glucosa, ramnosa y rutinosa.
- Los O-glicósidos tienen los carbohidratos ligados a través de C-6 o C-8.

- Los C-glicósidos tienen los carbohidratos ligados a través de C-10 (29).

f) Propiedades farmacológicas - Las drogas vegetales que contienen antraquinonas poseen según la dosis acciones variables como colagogos, laxantes o purgantes (4, 29).

Las 1,8-dihidroxiantraquinonas son los principios activos de drogas laxantes como el sen, el ruibarbo, la cáscara sagrada y la penca zábila (13).

Los compuestos antracénicos más activos son los O-glicósidos de diantronas y antraquinonas, y los C-glicósidos de antronas con el grupo metileno C-10 libre. Para la acción catártica se requiere que la antraquinona posea dos grupos hidroxilos en C-1 y C-8, un grupo metilo, hidroximetileno o carboxilo en C-3, y un grupo hidroxilo o metoxilo en C-6 (3, 5, 9).

Las geninas antracénicas se absorben en el intestino grueso a nivel del colon con efectos irritantes e indeseables, mientras que los glicósidos por ser más polares se absorben menos. Una vez que traspasan la pared intestinal estas sustancias excitan las terminaciones nerviosas locales del sistema nervioso autónomo, induciendo una acción neuoperistáltica (5, 16-19).

Las antraquinonas también se encuentran presentes en *Alkanna tinctoria*, la cual es usada como antidiarréico en lugar de laxante, posiblemente debido a la presencia de taninos (18).

13. Polisacáridos y carbohidratos

a) Características generales – Los polisacáridos son sustancias que resultan de la condensación de un número mayor de 10 osas. Poseen un elevado peso molecular. Parcial o totalmente insolubles en agua. No tienen sabor dulce. Precipitan con alcohol absoluto y sales de calcio y bario

Hidratos de carbono, grupo de compuestos, también llamados glúcidos, o osas que contienen hidrógeno y oxígeno, en la misma proporción que el agua, y carbono. La fórmula de la mayoría de estos compuestos se puede expresar como $C_m(H_2O)_n$. Sin

embargo, estructuralmente estos compuestos no pueden considerarse como carbono hidratado, como la fórmula parece indicar.

Los hidratos de carbono son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Las plantas verdes y las bacterias los producen en el proceso conocido como fotosíntesis, durante el cual absorben el dióxido de carbono del aire y por acción de la energía solar producen hidratos de carbono y otros productos químicos necesarios para que los organismos sobrevivan y crezcan.

Entre los hidratos de carbono se encuentran el azúcar, el almidón, la dextrina, la celulosa y el glucógeno, sustancias que constituyen una parte importante de la dieta de los humanos y de muchos animales. Los más sencillos son los azúcares simples o monosacáridos, que contienen un grupo aldehído o cetona; el más importante es la glucosa. Dos moléculas de monosacáridos unidas por un átomo de oxígeno, con la eliminación de una molécula de agua, producen un disacárido, siendo los más importantes la sacarosa, la lactosa y la maltosa. Los polisacáridos son enormes moléculas formadas por uno o varios tipos de unidades de monosacáridos unas 10 en el glucógeno, 25 en el almidón y de 100 a 200 en la celulosa.

En los organismos vivos, los hidratos de carbono sirven tanto para las funciones estructurales esenciales como para almacenar energía. En las plantas, la celulosa y la hemicelulosa son los principales elementos estructurales. En los animales invertebrados, el polisacárido quitina es el principal componente del dermatoesqueleto de los artrópodos. En los animales vertebrados, las capas celulares de los tejidos conectivos contienen hidratos de carbono. Para almacenar la energía, las plantas usan almidón y los animales glucógeno; cuando se necesita la energía, las enzimas descomponen los hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono se utilizan para fabricar tejidos, películas fotográficas, plásticos y otros productos. La celulosa se puede convertir en rayón de viscosa y productos de papel. El nitrato de celulosa (nitrocelulosa) se utiliza en películas de cine,

cemento, pólvora de algodón, celuloide y tipos similares de plásticos. El almidón y la pectina, un agente cuajante, se usan en la preparación de alimentos para el hombre y el ganado. La goma arábica se usa en medicamentos demulcentes. El agar, un componente de algunos laxantes, se utiliza como agente espesador en los alimentos y como medio para el cultivo bacteriano; también en la preparación de materiales adhesivos, de encolado y emulsiones. La hemicelulosa se emplea para modificar el papel durante su fabricación. Los dextranos son polisacáridos utilizados en medicina como expansores de volumen del plasma sanguíneo para contrarrestar las conmociones agudas. Otro hidrato de carbono, el sulfato de heparina, es un anticoagulante de la sangre (10-13).

14. Amidas

a) Características generales - Cada uno de los compuestos orgánicos que se pueden considerar derivados de un **ácido carboxílico** por sustitución del grupo —OH del ácido por un grupo —NH_2 , —NHR o $\text{—NRR}'$ (siendo R y R' radicales orgánicos). Formalmente también se pueden considerar derivados del **amoníaco**, de una **amina** primaria o de una amina secundaria por sustitución de un hidrógeno por un radical ácido, dando lugar a una amida primaria, secundaria o terciaria, respectivamente (3-6, 9-16).

Todas las amidas, excepto la primera de la serie, son sólidas a temperatura ambiente y sus puntos de ebullición son elevados, más altos que los de los ácidos correspondientes. Presentan excelentes propiedades disolventes y son **bases** muy débiles. Uno de los principales métodos de obtención de estos compuestos consiste en hacer reaccionar el amoníaco (o aminas primarias o secundarias) con **ésteres** (4-6, 9-12).

Las amidas son comunes en la naturaleza, y una de las más conocidas es la **urea**, una diamida que no contiene hidrocarburos. Las proteínas y los péptidos están formados por amidas. Un ejemplo de poliamida de cadena larga es el **nailon**. Las amidas también se utilizan mucho en la industria farmacéutica (3, 5, 11, 13, 16).

15. Saponinas

a) Características generales - Las saponinas son glicósidos esteroides con un núcleo espirostanos (figura 15) que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas (12).

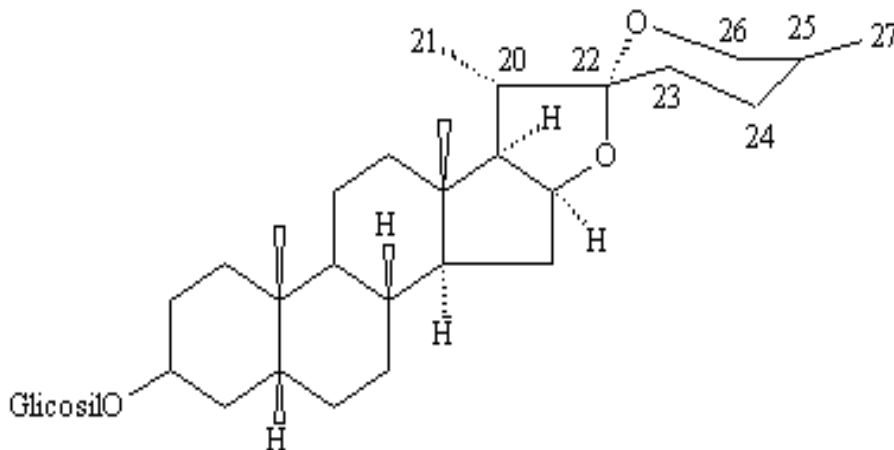


Figura 15. Estructura básica de las saponinas esteroides y enumeración de los carbonos en los anillos E y F (12).

i. Hidrólisis - Como O-glicósidos, las saponinas esteroides se hidrolizan fácilmente en medio ácido o enzimáticamente. Ambos procesos liberan una o varias unidades de carbohidratos ligados, y la denominada **sapogenina esteroide** (6, 7, 18).

ii. Nomenclatura - Muy comúnmente, a las saponinas esteroides se las denomina con nombres vulgares con terminación ina. La IUPAC establece el nombre de estas a partir del núcleo básico **espirostrano**. La figura 16 muestra las estructuras de varias saponinas esteroides conocidas (8-13).

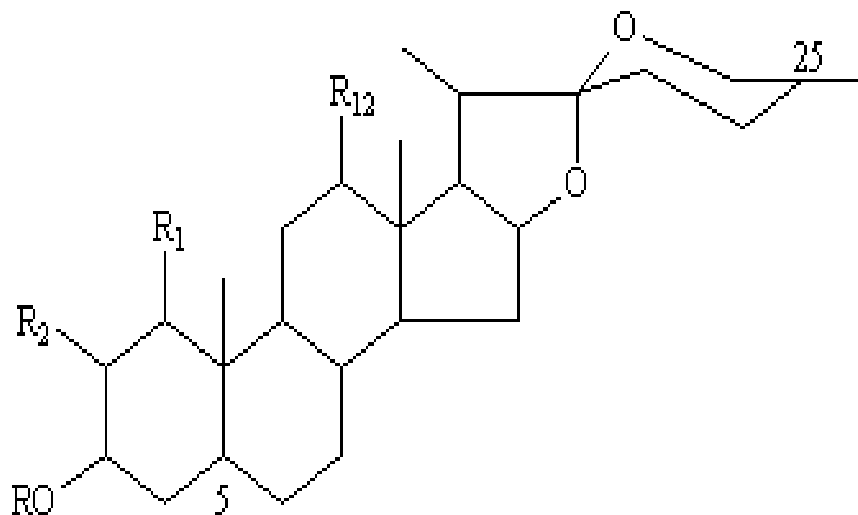


Figura 16. Estructuras de algunas sapogeninas y saponinas esteroideas naturales (13).

Para el caso de la sapogenina de la dioscina, la cual se conoce con el nombre vulgar de diosgenina, su nombre IUPAC es (24R)-Espirost-5-én-3 β -ol. Por otro lado, para la hecogenina (la sapogenina de la heconina) su nombre IUPAC es: (24R)-11-oxa-espirostán-3-ol (3, 22).

16. Mucílagos o gomas

a) Características generales - Sustancia gelatinosa exudada por ciertas plantas. Las gomas están compuestas por **ácidos** orgánicos complejos, llamados ácidos de la goma, o por sus sales. Cuando se hidrolizan, estos ácidos, como la arabina o ácido arábico, dan azúcares (arabinosa, galactosa, xilosa) y ácidos simples. Las gomas tienen consistencia similar a la cola cuando se mojan, pero son duras si están secas. Son incoloras e inodoras y no se disuelven en **disolventes** orgánicos, aunque son muy solubles en agua. Sirven de base para elaborar mucílagos, se usan en el apresto de tejidos, el estampado de géneros de algodón y como emulgentes y calmantes en medicamentos (3-9, 17-23).

La goma arábiga, un exudado de distintas especies de **acacia**, es un ejemplo característico de las gomas que contienen arabina. La de mejor calidad se obtiene de

las especies *Acacia senegal* y *Acacia arabica*, que crecen en el oeste y el norte de África. La goma forma en agua una solución espesa y límpida; si a esta solución se añade alcohol etílico ligeramente acidificado con ácido clorhídrico, se obtiene arabina. De parecidas características es la goma ceresina, exudada por la **corteza** de varias especies de *Prunus*, como el **cerezo** y el **ciruelo** (5, 7, 12, 17-23).

El tragacanto, que se obtiene de varias especies de *Astragalus* nativas de Turquía e Irán, en particular *Astragalus gummifer*, es representativo de las gomas que contienen basorina. La **gelatina**, semejante al tragacanto, absorbe hasta 50 veces su peso en agua y forma un mucílago viscoso. El tragacanto es un tipo de sangre de dragón (13-18, 20, 22, 23).

Muchas gomorresinas y otros exudados vegetales reciben a menudo el nombre de gomas. Las gomorresinas son sustancias que contienen goma y resina, por lo cual son sólo solubles en mezclas de agua y alcohol. Las principales gomorresinas son las llamadas gomas de amoníaco, asafétida, benzoína, gálbano, gutagamba, mirra y sandárac. El **látex**, del cual proceden el chicle, el caucho y la gutapercha, es una mezcla de gomorresinas, ceras y grasas (18-24).

17. Glucósidos cianogénicos

a) Características generales - Los glicósidos cianogénicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de -lactona, β -insaturada o -lactona-, β -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca. Se conocen entonces según el anillo lactónico dos grandes clases de cardiotónicos: Los **cardenolidos**, con anillo de -lactona, y los **bufanólidos o escilanolidos**, con anillo de -lactona. La figura 17 muestra la estructura estereoquímica general de ambas clases de sustancias (4-9, 18, 20).

Dentro de las recetas o pócimas que utilizaban las brujas para curar enfermedades estaba como ingrediente la piel de sapo, muchos años después se comprobó la presencia de sustancias bioactivas: Los bufanólidos, presentes en ranas del género *Bufus* (13, 14, 18).

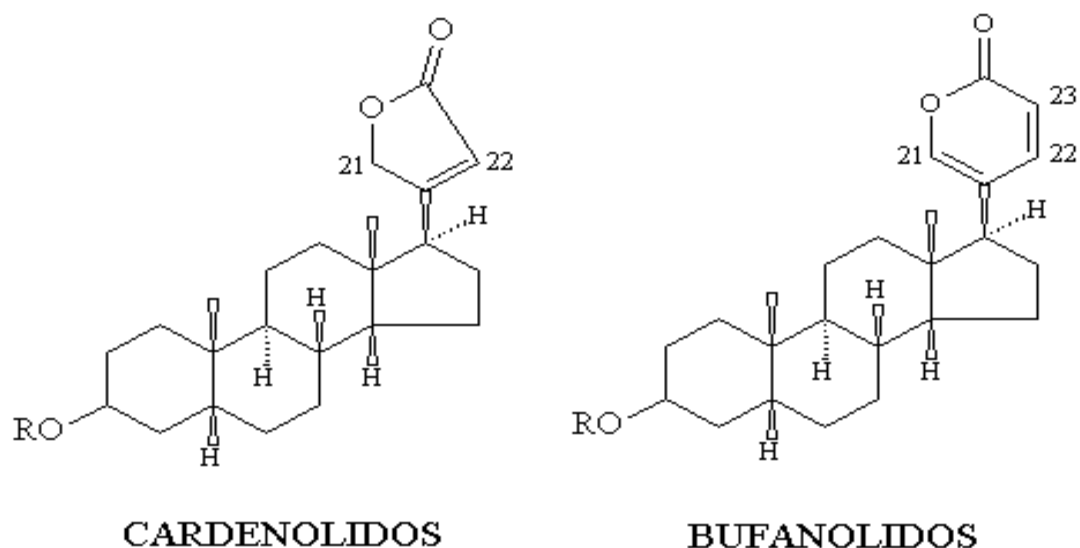


Figura 17. Estructura general de cardiotónicos (R=H, aglicona ; R=Gli, Glicósido) (20).

b) Distribución natural - Los cardiotónicos se encuentran principalmente en las hojas de plantas de las familias *Scrophulariaceae*, *Apocynaceae*, *Liliaceae*, *Ranunculaceae* y *Moraceae*. Los bufanólidos se han encontrado también en ranas del género *Bufus*, y en las alas de mariposas monarca, han sido considerados de interés por su potencial anticancerígeno (6-10).

i. Hidrólisis - Los glicósidos cardiotónicos se hidrolizan fácilmente en soluciones ácidas liberando la sapogenina y los carbohidratos ligados. En medio alcalino, además de liberarse la sapogenina ocurre epimerización sobre el carbono 17 y apertura del anillo lactónico (5-9, 13, 14).

c) Naturaleza química - Los cardiotónicos naturales en su gran mayoría, poseen:

- -un anillo lactónico , β -insaturado en posición 17 β
- -un grupo hidroxilo o glicosilo en posición 3 β
- -un grupo hidroxilo en posición 14 β

- -configuración cis entre los anillos A/B y C/D
- -otros grupos hidroxilo en 1, 5, 12, 16, etc.
- -el grupo metilo 19 algunas veces oxidado hasta alcohol o aldehído
- -1 a 4 unidades de carbohidrato ligadas al oxígeno del carbono 3
- -los carbohidratos ligados son principalmente glucosa y
- desoxiazúcares como digitoxosa, cimarosa, etc.

Los desoxiazúcares son una característica importante de los glicósidos cardiotónicos, ya que esta clase de carbohidratos se encuentra prácticamente restringida a estas sustancias naturales (5-9, 12, 16, 18, 20, 23).

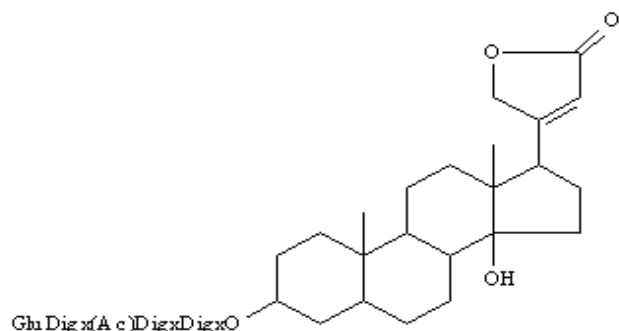
La figura 18 muestra algunos ejemplos de cardiotónicos naturales y desoxiazúcares más comunes (9, 12-14, 23).

d) Actividad farmacológica - Los cardiotónicos tienen acción inotrópica positiva, es decir, incrementan las fuerzas de contracción del músculo cardíaco. Por otro lado, las hojas de digital tienen un efecto diurético. Por estas razones se les utiliza en tratamientos de nefritis, edemas y algunas enfermedades infecciosas (5-7, 13).

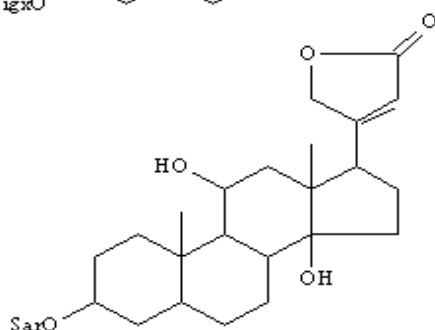
Se ha establecido que para que los cardiotónicos manifiesten su actividad requieren además del ciclo lactónico, β -insaturado, que:

- -la configuración sea $14\beta, 3\beta, 17\beta$
- -configuración A/B cis

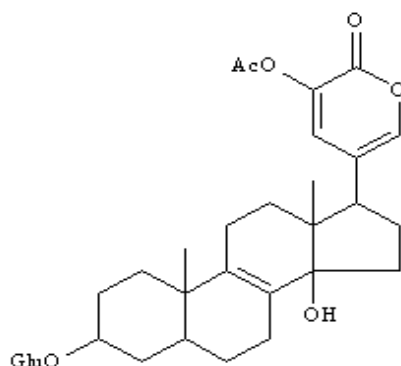
En cuanto a los carbohidratos ligados, entre menos unidades contenga la molécula, más posibilidad existe de epimerización del hidroxilo 3, lo que se traduce en un aumento de su toxicidad y disminución de la acción cardiotónica debido al cambio de polaridad. Además, se ha observado que la presencia de azúcares ligados y el número de hidroxilos tienen capacidad en aumentar la actividad farmacológica (7-12, 20-22).



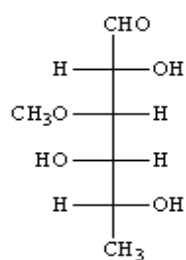
Digilánido-A, Digitoxigenina
Digitalis purpurea



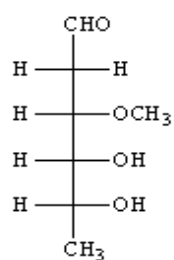
Sarmentocimarina, Sarmentogenina
Strophantus sp.



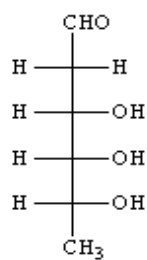
Scillirósido, Scillirosidina
Scilla maritima



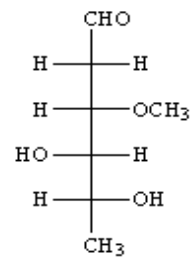
D-Digitalosa



D-Cimarosa



D-Digitoxosa



D-Sarmentosa

Figura 18. Algunos ejemplos de cardiotónicos y desoxiazúcares naturales (23).

IV. JUSTIFICACION

Las plantas han jugado un papel importante y fundamental en el desarrollo de la humanidad, tanto en la utilización artesanal de las mismas, como en su posterior estudio como fuente de materia prima para las industrias farmacéuticas, alimenticias, etc.

Guatemala es un país que se caracteriza por la diversidad de sus zonas agroecológicas, sus riquezas naturales y que posee una gran variedad de plantas nativas, algunas de las cuales son usadas artesanalmente como medicina o alimento, en nuestro país, el recurso natural como recurso de investigación es muy poco utilizado a pesar que se cuenta con una gran biodiversidad de flora, donde muchas de las especies son candidatos potenciales para la obtención de materia prima de importancia médica.

El estudio de una gran cantidad de especies vegetales de uso industrial, hacen necesario disponer de métodos confiables y sencillos, ajustados a la realidad del país, que permitan la identificación de las familias de metabolitos secundarios en plantas, de una manera sistemática.

La implementación y fusión de metodologías utilizadas por investigadores de fitoquímica del país y del exterior, permiten unificar las técnicas para obtener un procedimiento enriquecido que amplía el margen de identificación de metabolitos secundarios, logrando una mayor cobertura de todas aquellas familias químicas de importancia industrial; por las características de los métodos incluidos en esta investigación, éstos podrán ser utilizados en estudio de tamizaje de familias químicas en las plantas de uso medico artesanal comúnmente utilizadas en Guatemala.

V. OBJETIVOS

A. General

Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*.

B. Específicos

1. Implementar la metodología para tamizaje fitoquímico, empleando técnicas que sean químicas y no instrumentales.
2. Implementar la metodología para el tamizaje fitoquímico, mediante la determinación de familias químicas de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*.
3. Optimizar la metodología tomando en consideración la técnica de extracción comparando frío con caliente.

VI. HIPOTESIS

- A. La temperatura a la cual se realiza la extracción tiene un efecto directo sobre las familias químicas de metabolitos secundarios presentes en la planta *Myrica cerifera* extraídos con hexano, metanol y agua.
- B. No se encontrarán en los extractos sometidos a calor, aquellas familias de metabolitos secundarios de la planta *Myrica cerifera* que sean lábiles al calor.
- C. Es posible determinar la presencia de una amplia gama de familias químicas de metabolitos secundarios con métodos y técnicas no instrumentales.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo

Metodología para determinar la presencia de familias de metabolitos secundarios en plantas de uso tradicional.

B. Muestra

Tres extractos diferentes, cedidos por el Ing. César García del Centro de Investigaciones de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala; en solventes de distinta naturaleza; polar, apolar y semipolar (hexano, agua, metanol respectivamente), extraídos por lixiviación y proceso de extracción Soxhlet del fruto de la planta *Myrica cerifera* obtenida de campesinos recolectores del municipio de Morazán departamento del Progreso. .

C. Recursos

1. Recursos Humanos

- a) Ivo Mahelly Santizo Rodas (tesista)
- b) Lic. Alba Marina Valdés de García (asesor)
- c) Ing. César García G. (asesor)

2. Institucionales

- a) Laboratorio de química del Centro de Investigaciones de Ingeniería, edificio T5 Ciudad universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- b) Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, edificio T12, Ciudad Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.

3. Equipo

Baño de María (60 grados Celsius +/-1).

Cronómetro.

Equipo de destilación por arrastre de vapor.

Equipo de filtración al vacío.

Plancha de calentamiento.

4. Materiales ver cuadros 2-5 anexo III

Beacker de 10 ml.

Beacker de 100 ml.

Beacker de 250 ml.

Beacker de 5 ml.

Beacker de 50 ml.

Capilares.

Contenedor de cromatoplasmas (cromatocámara).

Cromatoplasmas Silicagel 60F₂₅₄.

Extracto hexánico de *Myrica cerifera* obtenido por técnica de
lixiviación.

Extracto metanólico de *Myrica cerifera* obtenido por técnica de
lixiviación.

Extracto acuoso de *Myrica cerifera* obtenido por técnica de
lixiviación.

Extracto hexánico de *Myrica cerifera* obtenido por técnica
Soxleth.

Extracto metanólico de *Myrica cerifera* obtenido por técnica
Soxleth.

Extracto acuoso de *Myrica cerifera* obtenido por técnica Soxleth

Gradilla.

Lámpara UV 366 nm.

Macropipeteador.

Maskin Type o Crayon Graso.

Mechero.

Papel filtro Wathman 1.

Papel parafilm.
Pinzas para crisol.
Pinzas para tubo de ensayo.
Pipetas de 1 ml.
Pipetas de 10 ml.
Pipetas de 2 ml.
Pipetas de 3 ml.
Pipetas de 5 ml.
Pizeta de 300 ml.
Tubo de ensayo de 20 ml.
Tubos de ensayo de 10 ml.
Cajas de Petri con agar sangre

5. Reactivos Ver preparación de reactivos en anexo II

Acetato de etilo
Ácido acético
Ácido fórmico
Ácido sulfúrico concentrado
Anisaldehido
Dietilamina
 FeCl_3 1%
HCl 10 %
HCl 2%
HCl 20%
HCl concentrado
Hematoxilina
KOH 0.5 M
Lugól
Magnesio metálico
 NH_4OH 25%
Reactivo de Carr-Price

Reactivo de Fehling
Reactivo de kedde
Reactivo de Komarowsky
Reactivo de Mayer
Reactivo de productos naturales (NP/PEG)
Reactivo de sangre/agar sangre
Reactivo de Séller-Killiani
Reactivo de Wagner
Reactivo dragendorff
Reactivo Liebermann-Bouchard
Solución gelatina a 1% (p/V)
Solución gelatina-sal
Solución KOH etanólica al 5%
Prueba de amonio
Timol
Vainillina

5. Estándares

Antraquinonas al 0.1% en MeOH
Colesterol en cloroformo 0.1%
Cumarinas al 1% en metanol
Digitalis purpurea en MeOH
Flavonoides al 0.05% en metanol

D. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios en extractos de *Myrica cerifera*.

El material que se utilizó como muestra fueron los extractos ya filtrados, pero por la importancia de conocer las condiciones preanalíticas de las muestras se describe a continuación el proceso de extracción y todas las variables que intervienen en dichos procesos.

1. Etapa de recolección de muestra para el tamizaje

La primera etapa del tamizaje fitoquímico consiste en realizar la colecta de el fruto de arrayán *Myrica cerifera* que fue el que posteriormente se tamizó, en este caso la colecta y extracción fue realizado por un grupo de investigadores del Centro de Investigaciones de Ingeniería encabezados por el ingeniero César García en particular, el fruto fue obtenido de agricultores de la región del municipio de Morazán, departamento del Progreso, que recolectan el fruto a una altitud de 1500 m en época estacional, que comprende de octubre a enero; el fruto se colectó en la etapa de desarrollo y maduración, en la cual los pobladores de la región usualmente lo colectan para su uso; un total de 15 libras de fruto fue transportado en bolsas negras, posteriormente fue secado en un espacio no expuesto a luz solar directa y ventilado naturalmente.

Al fruto se le efectuó un proceso de limpieza, para eliminar trozos de planta que no fueran de interés en el estudio (25).

Se tomaron 70 gr. del fruto seco y limpio para preparar los extractos.

2. Preparación de los extractos vegetales de *Myrica cerifera*.

La primera etapa del tamizaje consistió en realizar 6 extracciones con tres solventes distintos y dos tipos diferentes de técnicas extractivas; esta etapa la realizaron investigadores del Centro de Investigaciones de Ingeniería en el edificio T5 de la ciudad universitaria, Universidad San Carlos de Guatemala, el grupo fue encabezado por el Ingeniero César García, quien cedió los extractos para su posterior tamizaje; 60 gr. del fruto fueron colocados en tres erlenmeyer con una capacidad de 250 ml y se agregaron 200 ml del solvente extractor, en este caso cada erlenmeyer tendrá un solvente diferente; se mantuvo en agitación en frio con un magneto mecánico (lixiviación) durante 72 horas cada uno de los erlenmeyer utilizados, remplazando el volumen del solvente cada 24 horas.

En ambos procedimientos, en caliente y en frio, se filtró utilizando equipo de filtrado al vacío y papel filtró Wathman 1.

Para la preparación del extracto en caliente se pesaron 10 gr. de la muestra y fueron divididas en tres porciones.

Cada una de las porciones se colocó en un dedal de extractor Soxleth, previamente seco y tarado.

Al sistema Soxleth armado se le agregaron 100 ml de solvente, usando hexano, metanol y agua, cada uno por separado.

A cada sistema se le aplicó 40, 60, 100°C respectivamente durante 24 horas continuas en reflujo.

Posterior a las extracciones se obtuvieron los extractos hexánicos H_f y H_c , el primero relaciona el extracto obtenido a temperatura ambiente y el segundo relaciona al extracto obtenido en caliente o por extracción en Soxleth. De la misma manera se obtuvieron extractos A_f y A_c , relacionados a los extractos metanólicos y AC_f y AC_c , relacionados al extracto de agua o acuoso a temperatura ambiente y en caliente (25).

4. Determinación de condiciones de extracción

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final son: naturaleza del solvente, el estado de división de la planta, la agitación, la temperatura, el pH y el tiempo de extracción (25-27).

a) Solventes - Respecto a los solventes utilizados, la polaridad se encuentra muy relacionada con la solubilidad, es por ello que un compuesto que forma enlaces de hidrógeno con el agua tiende a ser más soluble en ella que uno que no los forma. Por tanto, se puede decir que el agua es un excelente disolvente de compuestos iónicos. Así también, el metanol forma puentes de hidrógeno y puede disolver compuestos iónicos, pero en menos proporción; mientras que el hexano no puede disolver compuestos iónicos.

Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae, selectivamente o no, ciertas clases de compuestos.

Entre los solventes generales, los más utilizados son los alcoholes alifáticos de hasta 3 carbonos o mezclas de estos con agua, hexano y agua. Estos solventes logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés.

Debido a su poder extractivo, estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, siendo necesario agotar, completamente, la planta (25-27).

b) Estado de división de la planta - La eficiencia del proceso extractivo sería mayor cuando menor sea el tamaño de la partícula ya que, así, se obtiene una mayor área de contacto con el solvente. En la práctica, la presencia de partículas muy finas dificulta el proceso de extracción, pues presentan compactación y los procesos de maceración, en donde las partículas pasan al extracto, hacen necesaria la realización de la etapa adicional de filtración, la cual no siempre es de fácil ejecución. La penetración del solvente en fragmentos mayores de la planta es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil. Por esta razón, se recomienda la utilización de tamaños de partícula semejante a polvos moderadamente gruesos en el proceso extractivo (25-27).

c) Agitación - La eficiencia del proceso extractivo es función del equipo de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entre en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación es alcanzado. El movimiento del líquido, con ayuda de bombas para la recirculación del solvente o agitadores magnéticos, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficacia del proceso (25-27).

d) Temperatura - La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura; de la misma manera que la agitación, la temperatura contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser degradados, total

o parcialmente, a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles (25-27).

e) pH - El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales. La obtención de alcaloides constituye un ejemplo clásico de la influencia del pH en el proceso de extracción.

La extracción de alcaloides con solventes orgánicos de baja polaridad exige un pretratamiento con soluciones alcalinas, buscando con esto liberar los alcaloides de sus sales y, así, volverlos solubles en el solvente orgánico.

En el caso de extracción de alcaloides con soluciones acuosas es necesario un pH ácido, buscando con esto la conversión de los alcaloides en sus respectivas sales, solubles en agua (25-27).

f) Tiempo de extracción - El tiempo de extracción se determina, experimentalmente, en función del solvente y el equipo seleccionado. Esta variante es resultante de todos los factores mencionados previamente.

El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario, no influye en el proceso negativamente, pero, si influye en los costos del consumo de energía y de mano de obra no necesaria, lo que acarrea encarecimiento del proceso industrial (25-27).

g) Lixiviación - La maceración consiste en dejar la planta en contacto con el solvente durante varios días, con agitación constante. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración de metabolitos entre la planta y el solvente, y, depende de factores que están relacionados con la planta, por ejemplo: su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y cantidad, asimismo factores que están relacionados con el solvente, por ejemplo: la selectividad y la cantidad. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación

planta/solvente aumenta. El hinchamiento de la planta es factor importante, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente (25-27).

5. Determinación de las familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos de hexano, metanol y agua de *Myrica cerifera*.

Tanto en los extractos obtenidos en frío y en caliente se realizaron la totalidad de las pruebas descritas a continuación:

a) Extracto hexánico - Se inició con un volumen de 200 ml del extracto, se prepararon dos alícuotas una de 20 ml y una de 180 ml, ver procedimiento 1, anexo I (28-30).

i. De la alícuota de 20 ml, fracción H1 - Se evaporó a sequedad en baño de maría a 60 grados Celsius, (cuando se haga referencia a la evaporación o concentración se asume que se realizó a 60 grados Celsius en baño de maría), y se disolvió el residuo en 50 ml de etanol (28-30).

- **Determinación de la presencia de aceites esenciales**

Se tomaron 10 ml de la alícuota disuelta en etanol y se destilaron con arrastre a vapor, al destilado, se le efectuaron extracciones con éter (2 x 20 ml), con la porción etérea obtenida se realizaron CCF hexano/éter 8:2, **manchas coloreadas de color amarillo** en la cromatoplaqueta **representaron la presencia de aceites esenciales** (28-30).

- **Fase preparatoria**

A la alícuota etanólica restante de 40 ml, se le agregaron 10 ml de KOH 0.5 M, se le aplicó reflujo durante 2 horas, posteriormente se agregaron 20 ml de agua, se evaporó el etanol de la fase acuosa y se

efectuó extracción con éter (3 x 10 ml), se separó las fases acuosa y fase etérea (28-30).

- **Fase acuosa, determinación de presencia de ácidos grasos**

Se acidificó hasta pH 3-4, se efectuó extracción etérea (2 x 10 ml), con la fase etérea obtenida, se evaporó hasta sequedad, la formación de **residuos cristalinos representaron la presencia de ácidos grasos** (28-30).

- **Fase acuosa, determinación de triterpenos/esteroles, carotenos**

Se dividió en dos alícuotas, a una de las alícuotas se le agregó reactivo de Liebermann – Bouchard, **reacción coloreada, representaron la presencia de triterpenos/esteroles** (28-30).

- **Fase acuosa, determinación de la presencia de carotenos**

A la alícuota separada de la fase acuosa se le agregó reactivo de Carr-Price, la **reacción de precipitación** de este reactivo, **representó la presencia de carotenos** (28-30).

ii. De la alícuota de 180 ml, fracción H2 - Se evaporó la fracción hasta un volumen de 50 ml, este volumen se dividió en 5 alícuotas de 5 ml y 1 de 10 ml (28-30).

- **Determinación de la presencia de alcaloides**

Se tomó la alícuota de 10 ml, se evaporó a sequedad en baño de maría, el residuo que se obtuvo se disolvió en 3 ml de HCl al 2%, esta suspensión se dividió en 3 alícuotas de 1 ml cada una, a cada una de esas alícuotas se les agregó Reactivo de Meyer, Reactivo de Wagner y Reactivo de Dragendorff, reacciones de precipitación representaron la presencia de alcaloides.

Este mismo procedimiento se utilizó en los extractos acuoso y metanólico, por lo que en la descripción del procedimiento en estos extractos, no se citó esta prueba nuevamente (28-30).

- **Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más alcaloides**

Esta prueba se realizaron si y solo si la prueba química arroja resultados positivos.

De la alícuota de 180 ml se tomaron 5 ml, y se concentraron a 100µl en baño de maría, se realizaron una aplicación de la muestra de un volumen de 100µl en la cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄.

Se utilizaron como estándar: soluciones al 1% de atropina y papaverina en metanol (10µl) y como fases móviles: Tolueno-ácido acético-di etilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1), Detección: Reactivo de Dradendoff a 254 VIS (28-30).

- **Determinación de la presencia de carotenos**

Se tomó una alícuota de 5 ml, se evaporó, se adicionó 3 gotas de CHCl₃ y agregó en gotas el reactivo de Carr-Price como máximo 0.5 ml, **reacción de precipitación representó la presencia de carotenos** (28-30).

- **Determinación de la presencia de agliconas flavonoides**

Se tomó una alícuota de 5 ml se evaporó, el residuo se disolvió en 2 ml de MeOH caliente, se adicionó limaduras de Mg + 1 ml de HCl concentrado. Se dejó reposar 10 minutos, una **coloración rubia rojiza represento la presencia de agliconas flavonoides** (28-30).

- **Determinación de la presencia de cumarinas**

Se tomó una alícuota de 5 ml, se evaporó, el residuo se disolvió en 1 ml de agua hirviendo, se aplicó con microcapilar 2 manchas en papel filtro, se aplicó en una de las dos manchas 1 gota de KOH 0.5 M, **fluorescencia a longitud de onda de 366 nm., representó la presencia de cumarinas** (28-30).

- **Determinación de triterpenos/esteroles**

Se tomó una alícuota de 5ml y se evaporó, el residuo se disolvió en 1 ml de CHCl_3 , se adicionó Reactivo de Liebermann-Bouchard. **Anillo verde, Interfase marrón representó la presencia de triterpenos/esteroides** (28-30).

- **Determinación de la presencia de emoides**

Se tomó una alícuota de 5ml y se evaporó, el residuo se disolvió en 1 ml de NH_4OH 25 %, **Coloración bermeja, representó la presencia de emoides** (28-30).

b) Extracto acuoso - Se inició con un volumen de 200 ml del extracto, se prepararon dos alícuotas de 100 ml cada una, ver procedimiento 2, anexo I (28-30).

i. De la alícuota de 100 ml, fracción AC1 - Se prepararon 6 alícuotas de 5ml y 1 de 3 ml

- **Determinación de la presencia de amidas**

Se tomó una alícuota de 5 ml y se le agregó 3ml de agua, a esta dilución se le agregaron 2 gotas de lugól, una **coloración azul, representó la presencia de amidas** (28-30).

- **Determinación de la presencia de mucílagos**

Se tomó una alícuota de 5ml y se le agregó 10 ml de acetona, a esta mezcla se le agregó 2 gotas de hematoxilina, se agitó y se filtró, un **precipitado violeta, representó la presencia de mucílagos** (28-30).

- **Determinación de compuestos reductores**

Se tomó una alícuota de 5 ml y se le agregó 1 ml de Reactivo de Fehling, se dejó en reflujo 30 min., un **precipitado color ladrillo, representó la presencia de compuestos reductores** (28-30).

- **Determinación de polisacáridos**

Se tomó una alícuota de 5ml y se le agregó 5 gotas de H₂SO₄ concentrado, a esta mezcla se le agregaron 3 a 4 gotas de timol, una **coloración rojiza, representó la presencia de polisacáridos** (28-30).

- **Determinación de taninos gálicos y catéquicos**

Se tomó la alícuota de 3 ml y se le agregaron 2 ml de agua, se le agregaron 3 a 4 gotas de FeCl₃, una **coloración azul, representó la presencia de taninos gálicos, y una coloración verde, representó la presencia de taninos catéquicos** (28-30).

- **Determinación de la presencia de saponinas**

Se tomó una alícuota de 5ml, se le agregó 45 ml de agua, se calentó la mezcla a 60 grados Celsius durante media hora, se agitó durante 10 min., si se mantiene la **espuma 30 min. a mas de 3 cm. de altura, representó la presencia de saponinas** (28-30).

- **Prueba de caracterización de saponinas** Ver procedimiento 4 anexo I

Estos se realizaron por medio de un test de hemólisis utilizando cajas de agar sangre para el mismo, un test de espuma y una prueba química con el reactivo de Lieberman-Bouchard, con lo que se puede determinar el tipo de saponina a la que pertenece el compuesto, de la siguiente forma:

Positivo para todos los test, y en el reactivo de Lieberman-Bouchard azul o verde, fueron **saponinas esteroidales**.

Positivo para todos los test, y en el reactivo de Lieberman-Bouchard rojo, púrpura o violeta, fueron **saponinas triterpenoides**.

Positivo para todos los test, y en el reactivo de Lieberman-Bouchard negativo, amarillo pálido, fueron **saponinas de heterosidos de esteroides saturados o triterpenos saturados**.

Positivo o negativo para test de hemólisis, negativo el test de espuma y positivo para test de Lieberman-Bouchard, **saponinas ausentes, triterpenos libres, diterpenos, esteroides o sustratos policíclicos relacionados**. (28-30)

- **Prueba CCF para determinar la presencia de una o más saponinas**

Esta prueba se realizaron si y solo si las prueba químicas arrojaron resultados positivos.

Se tomó una alícuota de 10 ml de extracto original, se concentró hasta 5 ml y se aplicó 25-40 µl en cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄

Se utilizaron como estándar: Solución de saponinas al 0.1 % en metanol (10 µl) y como fases móviles: Cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40), la detección: Reactivo de sangre.

Zonas hemolíticas blancas en fondo rojo, Reactivo de Liebermann-Bouchard: UV 365 nm o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides

Reactivo de Komarowsky: Zonas azules, amarillas y rojas

Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillas, representaron la presencia de saponinas (28-30).

ii. De la alícuota de 100 ml, fracción AC2 - Al volumen total de la alícuota se le agregó 20 ml de HCl y se dejó en reflujo durante 30 minutos, luego se le agregó 20 ml de agua, se dejó concentrar hasta 30 ml y se efectuó una extracción etérea (3 x 20 ml), de la cual se obtuvo una fase acuosa y una fase etérea (28-30).

- **Fase acuosa, determinación de antocianinas**

Se elevó el pH de la solución a 9-10, **coloración verde, castaño o azul, representó la presencia de antocianinas** (28-30).

- **Fase etérea**

Los 60 ml obtenidos de la fase etérea se concentraron hasta 30 ml y se dividieron en 4 alícuotas 2 de 10 ml y 2 de 5 ml.

- **Determinación de antracenoides**

Se tomó una alícuota de 5 ml y se evaporó, el residuo se disolvió en NH_4OH 25 %, una **coloración roja, representó la presencia de antracenoides** (28-30).

- **Determinación de cumarinas**

Se repitió el proceso efectuado en el extracto hexánico.

- **Determinación de flavonoides**

Se tomó una alícuota de 10 ml, se evaporó y los residuos se disolvieron en metanol al 50 %, se le adicionó raspas de Mg y 1 ml de HCl, se esperó durante 10 minutos, **coloración roja, representó la presencia de flavonoides** (28-30).

- **Determinación de triterpenos/esteroles**

Se repitió el proceso efectuado en el extracto hexánico.

c) **Extracto alcohólico**- Se inició con un volumen de 300 ml del extracto, se prepararon tres alícuotas de 100 ml cada una, procedimiento 3, anexo I.

i. De la alícuota de 100 ml, fracción A1 - Se tomó la alícuota y se concentró hasta 40 ml, de el concentrado de 40 ml se dividió en 4 alícuotas dos alícuotas de 5 ml y una de 30 ml (28-30).

- **Determinación de la presencia de taninos gálico y catéquicos**

Se tomó una alícuota de 5 ml, se le agregó 2 ml de agua caliente, se dejó enfriar y se separó en 4 tubos de ensayo (a, b, c, d).

Al **tubo a** con la porción de alícuota, se le agregó 4-5 gotas de gelatina al 1% (p/v).

Al **tubo b** con la porción de alícuota, se le agregó 4-5 gotas de solución gelatina sal.

Al **tubo c** con la porción de la alícuota se le agregó 5 gotas de FeCl_3 al 1%.

El **tubo d** se conservó como blanco

Precipitados y cambios de color, representaron la presencia de taninos gálicos si el color es azul y de taninos catequicos si el color es verde (28-30).

- **Determinación de la presencia de compuestos reductores**

Se tomó una alícuota de 5ml y se le agregaron 5 ml de reactivo de Fehling, se dejó en reflujo durante 30 min., un **precipitado de color ladrillo, representó la presencia de compuestos reductores (28-30).**

- **Determinación de la presencia de aminas cuaternarias**

Se tomó la alícuota de 30 ml y se evaporó, el residuo se disuelve en 20 ml de HCl al 10%, de esta suspensión, se retiraron 3 ml para el test de alcaloides, y 10 ml para el test de flavofenoles o taninos rojos.

La porción restante de 7 ml se alcalinizó a pH 9, con esta alícuota se efectuaron extracciones etéreas (3 x 10 ml), se evaporó la fracción etérea, se disolvió el residuo en 3 ml de HCl al 3%, la formación de un **precipitado representó la presencia de Aminas cuaternarias (28-30).**

- **Determinación de la presencia de chalconas y flavofenoles**

Los 10 ml separados de la porción acidulada de la determinación de ácidos cuaternarios, se calentaron 10 minutos, una **coloración roja inmediata representó la presencia de chalconas** y la **formación de polímeros insolubles de color café-rojizo, representaron la presencia de flavofenoles** (28-30).

ii. Alícuota de 100 ml fracción A2 - De la alícuota de 100 ml separada del volumen inicial (300 ml), se concentró hasta 50 ml, a esta porción concentrada, se le agregaron 20 ml de ácido al 20% y se sometió a reflujo durante 30 minutos, posteriormente se le agregaron 20 ml de agua, esta mezcla se evaporó hasta 30 ml, con esta porción se efectuaron extracciones etéreas (3 x 20 ml), se separó la fase etérea de la acuosa (28-30).

- **Fase acuosa**

- **Determinación de la presencia de leucoantocianinas**

La alícuota resultante se dividió en dos porciones a y b .

La **porción a** se elevó el pH de la solución hasta 9-10, un **color verde –castaño o azul, representó la presencia de antocianinas.**

La **porción b** se le agregó 0.5 ml de HCl concentrado, calentar por 5 minutos, un **precipitado resultante, representó la presencia de leucoantocianinas** (28-30).

- **Fase etérea**

El volumen que se obtuvo de la extracción etérea, se concentró hasta 30 ml, este volumen se alícuotó en 5 porciones 3 de 10 ml y 2 de 5 ml (28-30).

- **Determinación de la presencia de flavonoides**

Se tomó una de las alícuotas de 10 ml y se evaporó, el residuo se disolvió en metanol al 50%, seguidamente se le agregaron raspas de Mg y 1 ml de HCl concentrado y se esperó 10 minutos la reacción, una **coloración roja representó la presencia de flavonoides** (28-30).

- **Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más flavonoides en extracto alcohólico**

De la solución original se aplicó 25-30µl en cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄. Como estándares se utilizaron: Soluciones de flavonoides al 0.05% en metanol (10µl), como fases móviles: acetato de etilo-ácido fórmico - ácido acético (100:11:11:27) y para la detección: Reactivo de productos naturales (NP/PEG) y se le aplicó fluorescencia en UV a 365 nm, **fluorescencias varias, representaron la presencia de flavonoides** (28-30).

- **Determinación de la presencia de antracenoides**

Se tomó una alícuota de 5 ml y se evaporó, el residuo se disolvió en 3 ml de NH₄OH al 25%, una **coloración roja representó la presencia de antracenoides** (28-30).

- **Determinación de la presencia de triterpenos/esteroles**

Se tomó una alícuota de 10 ml y se evaporó, al residuo se le agregó el reactivo de Liebermann-Bouchard, **color azul, verde, rosa o gris representó la presencia de triterpenos/esteroles** (28-30).

- **Determinación de la presencia de cumarinas**

Se tomó una alícuota de 5 ml., se evaporó, el residuo se disolvió en 1 ml de agua hirviendo, se aplicó con microcapilar 2 manchas en papel filtro, se

aplicó en una de las dos manchas 1 gota de KOH 0.5 M, **fluorescencia a longitud de onda de 366 nm, representó la presencia de cumarinas** (28-30).

- **Prueba CCF para determinar la presencia de uno o más cumarinas en el extracto alcohólico**

Una alícuota de 10 ml se concentró hasta 1ml, se aplicó con microcapilar 20 µl en una cromatoplaaca de silicagel 60F₂₅₄.

Se utilizó como estándar solución de cumarinas al 1% en metanol (10µl), como fases móviles: Tolueno-Acetato de etilo (93:7), Tolueno éter (1:1, saturado con ácido acético al 10%) y para la determinación: **Solución etanólica de KOH al 5%, UV-365 nm fluorescencia azul o verde** (28-30).

i. **De la alícuota de 100 ml, fracción A3** – Se alicuotó la fracción en 6 fracciones, 2 de 30 ml y 3 de 10 ml y 1 de 5 ml.

- **Determinación de la presencia de esteroides insaturados**

Se tomó una alícuota de 30ml y se evaporó, con el residuo se trato con éter, hasta que se eliminaron todos los pigmentos (el éter salga incoloro), se el agregó 10 ml de benceno y se agitó durante unos minutos, se evaporó, a el residuo se le agregó 10 ml de cloroformo, se filtró con NaSO₄ y el filtrado se dividió en tres alícuotas:

Tubo 1 se le agregaron 3 gotas de reactivo de Liebermann-Bouchard, **cambio de color denota la presencia de esteroides**

Tubo 2 se efectuó el ensayo del anillo (test de Salkowski), se agregó ácido sulfúrico concentrado, resbalado por las paredes del tubo. En la **presencia de esteroides insaturados, la formación de un anillo rojo cereza en la interfase** indica la presencia, se deben

de observar los cambios de color inmediatos o graduales durante el periodo de una hora.

Tubo 3 se utilizó como blanco, se utilizó un estándar de colesterol en cloroformo (0.1%) (28-30).

- **Determinación de la presencia de lactonas insaturadas**

De una alícuota de 30 ml y se concentró hasta 5 ml., se colocaron 3 manchas de (0.1, 0.2, 0.3 ml) sobre un papel filtró, se dejó secar, se les agregaron a cada mancha unas gotas de reactivo de Kedde, se dejó secar el papel filtró y se observaron los **cambios de color en un anillo o mancha púrpura**, lo que indica la **presencia de lactonas insaturadas**, se utilizó un estándar de *Digitalis purpúrea* en metanol al 80% (28-30).

- **Determinación de la presencia de azúcares 2-desoxigenados**

Se tomó una alícuota de 10 ml y se evaporó, se le eliminaron los pigmentos con éter, se dejó secar y se le agregó al residuo 3 ml del reactivo de Séller-Killiani, se mezcló y se resbaló por las paredes H_2SO_4 concentrado, la formación de un **anillo púrpura en la interfase, representó la presencia de azúcares 2-desoxigenados** (28-30).

- **Determinación de la presencia de principios amargos**

Se tomó una alícuota de 10 ml y se concentró hasta 2 ml., se aplicó 40 μ l en una cromatoplaqueta silicagel 60F₂₅₄.

Se utilizó como estándar: Solución de sustancia de referencia pe. Artemisina al 1% en metanol (20 μ l) y como fases móviles: Acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8), cloroformo-metanol (95:5) y para la detección: Vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico.

Zonas rojas-violetas, café-rojas, azules-verdes, Reactivo de Liebermann-Buchard: UV-365 nm, **gris, café; VIS: café oscuro, gris, denotan la presencia de principios amargos** (28-30).

- **Determinación de la presencia de antraquinonas**

Se tomó una alícuota de 10 ml y se concentró hasta 2 ml, se utilizó el test de Bontrager para la determinación, el residuo se disolvió en 30 ml de agua, se filtró y se realizaron una extracción con 10 ml de benceno. A la fase bencénica se le añadieron 5 ml de la solución de test de amonio y se agitó, **cambio de color rojo o rosado en la fase alcalina denota la presencia de antraquinonas.**

Test de Bontrager modificado : Se utiliza 0.3 gr. del material vegetal pulverizado con 10 ml de KOH alcohólico 0.5 N y 1 ml de H₂O₂ al 3% durante 10 min. en baño de maría a 60 grados Celsius, se agrega 10 ml de benceno, a la fase bencénica se le agrega 2-5 ml de test de amonio y se agita, **cambio de color rojo rosado en fase alcalina** , denota la **presencia de antraquinonas** (28-30).

- **Prueba CCF para determinar la presencia de una o más antraquinonas y diferenciar con la presencia de antronas y antranolas**

Se tomó una alícuota de 5 ml y se calentó 5 minutos a 60 grados Celsius, se filtró y se le aplicó 10µl del filtrado en una cromatoplaqueta de silicagel 60F₂₅₄. Se usó como estándar: Solución de antraquinonas al 0.1% en metanol (10 µl) y como fases móviles: Acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), (100:13.5:10), para la detección: Solución etanólica de KOH al 5 o 10%.

Zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV 365nmn, representaron la presencia de antraquinonas.

Zonas Amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm, denota la presencia de antronas y antranolas (28-30).

d) Determinación de la presencia de Glucósidos cianogénicos (Prueba de Guinard) – Se pesaron 2-5 g de material vegetal pulverizado en un erlenmeyer de 125 ml, se humedeció con agua y se le agregó 1 ml de cloroformo. Se introdujo una tira de papel filtro Whatman No 1. impregnada con picrato de sodio recién preparado, Se Insertó la tira en el erlenmeyer conteniendo el material vegetal evitando que tocó las paredes y se dejó el papel a una distancia de 1 cm. de la muestra. Se tapó el recipiente con un tapón de hule o corcho, se calentó en baño de maría (37 grados Celsius) durante 3 horas o más. Cualquier **cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo -café), denota la presencia de glucósidos cianogénicos**, ver procedimiento 5 anexo I (28-30).

e) Determinación de la presencia de aceites volátiles

i. Métodos cromatográficos CCF

• Método A

Se extrajo 1 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de diclorometano agitando por 15 minutos. Se filtró y evaporó en baño de maría a sequedad.

Se disolvió en 1 ml de tolueno y se aplicó 20-50 µl en cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄

• Método B

Se pesaron 10-50 g de material vegetal y se destiló con arrastre de vapor por 1 hora. Se recolectar el aceite esencial en xileno. Se diluyó la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es un concentrado 1:10 y se aplicó 5 µl (1:10) en cromatoplaque de silicagel 60F₂₅₄.

Se utilizó como estándar: Solución en tolueno 1:30 de mentol (alcohol), timol (fenol), anisaldehído (aldehído), acetol (fenilpropano), 1,8-cineol (óxido) (3µl), como fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7) y para la detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina-ácido sulfúrico

Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible, representaron la presencia de aceites volátiles ver procedimiento 5 anexo I (28-30).

E. Diseño experimental - Los datos que se obtuvieron de la fase experimental fueron presentados en una tabla de presencia y ausencia, como se muestra a continuación, marcando con un signo + la presencia y un signo – la ausencia, analizando esta tabla por medio de estadística descriptiva al discutir los resultados.

Tabla de presencia ausencia de familias de metabolitos secundarios en la
planta *Myrica cerifera*

Extracción con soxlet

Extracción en frio

METABOLITOS PRESENTES		EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ALCOHOLICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO HEXANICO	EXTRACTO ALCOHOLICO	EXTRACTO ACUOSO
Aceites esenciales							
Triterpenos							
Esteroles							
Carotenoides							
Ácidos grasos							
Alcaloides							
flavonoides	Agliconas						
	Cumarinas						
Emoides							
	<i>Taninos gálicos</i>						
	<i>Taninos catéquicos</i>						
	<i>Taninos rojos</i>						
	<i>Compuestos reductores</i>						
	<i>Alcaloides</i>						
	<i>Aminas cuaternarias</i>						

Antocianinas					
Leucoantocianinas					
Cumarinas					
Antracenoides					
Flavonoides					
Chalconas y uronas					
Esteroles					
Triterpenos					
Antraquinonas					
Principios amargos					
Esteroles Insaturados					
Lactonas insaturadas					
Azúcares 2-desoxigenadas					
Polisacáridos					
Amidas					
Saponinas					
Mucílagos					
Taninos gálicos					
Taninos catéquicos					
Compuestos reductores					
Alcaloides					
Antocianinas					
Antracenoides					
Cumarinas					
Flavonoides					
Chalconas y uronas					
Esteroles/triterpenos					
Glucósidos cianogénicos					

VIII. RESULTADOS

Se logró la implementación de las metodologías para la identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera* por medio de técnicas de análisis químico cualitativo no instrumental.

Se presentan los procedimientos para el análisis cualitativo de las diferentes familias de metabolitos en los procedimientos del 1 al 5

El estudio permitió establecer la presencia de las siguientes familias de metabolitos secundarios en la planta *Myrica cerifera*, de naturaleza apolar en frío: aceites esenciales, carotenoides, ácidos grasos, cumarinas; de naturaleza apolar a 40 grados Celsius: carotenoides, ácidos grasos, cumarina; de naturaleza semipolar en frío: taninos catéquicos, taninos rojos, compuestos reductores, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracenoides, chalconas y uronas, esteroides, triterpenos, esteroides insaturados, lactonas insaturadas, azúcares 2 desoxigenadas y principios amargos; de naturaleza semipolar a 60 grados Celsius: taninos catéquicos, taninos rojos, compuestos reductores, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracenoides, chalconas y uronas, azúcares 2 desoxigenadas y principios amargos; de naturaleza polar en frío: polisacáridos, saponinas, taninos gálicos, taninos catéquicos, compuestos reductores, antocianinas, antracenoides, cumarinas, chalconas y uronas, esteroides triterpenos; de naturaleza polar a 100 grados Celsius: polisacáridos, saponinas, taninos catéquicos, antocianinas, cumarinas, chalconas y uronas, esteroides triterpenos.

Con los resultados obtenidos se observó que los métodos y técnicas utilizadas en la identificación de familias de metabolitos secundarios de la planta *Myrica cerifera* son realizables con las condiciones, materiales y equipo disponible en nuestro medio; que la técnica de lixiviación es la mejor para obtener los extractos y que realizar la extracción de los metabolitos secundarios de la *Myrica cerifera*.

En este estudio se evidencia que no hay presencia de metabolitos secundarios de las familias de: en el extracto hexánico: triterpenos, esteroides, alcaloides, agliconas flavonoides y emoides; en el extracto alcohólico: taninos gálicos,

alcaloides, aminos cuaternarios, flavonoides y antraquinonas; en el extracto acuoso: amidas, mucílagos, alcaloides, flavonoides y glucósidos cianogénicos.

Los extractos obtenidos por la técnica de Soxhlet a la cual se aplica calor, muestran que se volatilizan los aceites esenciales de la planta, se degradan los esteroides, triterpenos, esteroides insaturados, lactonas insaturadas, taninos gálicos; los compuestos reductores y antracénoides son degradados a temperaturas superiores a los 60 grados Celsius.

Los resultados se muestran con mayor claridad en la tabla 2.

	Extracción con soxlet			Extracción en frío			
	EXTRACTO ETereo	EXTRACTO ALCOHOLICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ETereo	EXTRACTO ALCOHOLICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO DICLOROMETANOLICO
METABOLITOS PRESENTES							
✱ Aceites esenciales	-			+			
✱ Triterpenos	-			-			
✱ Esteroides	-			-			
✱ Carotenoides	+			+			
✱ Ácidos grasos	+			+			
✱ Alcaloides	-			-			
✱ Agliconas flavonoides	-			-			
✱ Cumarinas	+			+			
✱ Catequinas	+			+			
✱ Emoides	-			-			
☐							
✱ Taninos gálicos		-			-		
✱ Taninos catéquicos		+			+		
✱ Taninos rojos		+			+		
✱ Compuestos reductores		+			+		
✱ Alcaloides		-			-		
✱ Aminos cuaternarios		-			-		
✱ Antocianinas		+			+		
✱ Leucoantocianinas		+			+		
✱ Cumarinas		+			+		
✱ Antracénoides		+			+		
✱ Flavonoides		-			-		
✱ Chalconas y uronas		+			+		
✱ Esteroides		-			+		
✱ Triterpenos		-			+		
✱ Cardenólicos y bufadienólicos							

• <i>Esteroles Insaturados</i>		-			+		
• <i>Lactonas insaturadas</i>		-			+		
• <i>Azucares 2-desoxigenadas</i>		+			+		
✿ <i>Antraquinonas</i>		-			-		
✿ <i>Principios amargos</i>		+			+		
□							
✿ Polisacáridos			+			+	
✿ Amidas			-			-	
✿ Saponinas			+			+	
✿ Mucílagos			-			-	
✿ Taninos gálicos			-			+	
✿ Taninos catéquicos			+			+	
✿ Compuestos reductores			-			+	
✿ Alcaloides			-			-	
✿ Antocianinas			+			+	
✿ Antracenoides			-			+	
✿ Coumarinas			+			+	
✿ Flavonoides			-			-	
✿ <i>Chalconas y uronas</i>			+			+	
✿ Esteroles/triterpenos			+			+	
✿ Glucoidos cianogenicos			-			-	
✿ <i>Aceites volátiles</i>							+

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Las técnicas utilizadas son las referidas por Sharapin. N. (29), Tally. W. (30) y Santa Cruz L.(28) La técnica de Sharapin. N. fue validada con materiales y recursos existentes en nuestro medio, e integrada recomendada por Tally. W. y Santa Cruz L. resultando una técnica cualitativa libre de procedimientos instrumentales, con un espectro más amplio de identificación de metabolitos secundarios de plantas. Se utilizó cromatografía de capa fina como una técnica confirmatoria opcional para saponinas, flavonoides, cumarinas, antraquinonas y aceites volátiles.

La técnica se implementó utilizando el fruto del palo de cera o Arrayán (*Myrica cerifera*) determinando las familias de metabolitos secundarios que esta posee.

La determinación de los metabolitos secundarios del Arrayán se realizó en tres extractos proveídos por el Ingeniero Cesar García, que encabeza un grupo de investigadores dentro del Centro de Investigaciones de Ingeniería y que se realizó bajo el proyecto 50-00 financiado por CONCYT.

El proceso de la extracción se realizó por medio de dos técnicas diferentes, una aplicando calor con reflujo en extractores Soxhlet y otra por medio de agitación a temperatura ambiente (frio), denominada lixiviación. El objetivo principal de estas extracciones fue el determinar cual era la mejor técnica para recuperar compuestos activos de la planta, siendo esta, la técnica de lixiviación, debido a que con esta la cantidad de compuestos que se degradan es mínima.

El criterio que se utilizó para determinar la presencia o ausencia de un metabolito en el fruto de la planta *Myrica cerifera* es que si el mismo extracto comparado en frío y caliente, el extracto frío arroja un resultado (+) y el extracto caliente arroja un resultado (-) se concluye que la técnica tiene restricciones por la temperatura.

Corroborándose la hipótesis de que la temperatura tiene un efecto directo sobre los metabolitos secundarios presentes en el Arrayán, puesto que al aplicar calor, se volatilizan los aceites esenciales a temperaturas menores o iguales a los 40 grados Celsius, se degradan los esteroides, triterpenos, esteroides insaturados, lactonas insaturadas a temperaturas menores o iguales a los 60 grados Celsius, taninos gálicos, los compuestos reductores y antracénoides son degradados a temperaturas superiores a los 60 grados Celsius, lo que indica que todas aquellas familias de compuestos lábiles al calor serán degradados al someterlos a la técnica de extracción Soxhlet. Esto se evidencia utilizando los métodos y las técnicas propuestas para identificar cada metabolito secundario.

Los compuestos que no son afectados por la temperatura en el proceso de extracción con hexano son: carotenoides, ácidos grasos y cumarinas, en el extracto alcohólico: taninos catéquicos, taninos rojos, taninos gálicos, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracénoides, chalconas y uronas, principios amargos y azúcares 2-desoxigenados, en el proceso de extracción con agua: polisacáridos, saponinas, taninos catéquicos, antocianinas, cumarinas, chalconas y uronas y esteroides triterpenos.

Cuando los triterpenos se evidencian en el extracto polar prótico (alcohólico) y no en el extracto no polar (hexánico) esta familia de metabolitos evidencia composición oxigenada (triterpenos con función alcohol y/o carbonilo).

No fue posible evidenciar en este estudio la presencia de metabolitos secundarios tales como: en el extracto hexánico: triterpenos, esteroides, alcaloides, agliconas flavonoides y emoides; en el extracto alcohólico: taninos gálicos, alcaloides, aminas cuaternarias, flavonoides y antraquinonas; en el extracto acuoso: amidas, mucílagos, alcaloides, flavonoides y glucósidos cianogénicos.

La técnica química cualitativa que se implementó es capaz de determinar en el extracto hexánico la presencia de: aceites esenciales, triterpenos, esteroides, carotenoides, ácidos grasos, alcaloides, agliconas flavonoides, cumarinas, catequinas, emoides; en el extracto acuoso: polisacáridos, amidas, saponinas, mucílagos, taninos gálicos, taninos catéquicos, compuestos reductores, alcaloides, antocianinas, antracenoides, cumarinas, flavonoides y glucósido cianogénicos; utilizando para su confirmación las diversas técnicas y procedimientos químicos ya descritos, en el extracto alcohólico: taninos gálicos, taninos catéquicos, taninos rojos, compuestos reductores, alcaloides, aminas cuaternarias, antocianinas, leucoantocianinas, cumarinas, antracenoides, flavonoides, antraquinonas chalconas, esteroides, uronas, triterpenos, cardenólicos y bufadienólicos como esteroides insaturados, lactonas insaturadas y azúcares 2-desoxigenadas, lo que demuestra que una amplia gama de familias de compuestos químicos presentes en plantas Arrayán, es posible identificarlos con técnicas químicas no instrumentales.

Se concluye que la técnica implementada es capaz de determinar una amplia gama de familias de metabolitos secundarios por lo tanto tiene una alta especificidad cualitativa, utilizando material y equipo disponible en nuestro medio.

Tabla 2. Presencia o ausencia de familias de metabolitos secundarios en el fruto de la planta *Myrica cerifera*

METABOLITOS PRESENTES	Extracción con Soxleth			Extracción en frio		
	EXTRACTO HEXÁNICO	EXTRACTO ALCOHOLICO	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO HEXANICO	EXTRACTO ALCOHOLICO	EXTRACTO ACUOSO
Aceites esenciales	-			+		
Triterpenos	-			-		
Esteroles	-			-		
Carotenoides	+			+		
Ácidos grasos	+			+		
Alcaloides	-			-		
Agliconas						
flavonoides	-			-		
Cumarinas	+			+		
Emoides	-			-		
<i>Taninos gálicos</i>		-			-	
<i>Taninos catéquicos</i>		+			+	
<i>Taninos rojos</i>		+			+	
<i>Compuestos reductores</i>		+			+	
<i>Alcaloides</i>		-			-	
<i>Aminas cuaternarias</i>		-			-	
<i>Antocianinas</i>		+			+	
<i>Leucoantocianinas</i>		+			+	
<i>Cumarinas</i>		+			+	

Antracenoides		+			+	
Flavonoides		-			-	
Chalconas y uronas		+			+	
Esteroles		-			+	
Triterpenos		-			+	
Antraquinonas		-			-	
Principios amargos		+			+	
Esteroles Insaturados		-			+	
Lactonas insaturadas		-			+	
Azúcares 2-desoxigenadas		+			+	
Polisacáridos			+			+
Amidas			-			-
Saponinas			+			+
Mucílagos			-			-
Taninos gálicos			-			+
Taninos catéquicos			+			+
Compuestos reductores			-			+
Alcaloides			-			-
Antocianinas			+			+
Antracenoides			-			+
Cumarinas			+			+
Flavonoides			-			-
Chalconas y uronas			+			+
Esteroles/triterpenos			+			+
Glucósidos cianogénicos			-			-

Fuente: datos experimentales

X. CONCLUSIONES

- A. Los métodos y técnicas utilizadas en la identificación de familias de metabolitos secundarios de la planta *Myrica cerifera* son realizables bajo las condiciones que refiere el método de extracción, materiales y equipo disponible en nuestro medio.
- B. Al aplicar calor a la unidad de extracción, en los procesos de determinación de metabolitos secundarios del fruto de *Myrica cerifera* se causa, volatilización de los aceites esenciales de la planta, degrada los esteroides, triterpenos, esteroides insaturados, lactonas insaturadas, taninos gálicos, los compuestos reductores y antracénoides.
- C. La mejor técnica de extracción es la que utiliza la lixiviación, en frío, ya que en los extractos obtenidos por esta técnica se identificaron la mayor cantidad de familias de metabolitos secundarios en el fruto de la planta *Myrica cerifera*.

XI. RECOMENDACIONES

- D. Es posible aplicar los métodos y técnicas descritas en esta investigación, en otras plantas nativas que sean utilizadas artesanalmente.
- E. Realizar otras evaluaciones de familias de metabolitos secundarios en plantas que sean utilizadas para medicina y consumo popular, así como agroindustrial.
- F. Divulgar la información obtenida de este estudio para contribuir a promover la evaluación preliminar de metabolitos secundario en plantas.
- G. Esta investigación puede ser utilizada como una guía práctica para la realización de otros tamizajes fitoquímicos, en vista que se organizó la información en aspectos secuenciales de ejecución, materiales y equipo requerido.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Mazza G, Herbs, botanicals and teas. Lancaster 1st ed. (Pennsylvania) Ed. Technomic, 2000, 416 p.
2. Ross IA, Medicinal plants of the world. Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Totowa: Humana Press, 1999. 74p.
3. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. 3ra. Ed. Zaragoza. Ed. Acribia 1999 1987p.
4. Bruneton J. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Médicinales. 5ta. Ed. Paris. Ed. Tec & Doc. 2001. 986p .
5. Evans W. Trease y Evans, Farmacognosia. 13 ed. Madrid Ed. Interamericana 1991 971p.
6. Villar A. Farmacognosia General. 5ta ed. Madrid. Ed. Síntesis. 1999 1254p.
7. Alonso J. Tratado de Fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas. 2da ed. 1998 Buenos Aires ISIS Ediciones 1998 1487p
8. Arteché A, Vanaclocha B, Güenechea J. Fitoterapia, Vademécum de Prescripción. 3^a edición. Barcelona: Editorial Masson, 1999 1148 p.
9. Blumenthal M. The Complete German Commission E Monographs. Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin: American Botanical Council, 1998 39p.
10. Cañigüeral S, Vila R, Wichtl M. Plantas Medicinales y Drogas vegetales. Milano: Editorial OEMF, 1999 196p.
11. Desmarchelier C, Witting F. Sesenta plantas medicinales de la Amazonía peruana, ecología, etnomedicina y bioactividad - Sixty medicinal plants from the Peruvian amazon, ecology, ethnomedicine and bioactivity (edición bilingüe) Perú: 2000. 270 p.
12. Gruenwald J, Brendler T, Janicke C, PDR for herbal medicines. 2^a edición, Montvale: Medical Economics Company 2000 1265p.
13. Lores J, Torriani H, Lamdan S, Farmacoquímica: síntesis, estructura y propiedades de medicamentos orgánicos. 6 ed Buenos Aires : Editorial Eudeba, 1996. 2 v 1589p.
14. Goodman L, Gilman A, Bases farmacológicas de la terapéutica 15 ed México : Hispanoamericana, 2001 2598p

15. Lastra JJ, Bachiller LI. Plantas medicinales en Asturias y la Cornisa Cantábrica. Gijón: Ediciones Trea, 1997, 291 p.
16. Litter M. Compendio de farmacología. 14a. ed Buenos Aires : Editorial El Ateneo, 1998. 932 p.
17. Varro E, Lynn R, James R, Farmacognosia. 12 ed Buenos Aires : Editorial El Ateneo, 1999. 459 p.
18. Penn G, Farmacología 13 ed Buenos Aires : Editorial Eudeba, 1996. 312 p.
19. Litter M. Farmacología: experimental y clínica 15a. ed Buenos Aires : Editorial El Ateneo, 1999. 1991 p.
20. García-Valdecasas F, Salvá J, Laporte J, Farmacología experimental y terapéutica general 15 ed. Barcelona : Editorial Salvat, 1999. 713 p.
21. Goodman A, Las bases farmacológicas de la terapéutica, Buenos Aires : Editorial Panamericana 1991 1751 p.
22. Gennaro A, Remington farmacia: I 17 ed. Buenos Aires : Editorial Panamericana, 1987 1367 p.
23. Gennaro A, Remington farmacia: II 17 ed. Buenos Aires : Editorial Panamericana, 1987 2723 p.
24. Rios M, Tamizaje fitoquímico preliminary del fruto, semilla y corteza de *Hylocereus undatus* (pitaya o pitahaya), Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación Facultad de Ingeniería) 2001. 36p
25. De la llana R, Tamizaje fitoquímico del Copalchi (*Croton reflexifolius HBK*), Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación Facultad de Ingeniería) 2001. 41p
26. Domínguez D, Tamizaje fitoquímico preliminary del fruto del *Capsicum chinense* (Chile habanero), Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación Facultad de Ingeniería) 2001. 53p
27. Rodríguez E, Horno de Paci N, Fundamentos farmacológicos: para el uso racional de medicamentos. 1a. ed. Mendoza : Argentina Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Médicas, 1994. 132p.
28. Santa Cruz L, Guía práctica de productos naturales y fitoquímica, 1ª edición Guatemala : Editorial Universitaria 1995. 100 p.

29. Sharapin N, Screening fitoquímico. Brazil: 1999 150p.
30. Tally W, Seminario taller mesoamericano, metabolitos de interés nutricional en plantas comestibles de la región, Guatemala, 26 al 30 de abril 1999, CONCYT, Universidad San Carlos de Guatemala.

ANEXOS 1

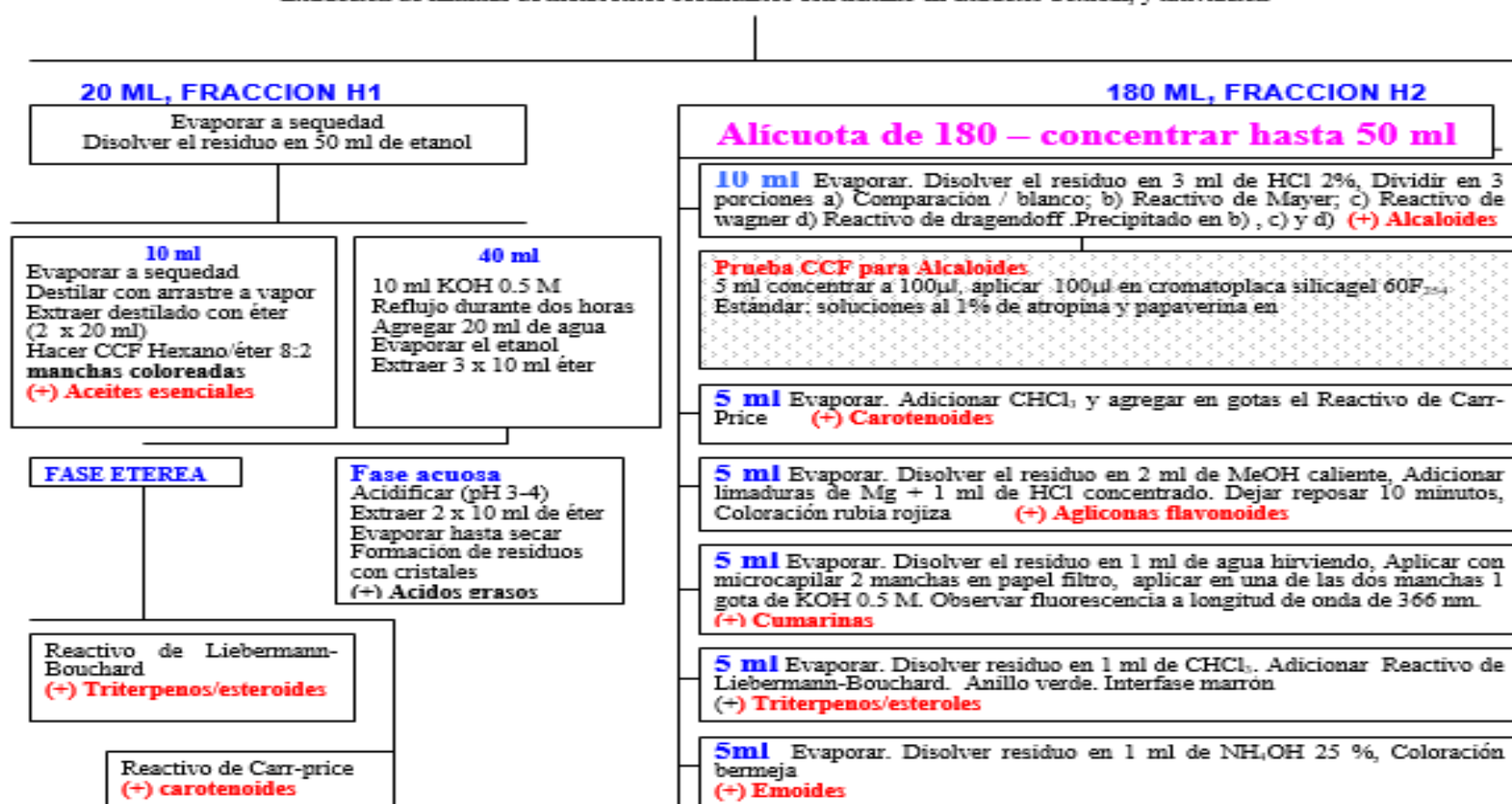
Tabla 3. Familias de metabolitos secundarios presentes en extractos de diferente naturaleza polar

 Extracto hexano	 Extracto alcohólico	 Extracto acuoso
• Aceites esenciales • Triterpenos • Esteroles • Carotenoides • Ácidos grasos • Alcaloides • Agliconas flavonoides • Cumarinas • Emoides	• Taninos gálicos • Taninos catéquicos • Taninos Rojos • Compuestos reductores • Alcaloides • Aminas cuaternarias • Antocianinas • Leucoantocianinas • Cumarinas • Antracenoides • Flavonoides • Chalconas • Esteroides • Triterpenos • Cardenolicos y bufadienolicos • Esteroles Insaturados • Lactonas insaturadas • Azucars 2-deoxigenadas • Antraquinonas • Principios amargos	• Polisacáridos • Amidas • Saponinas • Mucilagos • Taninos gálicos • Taninos catéquicos • Compuestos reductores • Alcaloides • Glucósidos cianogénicos

Procedimiento 1

Extracción de familias de metabolitos secundarios con hexano en extractor Soxhlet, y lixiviación

EXTRACTO HEXANO (200 ml)



Procedimiento 3

EXTRACTO ALCOHOLICO (300 ml)

Extracción de familias de metabolitos secundarios con metanol en extractor Soxhlet y lixiviación

DIVIDIR EN TRES ALICUOTAS DE 100 ML CADA UNA

Fracción A1 Concentrar hasta 40 ml

5 ml + 2 ml de agua caliente, enfriar
dividir en 4 tubos

- a) tubo 1 agregar 4-5 gotas de solución de gelatina al 1 % (p/v)
- b) tubo 2 agregar 4-5 gotas de solución gelatina-sal
- c) tubo 3 agregar 5 gotas de FeCl₃ al 1 %
- d) blanco

observar precipitados y cambios de color

Color azul (+) taninos gálicos
Color verde (+) Taninos catéquicos

5ml + 2ml de agua + 5 ml de reactivo de Fehling
Reflujo de 30 minutos

Precipitado color ladrillo

(+) Compuestos reductores

30 ml evaporar.

Disolver el residuo en 20 ml de HCl al 10 %

Retirar 3 ml para el test de alcaloides (precipitado)

Efectuar el test de alcaloides

Retirar 10 ml para el test de flavofenoles o Taninos Rojos.

Alcalinizar el restante de la fracción (7 ml) a pH 9.

Extraer 3 x 10 ml de éter

Evaporar la fracción etérea

Disolver el residuo en 3 ml de HCl al 10 %

Precipitado (+) Aminas cuaternarias

10 ml separado de la solución acidulada.

Calentar por 10 minutos

Coloración roja inmediata

(+) chalconas

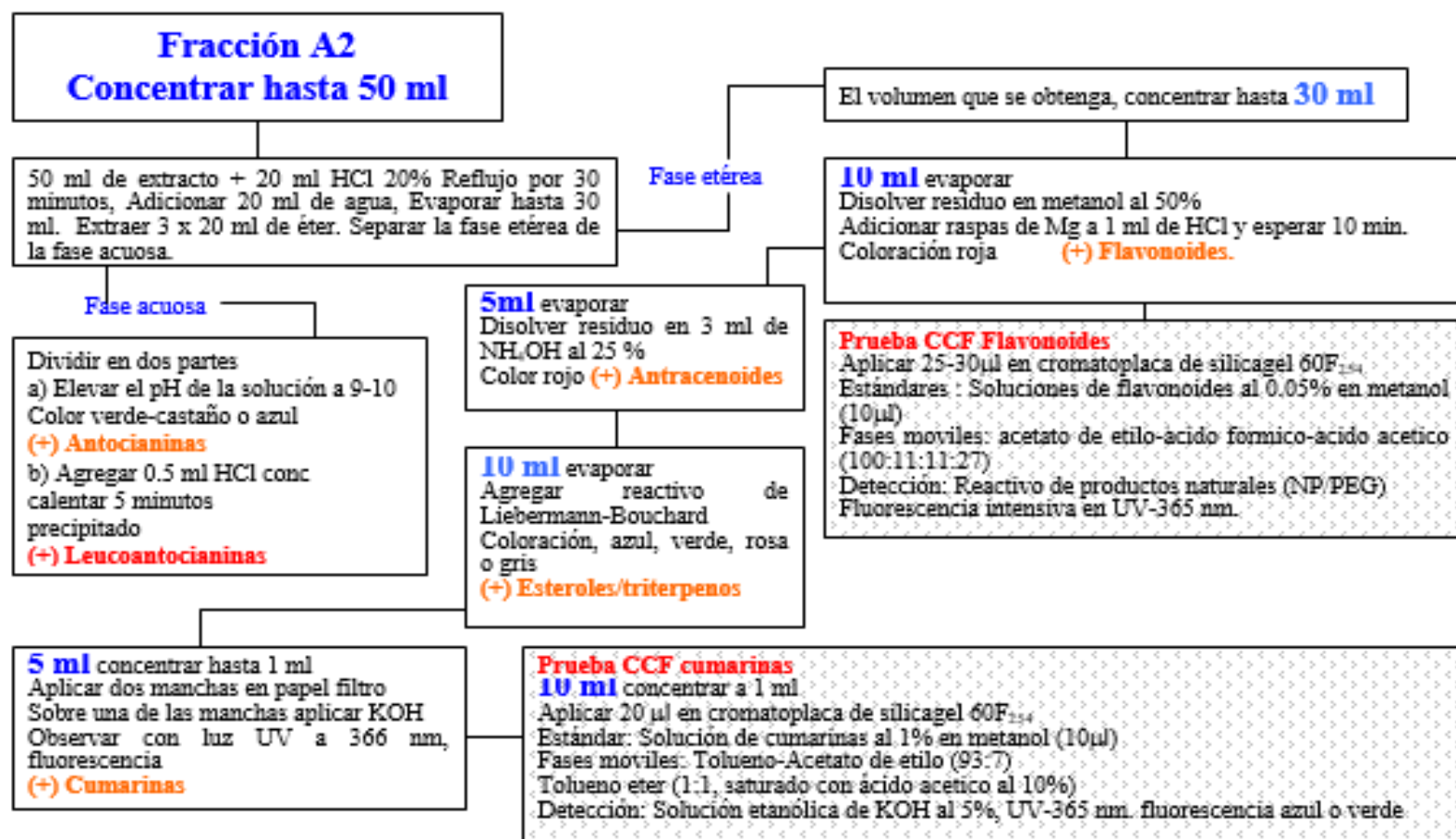
Formación de polímeros insolubles de color café-rojizo

(+) flavofenoles

Procedimiento 3a.

EXTRACTO ALCOHOLICO (300 ml)

DIVIDIR EN TRES ALICUOTAS DE 100 ML CADA UNA



Procedimiento 3b

EXTRACTO ALCOHOLICO (300 ml)

DIVIDIR EN TRES ALICUOTAS DE 100 ML CADA UNA

Fracción A3

30ml, evaporar

remover pigmentos con éter hasta que el éter salga incoloro

Agregar 10 ml de benceno y agitar durante unos minutos

Evaporar

Agregar 10 ml de cloroformo, filtrar con Na_2SO_4 , filtrar y dividir el filtrado en tres tubos:

- tubo 1 Agregar 3 gotas de Reactivo Liebermann-Bouchard
- tubo 2 Ensayo de anillo: agregar ácido sulfúrico concentrado (prueba de Salkowski)

Test de anillo: en presencia de esteroides insaturados, formación de un anillo rojo cereza en la interfase.

- tubo 3: blanco

Usar como estándar una solución de colesterol en cloroformo (0.1%)

Observar los cambios de colores inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un periodo de una hora.

(+) Esteroides insaturados

30 ml, concentrar hasta 5 ml

Colocar 3 manchas (0.1, 0.2, 0.3 ml) sobre un papel filtro

Secar y agregar unas gotas de reactivo de Kedde.

Secar papel filtro y observar cambio de color

Usar como estándar *Digitalis purpurea* en MeOH 80%

(mancha o anillo púrpura)

(+) Lactonas Insaturadas

10 ml evaporar

Eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo.

Secar el residuo y agregar 3 ml de reactivo Sétter-Killiani.

Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2 ml ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo.

Formación de anillo púrpura en la interfase.

(+) Azúcares 2-desoxigenados.

10 ml, concentrar a 2 ml

Aplicar 40 μl a cromatoplaaca silicagel 60F₂₅₄

Estándar: Solución de sustancia de referencia (pe. Artemisina) al 1% en metanol (20 μl)

Fases móviles: Acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8), cloroformo-metanol (95:5)

Detección: Vanilina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico

Zonas rojas-violetas, café-rojas, azules-verdes

Reactivo de Liebermann-Buchard: UV-365 nm, gris, café; VIS: café oscuro, gris

(+) Principios amargos

Prueba CCF para Antraquinonas

5ml calentar 5 minutos a 60°C, filtrar y agregar 10 μl a cromatoplaaca de silicagel 60F₂₅₄.

Estándar: Solución de antraquinonas al 0.1% en metanol (10 μl)

Fases móviles: Acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), (100:13.5:10)

Detección: Solución etanólica de KOH al 5 o 10%

Zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365nm

(+) Antraquinonas

Zonas Amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm

(+) Antronas y Antranolas

10 ml concentrar a 2 ml (Test de Borntrager)

Disolver el residuo en 30 ml de agua destilada, filtrar y extraer con 10 ml de benceno.

A la fase bencénica añadir 5 ml de solución de Test de amonio y agitar.

Observar cambio de color en la fase alcalina (rojo, rosado)

(+) Antraquinonas

(Test de Borntrager modificado)

0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de KOH alcoholico 0.5N y 1 ml de H_2O_2 al 3% durante 10 minutos en baño de maria a 60°C

Agregar 10 ml de benceno, agregar a la fase bencénica 2-5 ml de solución de test de amonio y agitar.

Cambio de color fase alcalina (rojo, rosado)

(+) Antraquinonas

Procedimiento 2

Extracción de familias de metabolitos secundarios con agua en extractor Soxhlet, y lixiviación

Extracto acuoso (200 ml)

5 ml + 3 ml de agua
Agregar 2 gotas de lugól
coloración azul
(+) **Amidas**

100 ml Fracción AC1

5 ml + 10 ml de acetona
Agregar 2 gotas de Hematoxilina
Agitar y filtrar
Precipitado violeta
(+) **Mucilagos**

5 ml + 1 ml de Solución Fehling
Dejar en reflujo 30 min
Precipitado color ladrillo
(+) **Compuestos reductores**

5 ml evaporar
Adicionar 5 gotas de H_2SO_4 concentrado
Agregar 3 a 4 gotas de timol
Coloración rojiza
(+) **Polisacáridos**

3 ml + 2 ml de agua
Adicionar 3 o 4 gotas de $FeCl_3$
Coloración azul (+) **Taninos gálicos**
coloración verde (+) **Taninos Catéquicos**

5 ml Alcalinizar con NH_4OH hasta pH 9
Extraer 3 X 30 ml de éter, luego evaporar hasta secar
Disolver residuo en 10 ml HCl a 10%
Ensayar con reactivos de alcaloides
Precipitado
(+) **Alcaloides**

5 ml + 45 ml de agua calentar a $60^\circ C$ ½ hora
Agitar durante 10 min.
Si se mantiene la espuma 30 min mayor a 3 cm
(+) **Saponinas**

Prueba CCF saponinas

10 ml, concentrar a 5 ml y aplicar 25-40 μl en cromatoplaça de silicagel 60F.
Estandar: Solución de saponinas al 0.1 % en metanol (10 μl)
Fases móviles: Cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40)
Detección: Reactivo de sangre.
Zonas hemolíticas blancas en fondo rojo
Reactivo de Liebermann-Bouchard: UV 365 nm o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides
Reactivo de Komarowsky: Zonas azules, amarillas y rojas
Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillas.
(-) **Saponinas**, ver pruebas caracterizadoras para saponinas

100 ml Fracción AC 2

Adicionar 20 ml de HCl y dejar en reflujo durante 30 min.
Agregar 20 ml de agua
Evaporar la mezcla hasta 30 ml y extraer 3 x 20 ml de éter.

Fase acuosa

Elevar el pH de la solución a 9-10
Coloración verde-castaño o azul
(+) **Antocianinas**

Fase Etérea

60 ml concentrar a 30 ml

5 ml evaporar
Disolver residuo en 3 ml de NH_4OH al 25 %
Coloración roja
(+) **Antracenoides**

5 ml concentrar a 1 ml
Aplicar dos manchas en papel filtro
Sobre una de las manchas aplicar KOH
Observar con luz UV a 366 nm, fluorescencia
(+) **Cumarinas**

10 ml evaporar
Disolver residuo en metanol al 50 %
Adicionar raspas de Mg a 1 ml de HCl y esperar 10 min.
Coloración roja
(+) **Flavonoides**

10 ml evaporar
Agregar reactivo de Liebermann-Bouchard
Coloración azul, verde, rosa o grisáceo
(+) **Esteroles/Triterpenos**

Procedimiento 5

Glucosidos cianogenicos (<i>prueba de Guinard</i>)	Aceites volátiles
Pesar 2-5 g de material vegetal pulverizado en un erlenmeyer de 125 ml, humedecerlo con agua y agregar 1 ml de cloroformo. Introducir un tira de papel filtro Whatman No 1. en picrato de sodio recién preparado, y secar Insertar la tira en el erlenmeyer conteniendo el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar el papel a una distancia de 1 cm de la muestra. Doblar el papel y tapar el recipiente con un corcho Calentar en baño de maría (37°C) durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo-café). (+) Glucidos cianogenicos	Métodos cromatográficos CCF Método A Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 ml de diclorometano agitando por 15 minutos. Filtrar y evaporar en baño de maría (60°C a sequedad. Disolver en 1 ml de tolueno y aplicar 20-50 µl en cromatopla de silicagel 60F₂₅₄ Método B Pesar 10-50 g (dependiendo del tipo de droga) de material vegetal y destilar con arrastre de vapor por 1 hora. Recolectar el aceite esencial en xileno. Diluir la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es un concentrado 1:10 y aplicar 5 µl (1:10) en cromatopla de silicagel 60F₂₅₄ Estándar: Solución en tolueno 1:3 0 de mentol (alcohol), timol(fenol), anisaldehido (aldehido), acetol (fenilpropano), 1,8-cineol(oxido) (3µl) Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7) Detección: anisaldehido-ácido sulfúrico, vanillina-ácido sulfúrico Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible (+) Aceites volátiles.

Procedimiento 4

DIFERENCIACIÓN DE SUSTANCIAS POLICÍCLICAS PRESENTES EN SAPONINAS Y AUSENCIA DE ELLAS.

Test de hemólisis	Test de espuma	Lieberman-Buchard	Sustancias presentes
+	+	+ azul o verde	Saponinas probablemente esteroidales
+	+	+ rojo, rosado-púrpura o violeta	Saponinas probablemente triterpenoides
+	+	- amarillo pálido	Saponinas posiblemente heterósidos de esteroides saturados o triterpenos saturados
+/-	-	+ rosado, púrpura o violeta	Saponinas ausentes, triterpenos libres, diterpenos, esteroides o sustancias policíclicas relacionados presentes
-	-	- amarillo pálido	Saponinas, triterpenos y esteroides insaturados ausentes. Puede haber presencia de esteroides o triterpenos saturados
-	+	+/-	Saponinas ausentes, probablemente ácidos diterpenicos libres

CUADRO 2. Requerimientos de materiales y equipo para elaborar la determinación de metabolitos secundarios en una extracción con hexáno

CRISTALERIA		SOLVENTES		OTROS	
No	Material	Vol	Solvente	Cant.	Material
2	Beacker de 250 ml	50 ml	Etanol	1	Gradilla
3	Beacker de 100 ml	60 ml	Eter	1	Equipo de arrastre de vapor
3	Beacker de 50 ml	35 ml	Hexano	1	Plancha de calentamiento
1	Beacker de 10 ml	7 ml	Cloroformo	1	Vortex
2	Beacker de 5 ml	5 ml	Metanol	1	Baño de Maria
2	Tubos de ensayo de 20 ml	70 ml	Tolueno		
12	Tubos de ensayo de 10 ml	10 ml	n-butanol		
5	Pipetas de 1 ml	REACTIVOS		1	Par de pinzas para tubos de ensayo
5	Pipetas de 2 ml	Cant.	Reactivo	1	Par de pinzas para crisol
5	Pipetas de 3 ml	10 ml	HCl 2%	1	Macropipeteador
5	Pipetas de 5 ml	5 ml	HCl concentrado	1	Cronometro
5	Pipetas de 10 ml	12 ml	KOH 0.5 M	1	Pizeta con agua destilada 300 ml
1	Contenedor de cromatoplaacas	1 ml	NH4OH 25%	1	Bote de capilares
3	Ampollas de decantacion 100 ml	1 gotero	Reactivo de Carr-Price	1	Mechero
		1 gotero	Reactivo Liebermann-Bouchard		Papel filtro, papel pH
	Estandares	1 gotero	Reactivo de Wagner	1	Cromatoplaca para CCF Silicagel 60 F ₂₅₄
	Atropina	Raspas	Magnesio metalico	1	Lampara UV 366 nm
	Papaverina	1 gotero	Reactivo de Mayer		Papel parafilm
		25 ml	Acido acetico		Masking Tape o crayon graso
		10 ml	Diethylamina		
		1 gotero	Reactivo dragendorff		
Precaucion, Utilice equipo de protección adecuado, guantes, lentes y bata de manga larga. Tenga un extinguidor cerca.					

CUADRO 3. Requerimientos de materiales y equipo para elaborar la determinación de metabolitos secundarios en una extracción con metanol

CRISTALERIA		SOLVENTES		OTROS
No	Material	Vol	Solvente	Material
1	Beacker de 250 ml	50 ml	Eter	1 Gradilla
2	Beacker de 100 ml	5 ml	Metanol 50 %	1 NaSO ₄ , desecador
1	Beacker de 150 ml	94 ml	Tolueno	1 Plancha de calentamiento
3	Beacker de 20 ml	100 ml	Eter	1 Vortex
2	Beacker de 5 ml	10 ml	Cloroformo	1 Baño de Maria
		25 ml	Eter de petróleo	
		10 ml	Benceno	
2	Tubos de ensayo de 20 ml		REACTIVOS	1 Par de pinzas para tubos de ensayo
12	Tubos de ensayo de 10 ml	Cant.	Reactivo	1 Par de pinzas para crisol
3	Pipetas de 1 ml	3ml	HCl 2%	1 Macropipeteador
3	Pipetas de 2 ml	20 ml	HCl 20%	1 Cronometro
3	Pipetas de 3 ml	30 ml	HCl 10 %	1 Pizeta con agua destilada 300 ml
3	Pipetas de 5 ml	30 ml	NH ₄ OH 25%	1 Bote de capilares
3	Pipetas de 10 ml	2 ml	KOH 0.5 M	1 Mechero
2	Ampollas de decantación 100 ml	1 gotero	Reactivo Mayer	1 Papel filtro, papel pH
		1 gotero	Reactivo de Wagner	1 Papel parafilm
	Estandares	1 gotero	Reactivo de Dragendorff	1 Cromatoplaca Silicagel 60F ₂₅₄
	Flavonoides al 0.05% en metanol	Raspas	Magnesio metalico	1 Lámpara UV 366 nm
	Coumarinas al 1% en metanol	1 gotero	Reactivo de Fehling	1 Masking Tape o crayon graso
	Coolesterol en cloroformo 0.1%	1 gotero	FeCl ₃ 1%	
	<i>Digitalis Purpurea</i> en MeOH	1 gotero	Solución gelatina a 1% (p/V)	
	Antraquinonas al 0.1% en MeOH	1 gotero	Solución gelatina-sal	
		207 ml	Acetato de etilo	
		11 ml	Acido formico	
		11 ml	Acido Acetico	
		1 gotero	Reactivo de productos naturales (NP/PEG)	
		1 gotero	Solución KOH etanolica al 5%	
		1 gotero	Reactivo de Liebermann-Bouchard	
		25 ml	Acido sulfurico concentrado	
		1 gotero	Reactivo de kedde	
		1 gotero	Reactivo de Seller-Killiani	
		1 gotero	Test de amonio	
Precaución, Utilice equipo de protección adecuado, guantes, lentes y bata de manga larga. Tenga un extinguidor cerca.				

CUADRO 4. Requerimientos de materiales y equipo para elaborar la determinación de metabolitos secundarios en una extracción con agua

CRISTALERIA		SOLVENTES		OTROS	
No	Material	Vol	Solvente	Cant.	Material
1	Beacker de 250 ml	20 ml	Acetona	1	Gradilla
1	Beacker de 100 ml	150ml	Eter	1	
2	Beacker de 50 ml	10 ml	Metanol 50 %	1	Plancha de calentamiento
1	Beacker de 10 ml	64 ml	Cloroformo	1	Vortex
1	Beacker de 5 ml	50 ml	Metanol	1	Baño de Maria
		50 ml	n-butanol		
		10 ml	Acido acético		
2	Tubos de ensayo de 20 ml	REACTIVOS		1	Par de pinzas para tubos de ensayo
7	Tubos de ensayo de 10 ml	Cant.	Reactivo	1	Par de pinzas para crisol
5	Pipetas de 1 ml	12 ml	HCl 10%	1	Macropipeteador
5	Pipetas de 2 ml	10 ml	H2SO4 concentrado	1	Cronometro
5	Pipetas de 3 ml	5 ml	KOH 0.5 M	1	Pizeta con agua destilada 300 ml
5	Pipetas de 5 ml	10 ml	NH4OH 25%	1	Bote de capilares
5	Pipetas de 10 ml	1 gotero	Lugól	1	Mechero
1	Quitazato	1 gotero	Reactivo Liebermann-Bouchard		Papel filtro, papel pH
1	Ampollas de decantación 100 ml	1 gotero	Reactivo de Wagner		Papel parafilm
		1 gotero	Reactivo de Dragendorff		
1	Embudo	Raspas	Magnesio metalico	1	Lámpara UV 366 nm
		1 gotero	Reactivo de Meyer	1	Manguera para vacío
	Estándares	1 gotero	Hematoxilina		Bomba de vacío
	Solución saponinas 0.1 % en metanol	1 gotero	Timol		Masking Tape o crayo graso
		1 gotero	Reactivo de sangre		
		1 gotero	Reactivo de Komarowsky		
			Vainillina		
			anisaldehido		
Precaución, Utilice equipo de protección adecuado, guantes, lentes y bata de manga larga. Tenga un extinguidor cerca.					

CUADRO 5. Requerimientos de materiales y equipo para elaborar la determinación de metabolitos secundarios en extractos de hexano, metanol y agua

CRISTALERÍA		SOLVENTES		OTROS	
No	Material	Vol.	Solvente	Cant.	Material
4	Beacker de 250 ml	50 ml	Etanol	1	Gradilla
6	Beacker de 100 ml	260ml	Éter	1	Equipo de arrastre de vapor
1	Beacker de 150 ml	35 ml	Hexano	1	Plancha de calentamiento
2	Beacker de 50 ml	15 ml	Metanol 50 %		Pepel parafilm
2	Beacker de 10 ml	7 ml	Cloroformo	1	Vortex
5	Beacker de 20 ml	20 ml	Acetona		Bomba de vacio
5	Beacker de 5 ml	2 ml	Metanol	1	Baño de Maria
		70 ml	Tolueno		
		10 ml	n-butanol		
6	Tubos de ensayo de 20 ml	REACTIVOS		1	Par de pinzas para tubos de ensayo
29	Tubos de ensayo de 10 ml	Cant.	Reactivo	1	Par de pinzas para crisol
15	Pipetas de 1 ml	25 ml	HCl 2%	1	Macropipéador
15	Pipetas de 2 ml	5 ml	HCl concentrado	1	Cronometro
15	Pipetas de 3 ml	42 ml	HCl 20 %	1	Pizeta con agua destilada 300 ml
15	Pipetas de 5 ml	20 ml	HCl 10 %	1	Bote de capilares
15	Pipetas de 10 ml	20 ml	KOH 0.5 M	1	Mechero
1	Contenedor de cromatoplasas	41 ml	NH ₄ OH 25%		Papel filtro
6	Ampollas de decantación 100 ml	1 gotero	Lugól	1	Cromatoplasa para TLC
1	Embudo	1 gotero	Reactivo de Fehling	1	Lámpara UV 366 nm
		1 gotero	FeCl ₃ 1 %		Masking Tape o crayon graso
	Estándares	1 gotero	FeCl ₃ 10%		
	Atropina	1 gotero	Reactivo de Carr-Price		Papel pH
	Papaverina	1 gotero	Reactivo Liebermann-Bouchard		
		1 gotero	Ac Silico Tungstico		
		Raspas	Magnesio metalico		
		1 gotero	Reactivo de Mayer		
		1 gotero	Hematoxilina		
		1 gotero	Timol		
		1 gotero	Reactivo de anisaldehido-ácido sulfúrico		
		1 gotero	Reactivo Dragendorff		
		1 gotero	Reactivo de Kedde		
		1 gotero	Reactivo de Séller-Killiani		
		1 gotero	Reactivo KOH		
		1 gotero	Reactivo de Wagner		
		1 gotero	Reactivo de Komarowsky		
		1 gotero	Reactivo de productos Naturales		
		1 gotero	Reactivo de sangre		
		1 gotero	Picrato de sodio		
		1 gotero	Test de Amonio		
		1 gotero	Vainillina-ácido sulfúrico		
		1 gotero	Solución gelatina/gelatina-sal		
Precaución, Utilice equipo de protección adecuado, guantes, lentes y bata de manga larga. Tenga un extinguidor cerca.					

ANEXOS RELATIVOS

PREPARACION DE REACTIVOS

Lieberman-Bouchard

- Se mezclan 5 ml de anhídrido acético.
- 5 ml de cloroformo.
- Enfriar a 0°C.
- Agregar 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico.
- El reactivo es estable durante 1 día (28, 29).

Reactivo de Mayer

- Disolver 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua.
- Disolver 5 g de KI en 20 ml de agua.
- Mezclar las dos soluciones.
- Aforar a 100 ml.
- El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos.
- La solución no debe de contener ácido acético o etanol porque disuelven el precipitado.
- Solo debe de agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo (28, 29).

Reactivo de Carr-Price

- Solución saturada de tricloruro de antimonio en cloroformo (28, 29).

Reactivo de Fehling

- Solución A
Disolver 6.93 g de sulfato cúprico en agua y completar a volumen con 250 ml de agua (28, 29).
- Solución B
Disolver 34.6 g de bitartrato de sodio y potasio y 62.5 g de KOH en agua y completar el volumen a 250 con agua.
- Mezclar volúmenes iguales al momento de utilizar (28, 29).

Reactivo de Bouchard

- 2 g de yodo
- 4 g de yoduro de potasio
- Aforar a 100 ml (28, 29).

Reactivo de Dradendoff

- Solución A
0.85 g de nitrato básico de bismuto, diluido en 10 ml de ácido acético glacial.
- Solución B
8g de KI en agua
- Mezclar 25 ml de solución A y 25 ml de solución B en 100 ml de ácido acético glacial, aforar a 500 ml con agua, es estable en un recipiente oscuro y refrigerado durante 6 meses (28, 29).

Reactivo de Kedde

- 5ml de solución etanólica de ácido 3,5-dinitrobenzoico al 3% preparado recientemente.
- 5ml de NaOH 2 M.
- Mezclar al momento de utilizar (28, 29).

Reactivo de Komarowsky

- 1ml de ácido sulfúrico etanolico al 50%.
- 10 ml de 4-hidroxibenzaldehido en metanol al 2%
- Mezclar antes de usar (28, 29).

Reactivo Séller-Killiani

- 0.3 ml de FeCl_3 al 10%
- 50 ml de ácido acético glacial
- Mezclar antes de usar (28, 29).

Reactivo de KOH

Solución etanólica de KOH del 5-10% (28, 29).

Reactivo sangre/Agar sangre

- 10 ml de agar/agar disuelto según especificaciones de fabricante
- 1 ml de sangre de carnero/o Hb comercial en relación especificada por el fabricante
- Mezclar cuando el agar se encuentre a 37°C
- Se puede usar agar sangre comercial (28, 29).

Reactivo de Productos naturales

- Asperjar la cromatoplaca primero con difenil-boril-oxietilamina al 1% en metanol y luego con polietilenglicol-4000 al 5% en etanol.
El polietilenglicol incrementa la sensibilidad desde 10 hasta 2.5 microgramos (28, 29).

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

Decano

Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona

Secretaria

Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo

Vocal I

Lic. Juan Francisco Pérez Sabino

Vocal II

Dr. Federico Adolfo Richter Martínez

Vocal III

Br. Carlos Enrique Serrano

Vocal IV

Br. Claudia Lucía Roca Berreondo

Vocal V

Bch. Ivo Mahelly Santizo Rodas
TESISTA

Licda. Alba Marina Valdés de García
ASESORA

Ing. César García
ASESOR

Licda. Alba Marina Valdés de García
DIRECTORA

Lic. Gerardo Arroyo
DECANO