



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN (DIGI)
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS (IIQB)



**DETERMINACIÓN FITOQUÍMICA Y DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE CULTIVARES
DE *Solanum americanum* Miller Y CARACTERIZACIÓN DE PREPARACIONES PARA LA
INDUSTRIA FITOFARMACÉUTICA**

Informe Final

Coordinador:

Lic. Armando Cáceres Estrada

Investigadores

Ing. Agr. Vicente Martínez

Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto

M.A. Ana Margarita Paz de Ramírez

Ing. Agr. Mario Esteban Véliz

Dra. Amarillis Saravia Gómez

Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández

Licda. Sully M. Cruz

Auxiliares de investigación II

Gaudi Haydeé Ortiz Beteta

Claudia Mariela Teleguario Sicaján

Miguel Angel Chigüichón

Guatemala Febrero – Noviembre 2006.

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	5
3. Antecedentes	7
4. Justificación	9
5. Objetivos	10
6. Metodología	11
7. Resultados	26
8. Discusión de resultados	51
9. Conclusiones	55
10. Recomendaciones	57
11. Bibliografía	58

1. RESUMEN

El macuy (*Solanum nigrescens*) es una especie ampliamente distribuida en Guatemala, se utiliza popularmente por la población rural como alimento y para el tratamiento de infecciones fúngicas; muchas veces se utiliza en forma indistinta con la especie de *S. americanum*.

El presente estudio pretendió evaluar el desarrollo agronómico, las características fitoquímicas y la actividad antifúngica de cinco colectas de *S. americanum* y una colecta de *S. nigrescens*, para compararlos con cultivares desarrollados en los campos de la Facultad de Agronomía y desarrollar preparados fitofarmacéuticos que garanticen la disponibilidad de una droga vegetal de calidad farmacéutica, que tenga suficiente material homogéneo para una fase piloto industrial, permita generar un producto estandarizado para ser ensayado clínicamente y conocer los parámetros para su producción artesanal o industrial.

Las especies de *S. americanum* fueron colectadas en Nueva Santa Rosa (Santa Rosa), San Miguel Panán (Suchitepéquez), Poptún-San José (Petén), Jícara (El Progreso) y Uspantán (El Quiché) y la de *S. nigrescens* en San Pedro Sacatepéquez (San Marcos). Los lugares de colecta son bosques húmedos subtropicales con excepción del Jícara el cual seco. Las características físicas de las plantas colectadas fueron muy similares entre si, siendo únicamente la cantidad de semillas la que varía en cada una de las colectas. El mayor porcentaje de germinación durante tres meses de las especies lo obtuvo la colecta 1.

De los extractos obtenidos la colecta cuatro presentó el mayor porcentaje de rendimiento. Los extractos tanto de *S. americanum* como el de *S. nigrescens* no presentaron actividad contra las bacterias ensayadas, sin embargo todas presentaron actividad contra *C. albicans* y contra *C. neoformans* (a excepción de la colecta cuatro). El extracto de la colecta uno es el extracto con mejor actividad contra *C. albicans* y *C. neoformans*. De los hongos miceliares, los extractos de las seis colectas presentaron actividad únicamente contra *T. mentagrophytes* y *S. schenckii* excepto la colecta dos que fue positiva únicamente para este último hongo y la colecta con mejor actividad fue la colecta cuatro. Los ensayos de complemento demostraron actividad en la colecta 3 y los de linfoproliferación tienen actividad estimuladora la colectas 1 e inhibitoria las colectas 3, 5 y 6. Los extractos de las seis colectas no presentaron actividad citotóxica importante contra los nauplios de *Artemia salina*, ni toxicidad *in vivo* en la dosis letal media (DL₅₀).

Los resultados de sólidos extraíbles, porcentaje de humedad y cenizas totales de las seis colectas, obtenidos fueron similares para todas las colectas, con excepción de los sólidos extraíbles. El tamizaje fitoquímico de los extractos demostró la presencia de alcaloides y saponinas en las muestras. No fue posible cuantificar los alcaloides, ya que los resultados no fueron reproducibles.

De acuerdo a los resultados de porcentaje de germinación y de la actividad antifúngica contra hongos miceliares y levaduriformes es la colecta 1 procedente de Nueva Santa Rosa, Santa Rosa la colecta que presentó mejores resultados, a pesar de que el rendimiento del extracto obtenido a partir del material vegetal no es el más alto, sin embargo no se considera un mal rendimiento. Esta colecta no presentó actividad interesante en los ensayos lifoproliferativos y de complemento. Los resultados de toxicidad *in vitro* e *in vivo* demostraron que no presenta toxicidad y por tanto se puede obtener preparados seguros para su uso en la industria fitofarmacéutica.

2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones micóticas son importantes causas de morbilidad en las poblaciones rurales del país, siendo sus tratamientos generalmente de alto costo, largo tiempo de administración y presentan cierta toxicidad, además las infecciones fúngicas generalmente son de curso crónico, siendo muchas veces el sistema inmunológico del mismo paciente el que complica su cuadro clínico.

La diversidad florística de Guatemala ha motivado a realizar estudios de detección y validación de plantas de uso medicinal con el objetivo de proponer alternativas de bajo costo, mayor disponibilidad y mejor índice terapéutico, que permita ampliar la cobertura de atención por los sistemas de salud. Desde 1978 investigadores de la Facultad de CCQQ y Farmacia en colaboración con el Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología Apropiada (CEMAT) y posteriormente el Laboratorio el Laboratorio de Productos Naturales Farmaya, S.A. realizan encuestas etnobotánicas para conocer la flora de uso medicinal en Guatemala, validar sus propiedades atribuidas e identificar las moléculas que explican su actividad.

Después de analizar más de 100 especies nativas y de realizar ensayos antimicrobianos, se seleccionó como una de las más promisorias al Macuy (*Solanum nigrescens* Mart. & Gal.), por ser usado como alimento, lo que indica cierta seguridad, y por haberse validado el uso tradicional en el tratamiento de infecciones fúngicas, estableciéndose las moléculas responsables de la actividad y realizando ensayos clínicos preliminares; pero, al tratar de reproducir los experimentos y de escalar en su producción a nivel piloto se encontró que era una especie variable y poco frecuente en el país.

Solanum americanum Mill. es una especie abundante en el país, presenta actividad similar y se usa indistintamente por la población, pero aparentemente existen cultivares diferentes en su composición química lo que se manifiesta con variabilidad en su bioactividad. Durante la presente investigación se pretendió proponer el cultivar que tuviera mejor composición y mayor bioactividad, se tomaron muestras de cinco de los cultivares predominantes en el país provenientes de diferentes zonas ecológicas (Nueva Santa Rosa, Santa Rosa; San Miguel Panán, Suchitepéquez; Poptún - San José, Petén; Jícaro, El Progreso y Uspantán, Quiché) y una colecta de *S. nigrescens* (San Pedro Sacatepéquez, San Marcos); se determinó su rendimiento en sólidos totales, a la extracción etanólica, su contenido de saponinas y alcaloides como familias químicas de interés, determinación de la dosis letal media (DL₅₀) y su actividad contra hongos patógenos (levaduriformes y miceliares).

Los resultados del proyecto permitieron por un lado seleccionar el cultivar que tuvo mejor desarrollo agronómico y poderlo proponer para investigar y comparar con los especímenes colectados su composición química, actividad contra hongos patógenos y su actividad a nivel

inmunológico para iniciar actividades de cultivo y postcosecha que garanticen la disponibilidad de una droga vegetal de calidad farmacéutica, que tenga suficiente material homogéneo para una fase piloto industrial, permita generar un producto estandarizado para ser ensayado clínicamente y conocer los parámetros para su producción artesanal o industrial.

3. ANTECEDENTES

Desde 1978 se realizan en Guatemala encuestas etnobotánicas para conocer la flora de uso medicinal por la población, en el caso particular de ésta investigación, aquellas especies usadas para tratar diversas afecciones de la piel y mucosas, encontrándose que más de 100 especies son usadas para estos fines por los grupos del Altiplano (Cáceres *et al.*, 1978). Estudios posteriores en el caribe nacional (Giron *et al.*, 1991) y otras regiones del país amplían el número de especies usadas en estas afecciones.

Con el objetivo de validar el uso tradicional de las especies detectadas, como un primer paso se establecieron procedimientos para evaluar la actividad contra bacterias patógenas y contra *Candida albicans* usándose únicamente un método de difusión en agar (Bauer *et al.*, 1966) y luego una modificación del método de difusión por siembra en estrías (Micher *et al.*, 1972), encontrándose de 89 especies ocho (8.9%) tiene una actividad preliminar interesante (Cáceres *et al.*, 1987). Las ocho especies fueron evaluadas por pruebas *in vitro*, sobresaliendo como las especies nativas con mayor actividad *Smilax lundellii* y *S. nigrescens*. Con extractos de *S. nigrescens* se realizaron ensayos *in vivo* y clínicos que demostraron falta de toxicidad y una buena actividad en el tratamiento de vaginitis por *C. albicans* (Girón *et al.*, 1988) y posteriormente en colaboración con la universidad de Washington se determinó que la actividad antifúngica es producida por un glicócido de spirostanol, la cantalosaponina 3 (He *et al.*, 1994).

Como un segundo paso para conocer la actividad antifúngica de las especies de uso medicinal, se establecieron procedimientos para evaluar la actividad en medios líquidos contra dermatofitos, encontrándose que de 40 especies ensayadas 22 tenían alguna actividad sobresaliendo en ésta oportunidad la actividad antifúngica de *S. nigrescens* y *S. americanum*, que fueron activas contra la mayoría de los dermatofitos ensayados (Cáceres *et al.*, 1991) en vista de una distribución restringida de *S. nigrescens* a ciertas partes del Altiplano de la distribución de *S. americanum* en casi todo el país y resultados antifúngicos similares, en los últimos años los estudios se han concentrado en la segunda especie. Posteriormente se establecieron procedimientos de dilución en medios sólidos (Modificación del método de Brancato & Golding, 1983) donde se confirmó la actividad contra los hongos levaduriformes (*Cryptococcus neoformans*) y dermatofitos así como se demostró actividad contra protozoos (*Trypanosoma cruzi*) y nauplios de *Artemia salina* (Cáceres *et al.*, 1998).

En estudios posteriores se ha tenido dificultad en tener una reproducibilidad lote a lote medida por la concentración inhibitoria mínima (CIM) por lo que pareciera que existen variaciones interespecíficas y fenológicas que discutan la estatización de la droga vegetal y por ende una preparación fitofarmacéutica confiable. Complementariamente a la generación de datos de laboratorio, este proyecto pretende mantener el banco de germoplasma (semillas) y la colección *ex situ* de los cultivares colectados, que

permitirán continuar con los estudios agrotecnológicos de los cultivares más premisorios de esta investigación.

Par conocer mejor el problema de la falta de reproducibilidad y estandarización, en los últimos tres años el equipo participante ha desarrollado investigaciones pendientes en diseñar una metodología que permita revisar sistemáticamente los parámetros necesarios para estandarizar la droga vegetal y sus productos derivados. De esa suerte se están realizando tres trabajos de tesis de la Escuela de Química Farmacéutica y dos en el Escuela de Ingeniería química que han permitido estandarizar una metodología adecuada, la cual se aplicará en esta investigación al caso de *S. americanum*. Estos procedimientos aunados a otros estandarizados en proyectos regionales (Solís *et al.*, 2005) incluyen metodologías analíticas para la droga vegetal (porcentaje de humedad, cenizas, pH, sólidos extraíbles, carga microbiana) y su aplicación a las tinturas y extractos obtenibles.

Azurdiá *et al.* (1987), indican que de los trabajos de germinación realizados se ha establecido que algunos cultivares no germinan inmediatamente después de la cosecha, de tal forma que tratamientos con nitrato de potasio al 0.2% parecen romper la latencia. Por otra parte en otros ensayos de los mismos autores se encontró que el porcentaje de germinación mejora después del almacenamiento de la semilla en envases de vidrio por seis meses.

La información generada hasta la fecha es útil para devolverla a la comunidad como la validación preliminar de una actividad tradicionalmente atribuida, pero es necesario ahora complementar sus estudios preclínicos (toxicidad aguda DL_{50}) y estudios y farmacognósticos y de tecnología fitofarmacéuticas que permitan conocer las características de la especie como una droga vegetal, así como de las tinturas y extractos que es posible obtener para generar productos fitofarmacéuticos que podrán elaborarse artesanal o industrialmente pero en forma estandarizada, eficaz, segura y con las normas de calidad que requiere este tipo de producto.

4. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones micóticas son importantes causas de morbilidad en las poblaciones rurales del país siendo sus tratamientos generalmente de alto costo, largo tiempo de administración y presenta toxicidad. Basados en la diversidad florística y cultural de Guatemala se han realizado estudios de detección y validación de plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de afecciones de la piel por hongos y levaduras. Con los datos preliminares se han escogido especies para realizar estudios complementarios que documenten los datos preclínicos para posterior uso humano.

De las especies con mayor actividad se han escogido al Macuy o Hierba mora representado por dos especies *S. nigrescens* (Anexo 1), del que se tiene bastante información pero es poco frecuente en el país (Altiplano), y *S. americanum* que aunque no se tiene toda la información disponible, es más fácil obtenerla para conocer la viabilidad para desarrollo agrotecnológico por ser más abundante en el país.

El proyecto generó la información necesaria que permitió escoger que cultivar de *S. americanum* tiene los mejores rendimientos agronómicos, químicos y de bioactividad así como las características de calidad que deben tener sus preparaciones fitofarmacéuticas. Estos datos podrán servir en un futuro para establecer los cultivares más adecuados para llevarlos a cultivo experimental con lo que se generará una droga vegetal estándar para la preparación de los extractos con mejores características en una escala piloto que puedan luego ser aplicados en la fabricación artesanal o industrial de productos fitofarmacéuticos.

Los resultados obtenidos permitirán proponer terapias alternativas de bajo costo, mayor disponibilidad, producidas con insumos localmente obtenidos y posiblemente con un mejor índice terapéutico que permita ampliar la disponibilidad de medicamentos en el área rural. Validando y aprovechando los recursos naturales se pueden contribuir a su conservación, disminuir la dependencia de insumos importados y aumentar la disponibilidad y accesibilidad de medicamentos para el tratamiento de enfermedades comunes en la atención primaria de salud.

5. OBJETIVOS

5.1 Generales

5.1.1 Generar la información necesaria para seleccionar los cultivares de *S. americanum* con mejor actividad antifúngica, mayor contenido de saponinas y menor toxicidad.

5.1.2 Caracterizar las tinturas y extractos de *S. americanum* para escoger el mejor cultivar desde el punto de vista fitofarmacéutico y generar su ficha de control de calidad para producción artesanal o industrial.

5.2 Específicos

5.2.1 Colectar, caracterizar *in situ* y procesar como de materia médica vegetal especímenes de cinco cultivares de *S. americanum* representativos de regiones del país y uno de *S. nigrescens*.

5.2.2 Establecer de una colección de campo y un banco de semillas de los cultivares de *S. americanum* recolectados.

5.2.3 Determinar el porcentaje de humedad, cenizas, rendimientos de sólidos extraíbles con etanol al 50% y carga microbiana de todos los cultivares para caracterización como droga vegetal.

5.2.4 Determinar la CIM de los extractos obtenidos contra levaduras (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) y hongos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton rubrum*).

5.2.5 Determinar la toxicidad aguda (DL₅₀) del cultivar que tenga mejores indicadores de actividad y composición.

5.2.6 Medir los sólidos totales, densidad y viscosidad de las tinturas (1:5 y 1:10) y extractos (fluido, blando, duro y seco) obtenidos del cultivar con mejor rendimiento.

5.2.7 Preparar una ficha de calidad como droga vegetal que incluya la descripción botánica y microscópica, los resultados de las pruebas fisicoquímicas y de bioactividad, y un resumen de la revisión de literatura internacional.

5.2.8 Coordinar esfuerzos con otras instituciones nacionales o internacionales para completar la información agronómica, farmacológica y química sobre esta especie.

5.2.9 Publicar los resultados como una monografía o artículo científico a nivel nacional.

6. METODOLOGÍA

6.1 Especies vegetales (diseño delimitación del universo, población a estudiar y muestra)

6.1.1 Universo de trabajo

La especie inicialmente seleccionada (*S. nigrescens*) por su actividad antifúngica y posibilidades de desarrollo industrial se escogió por ser anual y de cultivo relativamente fácil, pero por tener una distribución restringida en el país se dificultó su desarrollo agrotecnológico. Por tal motivo se iniciaron estudios con una especie similar (*S. americanum*), que es más abundante en el país y que se usa indistintamente con *S. nigrescens*, pero aparentemente existen cultivares que son diferentes en su composición química y por ende en su bioactividad.

6.1.2 Población

Con el fin de proponer el cultivar que tenga mejor composición química y mayor bioactividad se tomaron muestras de seis cultivares predominantes en el país y provenientes de diferentes zonas ecológicas, se determinó su rendimiento en sólidos totales a la extracción etanólica, su contenido de saponinas como familia química de interés y su actividad *in vitro* contra hongos patógenos (levaduriforme y miceliares).

6.1.3 Obtención de material vegetal (delimitación de la población)

El material vegetal se obtuvo de seis lugares de colecta, de *S. americanum* cinco (1. Nueva Santa Rosa, Santa Rosa; 2. San Miguel Panán, Suchitepéquez; 3. Poptún-San José, Petén; 4. Júcaro, El Progreso; 5. Uspantán, El Quiché) y de *S. nigrescens* una en San Pedro Sacatepéquez, San Marcos, fue confirmado en el Herbario de la Escuela de Biología (BIGU) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. Las especies fueron colectadas por el Ing. Vicente Martínez y el Br. Miguel Chigüichón del Centro Experimental Docente de Agronomía (CEDA) y confirmadas por el Ing. Mario Véliz, BIGU.

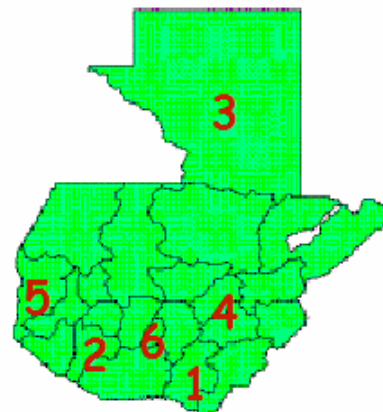
6.1.4 Modelo de muestreo

6.1.4.1 Colecta y preparación de los materiales

De acuerdo a trabajos previos de la especie *S. americanum* en Guatemala, se seleccionaron cinco localidades donde la reportan y se les asignó un número, además en San Pedro Sacatepéquez, San Marcos, se colectó la especie *S. nigrescens*.

A partir de la revisión de esas investigaciones previas se inició con la identificación de los lugares o aldeas específicos. Se realizaron visitas a cada localidad, ubicando y arribando a los lugares referidos. En cada punto se interrogó a vecinos para identificar áreas donde existieran poblaciones de la especie.

La ubicación de individuos o poblaciones de *S. americanum* resultó compleja por que las exploraciones se realizaron en época de verano, en la cual el déficit de humedad reduce las posibilidades de encontrar notables densidades de la especie, aunque el estado fenológico es supuestamente el que tiene más bioactividad. Al ser ubicada la especie se procedió a cortar la base de su tallo con una tijera de podar. Las plantas colectadas fueron únicamente las adultas, criterio establecido a partir de la presencia de frutos maduros. El lote de plantas cosechadas fue colocado en estratos separados por hojas de periódico, todo esto dentro de una caja plástica. El papel permitió absorber la humedad que el lote perdía y con esto se evitó que el material sufriera una acelerada descomposición durante el traslado.



Al regresar de cada colecta se secó el material vegetal en hornos y/o secadores solares de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos. Cuando el material vegetal estuvo seco, este se compiló en una bolsa plástica para usarse en los posteriores análisis. Además, en cada localidad se obtuvieron muestras que se herborizaron para determinar botánicamente la especie colectada. Así mismo, se realizó la caracterización del sitio de colecta, como de la especie. También se realizó la separación de los frutos maduros para extraer la semilla necesaria para la colección a establecer.

6.1.5 Proceso de obtención de semilla

Los frutos maduros fueron puestos a fermentar en un recipiente con agua para facilitar su ablandamiento y con ello la liberación de las semillas.

En la obtención de las semillas se usó un colador para la separación de las partículas o basuras grandes por medio de la frotación. Por debajo se colocó otro colador, más fino, que recibió las semillas. Para separar las basuras pequeñas se colocaron las semillas en un recipiente con agua, se agita el contenido y después de unos segundos se precipitan las semillas y otras partículas pesadas, por efecto de la densidad. Las basuras más ligeras quedan para ser desechadas junto con parte del agua. Este proceso se repite de 3-4 veces, quedando finalmente las semillas libres de basuras.

Para el secado de las semillas se colocaron estas sobre una superficie plástica inclinada que favoreció el escurrimiento del excedente de agua. También se coloraron en coladores que permitieron lo mismo. Por último, las semillas de cada localidad se almacenaron en un recipiente de vidrio (1).



6.1.6 Propagación de los materiales y preparación del área de siembra

En el proceso de propagación de los materiales se utilizaron bandejas formadoras de pilones, las cuales fueron llenadas con sustrato comercial Peat Moos. Posteriormente se depositaron semillas en el sustrato húmedo de cada espacio de la bandeja.

Durante la etapa de germinación y la de crecimiento inicial se realizaron riegos periódicos para mantener la humedad del sustrato germinador.

Se realizaron controles fitosanitarios, principalmente dirigidos a contrarrestar el ataque de insectos cortadores de las plántulas. En la preparación del área de siembra se incorporó materia orgánica para favorecer la fertilidad del suelo y la disposición de nutrientes para las plantas.



6.1.7 Germinación

Es esencialmente una aceleración del crecimiento del embrión o de la plántula. Antes de que se inicie la germinación la joven planta es relativamente pequeña y latente. A medida que la germinación se realiza, los puntos de crecimiento de la radícula y de la plúmula se dividen rápidamente. Por lo general, la radícula emerge primero de la cubierta de la semilla, crece hacia abajo; la plúmula crece hacia arriba y se

convierte en el sistema aéreo. La germinación por tanto, es enteramente un proceso de utilización de alimentos (2).

Los procesos que tienen lugar durante la germinación de la semilla son absorción de agua, secreción de enzimas y hormonas, hidrólisis de alimentos almacenados en forma soluble, y traslocación de alimentos solubles y hormonas a los puntos de crecimiento. Estos procesos están total o parcialmente influidos por los siguientes factores: reservas de alimento, provisión de hormonas, provisión de agua, provisión de oxígeno y nivel de temperatura (3).



6.1.7 Composición de la muestra

Conforme a la naturaleza de la parte de la planta que se estudio para cada especie (hoja y semilla) se trató de tener una muestra representativa de 250-500 g de material vegetal por población; una mitad del material fue almacenada como muestra de referencia de cada población y la otra mitad fue sometida a las pruebas de laboratorio (estudio fitoquímico, ensayos biológicos y propagación de los cultivares).



6.1.8 Procesamiento y embalaje de las muestras

Las muestras fueron procesadas conforme a técnicas convencionales de secado y molienda. El almacenamiento, embalaje y transporte se realizó conforme a los principios botánicos y farmacognósticos generalmente aceptados.

6.2 Preparación de extractos crudos de las hojas de *S. americanum* y *S. nigrescens*

Del material vegetal se obtuvo el extracto etanólico. Se pesaron 150-250 g del material vegetal y se colocaron en un percolador, se le agregó etanol al 50% y se realizó una percolación durante cinco días, haciendo recambios del disolvente hasta que la extracción fue exhaustiva. El extracto obtenido se concentró a presión reducida a una temperatura inferior a 45°C en un evaporador rotatorio. Los extractos obtenidos fueron usados en los bioensayos y tamizaje fitoquímico correspondientes.



Percolación



Concentración en rotavapor



Secado

6.3 Ensayos biológicos y tamizaje fitoquímico

Las técnicas que se utilizaron están basadas en el manual de operaciones del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales y Laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC (8-12).

6.3.1 Actividad antibacteriana y antilevadura *in vitro* por el método de dilución

Se mide por el crecimiento de microorganismos inoculados en superficies de medios conteniendo moléculas bioactivas. El procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y se basa en el descrito por Mitscher *et al* (8).

6.3.1.1 Purificación del microorganismo

Purificar el microorganismo a ensayar (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans*, ATCC 10231, *C. glabrata*, *C. steatoidea*, *C. parapsiloides*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Cryptococcus neoformans* C13, *Escherichia coli* ATCC 25922) inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Mueller-Hinton inclinado, incubar 36°C durante 24 horas. Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, incubar a 36°C durante 48 h. Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1:100). Sembrar en caja de petri según la plantilla a utilizar.

6.3.1.2 Demostración de la actividad antibacteriana

Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada microorganismo siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36°C durante 24 horas. Utilizar como control negativo 9 mL de agar Mueller-Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%.

6.3.1.3 Interpretación de resultados

Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Se consideran positivos los extractos activos a concentraciones menores de 100 µg/mL.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.



6.3.2 Actividad antifúngica *in vitro* por el método de dilución

6.3.2.1. Purificación del microorganismo

Poner a crecer en agar saboraud las cepas de *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *A. flavus* ATCC 9170, *A. niger* ATCC 9029, *Microsporium gypseum* C 115 2000, **E:** *Trichophyton rubrum* C 113 2000, *T. mentagrophytes* ATCC 9972, *Sporothrix schenckii* C19 y *Fonsecaea pedrosoi* a 27°C durante 21 días o hasta obtener un crecimiento homogéneo del hongo en toda la caja.

6.3.2.2 Preparación de medio de cultivo

Preparar tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 mL del extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL. Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para verificar esterilidad. Guardar en refrigeración hasta su uso.

6.3.2.2 Preparación de inóculo

Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes: 0.6 g de dextrosa, 0.3 g de Na_2SO_4 , 0.3 g de KH_2PO_4 , 0.3 g de peptona, 6 g de agar-agar. Agregarlo a 300 mL de agua, disolver, verter 6 mL en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 h a 25°C para descartar contaminación. Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días). Agregar a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla. Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer. Llevar la suspensión a $100 \text{ esporas}/\mu\text{L} = 1 \times 10^5 \text{ esporas}/\text{mL}$ (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

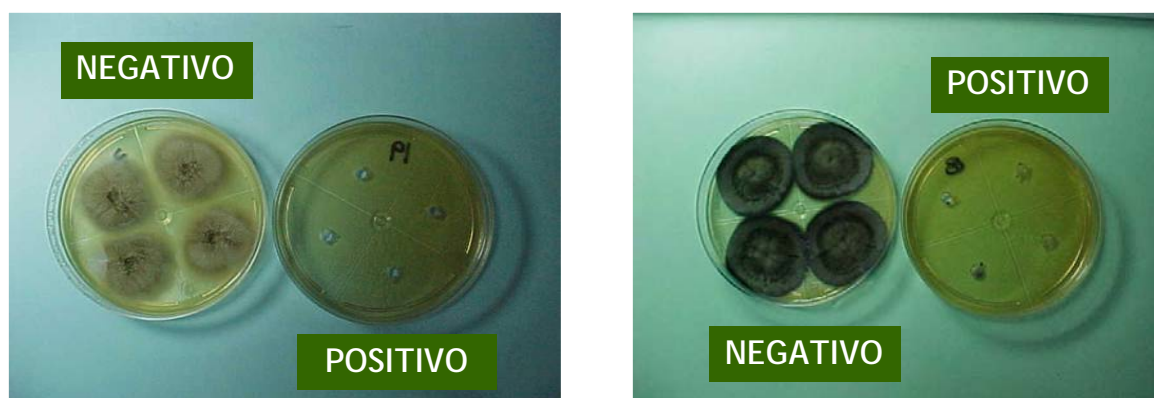
6.3.2.3 Inoculación de hongos filamentosos en placa

Abrir cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro. En forma equidistante. Tomar $30 \mu\text{L}$ de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días. Hacer un total de 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo.

6.3.2.4 Lectura e interpretación de los resultados

Medir el diámetro de la colonia del hongo en milímetros. Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75% (11, 13-18).



6.3.3 Técnica de microdilución en placa para el tamizaje antifúngico

6.3.3.1 Preparación del medio de cultivo

Mezclar 6,5 g de agar sabouraud deshidratado con 100 mL de agua, o se puede realizar con 2 g de peptona de carne, 4 g de glucosa y 3 g de agar. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar a baño María hasta disolución total. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Conservar a 4°C.

6.3.3.2 Preparación del inóculo de microorganismos

6.3.3.2.1. Hongos levaduriformes: Sembrar en un tubo de sabouraud glucosa inclinado la levadura de interés e incubar a 28 °C de 24 a 48 horas. Tomar 1 o 2 colonias del mismo con un asa estéril. Transferir a un tubo estéril conteniendo agua destilada. Se puede medir el descenso en la transmitancia de la solución a 95%. Realizar el recuento de microorganismos en cámara de Newbauer. Hacer la dilución necesaria para alcanzar la concentración deseada (1×10^6 esporas/mL). Almacenar en frío de acuerdo a los requerimientos del hongo.

6.3.3.2.2 Hongos filamentosos: Sembrar en tubo de sabouraud glucosa, e incubar a 28°C durante 21 días para que el mismo pueda desarrollar. Desprender el hongo de la superficie del tubo con gancho estéril y transferir el micelio a un erlenmeyer de 125 mL conteniendo agua destilada y perlas de vidrio. Agitar por rotación durante 5 minutos. Filtrar sucesivamente a través de una gasa en un embudo de vidrio o algodón con presión positiva utilizando una jeringa de 10 cc (en caso de macroconidias se puede obviar este paso debido a que se pierde mucho material). Centrifugar las conidias a 3000 rpm. durante 15 minutos. Lavar tres veces con agua destilada con sucesivas centrifugaciones entre lavado y lavado. Resuspender en agua destilada estéril. Realizar el recuento de conidias en cámara de Newbauer. Hacer la dilución necesaria para alcanzar la concentración deseada (5×10^4 esporas/mL). Almacenar en frío de acuerdo a los requerimientos del hongo

6.3.3.3 Preparación de las muestras: Los extractos deben ser ensayados a concentraciones menores de 1,000 µg/ml. y 250 µg/ml en el caso de los compuestos puros. Disolver en DMSO a una concentración de 50 mg/mL.

6.3.3.4 Ensayo: hacer diluciones de las muestras en caldo savoraud de concentración doble hasta obtener una concentración de 2,000 µg/mL. Colocar en placas estériles de fondo plano 100 µL de cada uno de los extractos. Agregarle 100 µL de la suspensión de esporas o conidias previamente estandarizada. Incubar 24 horas para las levaduras y 8 días para los hongos filamentosos a 27°C.

6.3.3.5 Interpretación de resultados

Actividad negativa: crecimiento de los hongos en los pocillos.

Actividad positiva: ausencia de crecimiento.



6.3.4 Citotoxicidad contra nauplios de *Artemia salina*

6.3.4.1 Preparación del agua de mar: Disolver 35 g de la sal de mar en un litro de agua destilada. Hacer una marca en el vaso de precipitar para indicar el volumen de agua. Hervir por 30 minutos y completar el volumen que se evaporó según la marca. Filtrar y refrigerar hasta el momento de usar, es estable por un mes a temperatura de 6-8°C.

6.3.4.2 Cultivo de *Artemia salina*: Colocar en un vaso de precipitar 200 mL del agua de mar y airear por 30 minutos. Colocar el agua en la pecera y agregar 40 mg de huevecillos en el área cerrada (lado oscuro). Incubar por 48 horas a temperatura ambiente y con luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasan al área abierta de la pecera (lado con luz).

6.3.4.3 Determinación de la Citotoxicidad: Pesar 0.040 g del extracto a ensayar y disolver con 2 mL de agua de mar. Agregar por triplicado en una microplaca: 100 μ l del extracto disuelto + 100 μ l de agua de mar con 10-15 nauplios. Control negativo: 100 μ l de agua de mar, 100 μ l de agua de mar con 10-15 nauplios. Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas. Contar en el estereóscopio el número de nauplios muertos. Agregar metanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos

los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla de nuevo.

6.3.4.3 Interpretación: Calcular el % de camarones muertos: Sumar el número de camarones muertos en los tres pozos (X), Sumar el número total de camarones en los tres pozos (Y), Dividir X dentro de Y y multiplicarlos por 100.

Si el % de camarones muertos es mayor del 50%, repetir la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL. Obtener los valores de X y Y en cada dosis y determinar el valor de DL₅₀ con el programa de computadora Finney (DOS).

Si el % es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL



6.3.5 Tamizaje fitoquímico preliminar

Se realizaron pruebas convencionales de tamizaje de productos naturales escalas macro y semimicro (por pruebas específicas de coloración, precipitación y otras para la identificación de alcaloides y saponinas por cromatografía en capa fina (CCF) usando para la visualización y caracterización de los metabolitos reactivos cromógenos universales (vainilla-ácido, sulfúrico y anisaldehído) y específicos para grupos funcionales y/o marcadores fitoquímicos.

6.3.5.1 Determinación del porcentaje de humedad

Se seleccionaron la parte representativa de la cantidad total como muestra. Asegurar la homogeneidad de la muestra mezclando o agitando, muestreos en varias partes o bien muestreos en intervalos definidos. Evitar toda influencia de calor al moler la muestra: el calor produce pérdida de humedad. Moler la muestra con mortero en líquidos con componentes sólidos utilizar varilla de vidrio, cucharilla o agitador magnético. Utilizar solo platillos de muestra desechables (diámetro interno = 92). Distribuir la muestra en el platillo fina y homogéneamente. Poner muestras en filtro de fibra de vidrio.

6.3.5.2 Densidad

Pesar el picnómetro perfectamente limpio y seco. Tomar nota de este peso. Llevar el picnómetro hasta el borde con agua destilada y colocar el termómetro tapadera, se produce un pequeño rebalse por el canal lateral; colocar la tapadera del canal lateral. Secar perfectamente y pesar en la balanza analítica. Anotar el peso cuando el termómetro marque 20°C. Vaciar el picnómetro y secar, llenar con la muestra y pesar a la misma temperatura o la que indique la monografía individual. Anotar el peso.

Calcular el peso específico así

$$\frac{\text{Peso del picnómetro con muestra} - \text{peso del picnómetro vacío}}{\text{Peso del picnómetro con agua} - \text{peso del picnómetro vacío}}$$

$$\text{Peso del picnómetro con agua} - \text{peso del picnómetro vacío}$$

6.3.5.3 Investigación de alcaloides

Ensayos macro y semimicro: Pesar 1g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego añadir 25 mL de metanol al 60°C. Filtrar con papel Whatman No. 1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante dividirla en cuatro tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: Agregar 5 gotas del reactivo de Mayer.

Tubo 2: Agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff.

Tubo 3: Agregar 5 gotas del reactivo de Wagner.

Tubo 4: Testigo.

Usar como estándar soluciones al 1% de atropina y papaverina. Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

Cromatografía en capa fina: Pesar 1g de material vegetal seco y molido, agregar 1 mL de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y extraer con 5 mL de metanol. Colocar en baño María a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60F, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1% en metanol (10 µL).

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1).

Detección: Reactivo de Dragendorff.

Identificación: Zonas de color naranja (visible).

6.3.5.4 Cuantificación de alcaloides

Medir con pipeta volumétrica 5 mL de extracto fluido. Transferir dicho volumen a una apoya de decantación que contenga 12.5 mL de cloroformo. Agregar 12.5 mL de agua y alcalinizar con amoníaco diluido. Agitar la muestra vigorosamente durante aproximadamente 1 minuto. Separar la capa de

cloroformo (inferior). Completar la extracción de los alcaloides con cantidades sucesivas de cloroformo (12.5, 5 y 5 mL). Extraer completamente los alcaloides. Remover completamente los alcaloides contenidos en el solvente inmiscible, extrayendo con porciones sucesivas de ácido sulfúrico, aproximadamente 0.5 N (12.5, 12.5, 5 y 5 mL), filtrando cada porción. Alcalinizar las soluciones ácidas combinadas (fase superior) con amoníaco diluido y remover completamente los alcaloides extrayendo con porciones sucesivas de cloroformo.

Evaporar los extractos clorofórmicos combinados (fase inferior) hasta sequedad en un baño de María y mantener el residuo seco a esta temperatura durante 15 minutos. Disolver el residuo con cloroformo, evaporar a sequedad en baño de María y mantener el calentamiento durante 15 minutos. Disolver, evaporar y calentar por tercera vez.

Disolver el residuo resultante con cloroformo, añadir ácido sulfúrico 0.02 N y remover el cloroformo con evaporación. Enfriar, y añadir rojo de metilo TS y titular el exceso de ácido con hidróxido de sodio 0.02 N.

6.4.5.5 Investigación de saponinas

Prueba de espuma:

Tubo 1: 100 mg de material vegetal pulverizado y seco.

Tubo 2: 2 mL de control de saponinas (0.5%).

Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo adicionar 10 mL de agua destilada. Calentar en baño María a 60°C durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30-40 segundos. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos. Observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persistente en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

Cromatografía en capa fina: 2 g de material vegetal seco, se extraen con 10 mL de etanol al 70% con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5 mL y proceder a aplicar 25-40 μ L en una cromatoplaque de sílica gel 60 F.

Estándar de saponinas al 0.1% en metanol (10 μ L).

Fase móvil: Cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido, acético-agua (50:10:40).

Vainillina - ácido sulfúrico y anisaldehído - ácido sulfúrico: Zonas azules, violetas, amarillentas.

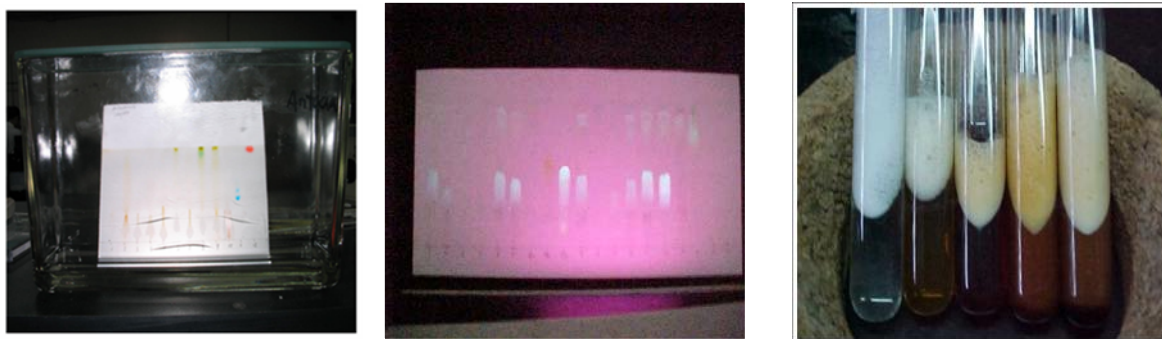
6.3.5.6 Cuantificación de saponinas

Pesar exactamente 0.500g de material vegetal o 0.250g de extracto vegetal. Añadir 50 mL de etanol al 95%. Agitar y calentar en baño maría a 60°C por 20 minutos. Filtrar. Transferir una alícuota de 4 mL a un beacker de 50 mL y evaporar a sequedad en baño maría. Enfriar a temperatura ambiente y añadir: 2 mL de acetato de etilo, 1 mL de reactivo A, 1 mL de reactivo B.

Agitar y calentar a 60°C en baño maría durante 5 minutos. Enfriar por 10 minutos. Diluir las muestras, para cada muestra tomar una alícuota de 1 mL para aforar en 10 mL con etanol al 95%. Leer a 430 nm, utilizando blanco y curva de estándar de estigmasterol, β -sitosterol, sarsapogenina, saponinas, 20-hidroxiecdisona.

Preparación de los estándares

Se pesan 0.040g de cada estándar. Para cada estándar se coloca en el balón de aforo de 10 mL. Para cada balón se diluyen con poco de etanol 95%. Luego se añade 2 mL de acetato de etilo, 1ml de reactivo A y 1ml de reactivo B. Se pasa en el sonicador para disolver bien los estándares. Luego añadir 1 mL de acetato de etilo, 2 mL de reactivo B y aforar con etanol 95%.



6.3.4.7 Determinación de la dosis letal media (DL_{50}): Procedió a un ensayo preliminar para determinar la zona del ensayo que debe situarse entre la dosis mas fuerte (dosis del ensayo antifúngico *in vitro*), dosis en la cual todos los animales sobreviven y la dosis más débil en la cual todos los animales mueren. Estas dos dosis delimitan la zona en la cual se efectuará el ensayo definitivo. Se administra dosis de las muestras a diferentes lotes de animales. Se anota el porcentaje de mortalidad en cada lote. La DL_{50} se determina después por cálculo. La dosis administrada es en progresión geométrica. Se seleccionaron cinco lotes de ratones, cada lote consta de cinco ratones albinos, de la misma edad y sexo, con un peso aproximado de 22 ± 10 g y el mismo tipo de alimentación. Se procedió a administrar vía orogástrica el extracto a estudiar (colectas 3 y 6) en dosis de 250mg/Kg, 300mg/Kg, 350mg/kg, 400mg/kg y 450mg/Kg de peso corporal, dándole a cada grupo la dosis respectiva, y se observa a la hora, 4, 8, 12, 48 y 72 horas y así sucesivamente durante 8 días. La evaluación fue la siguiente: alteración de pelos y mucosas, síntomas respiratorio y

circulatorio, sistema nervioso central y periférico, actividad somatomotriz y del comportamiento, temblores, hipersialorrea, sudoración, convulsiones, cromadocriorrea, etc.

Para determinar la DL_{50} los datos obtenidos se analizan utilizando el método de Karber Y Beherens.

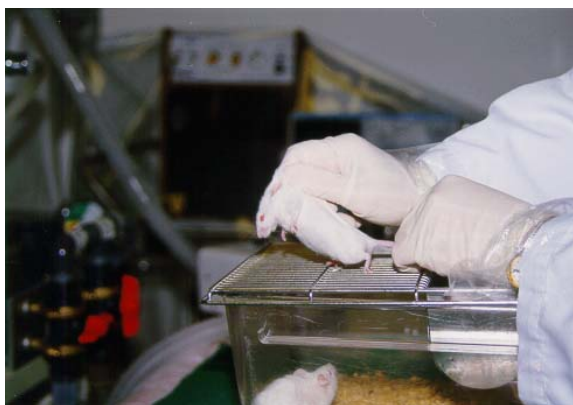
$$DL_{50} = D - \frac{\sum (a * b)}{n}$$

D = primera dosis que mata a todos los animales de un grupo

a = suma de muertos de 2 lotes consecutivos

b = diferencia entre dosis consecutivas entre lotes, expresados en mg

n = número de animales por lote.



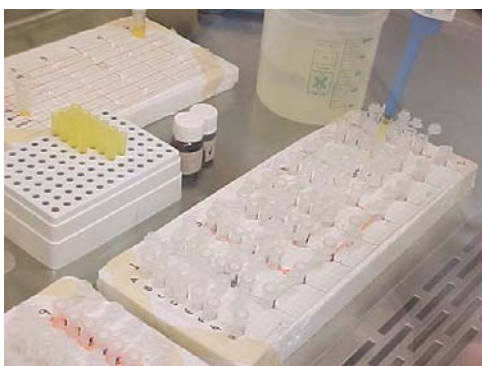
6.3.4.7 Ensayos de complemento y lifoproliferación

Ensayo linfoproliferativo

Se aislaron los linfocitos, por gradiente de densidad y se ajustó la concentración de linfocitos a 5×10^6 células/mL con RPMI-FBS. Los extractos, ConA (control positivo) y control negativo (medio RPMI), se incubaron por 7 días a 37°C con 5% de CO_2 , después se agregaron 50 μL de la solución de XTT, incubándose nuevamente a 37°C por 4 horas, posteriormente se efectuó la lectura espectrofotométricamente a 450 nm, comparándose la viabilidad con el aumento de absorbancia. Se consideró un resultado positivo cuando se produjo un aumento o disminución del recuento comparado con la lectina y el control negativo. Cada ensayo se realizó por triplicado con una concentración máxima de extracto de 1 mg/mL.

Ensayo hemolítico para la valoración de la actividad del sistema de complemento

En este ensayo se prepararon suspensiones de eritrocitos de carnero sensibilizados y eritrocitos de conejo, para la valoración de la vía clásica y alterna respectivamente a una concentración de 1.15×10^8 células/mL; los extractos se evaluaron partiendo de una concentración de 500 µg/mL. La preparación de controles para la medición de actividad sérica se efectuó agregando el buffer respectivo (VSB⁺⁺ para la vía clásica y EGTA-VSB para la vía alterna) para el 0% de hemólisis; agua desmineralizada para el 100% de hemólisis; suero inactivo como blanco de muestra y suero humano (activo, fuente de todos los componentes del sistema de complemento) mezclados con el buffer respectivo. Se preincubó la placa a 37°C por 30 minutos. Y después se agregó la suspensión de eritrocitos y se incubó a 37°C por 60 minutos, para la vía clásica y 30 minutos para la vía alterna, luego se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en espectrofotómetro para microplaca. Se consideró el aumento o disminución de la concentración de hemoglobina liberada comparada frente a la actividad sérica y el control negativo como actividad Positiva y si la concentración de la muestra necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria (CI₅₀) fue menor a 15 µg/ml.



3.5 Análisis estadístico

Se realizó un estudio no probabilística a conveniencia en el cual se determinó la actividad biocida (citotóxica y antimicrobiana) de los extractos etanólicos de los colectas seleccionadas. Para la demostración de la actividad bactericida y antifúngica se utilizó estadística no paramétrica con criterio de positividad visual (si presentó crecimiento homogéneo hay actividad negativa, ausencia de crecimiento hay actividad positiva) realizando cuatro replicas por extracto y posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM). La determinación de alcaloides y saponinas, se hizo por la medición de R_f en cromatografía en capa ffgina, ensayos macro y semimicro de coloración y precipitación.

7. RESULTADOS

Caracterización de materiales y de lugares colectados: en la Tabla 1 se presentan el nombre y las características de la zona de vida de las colectas de *S. americanum* y *S. nigrescens* en seis diferentes regiones de Guatemala.

Tabla 1. Resumen de las áreas de colecta

No. de colecta	Nombre de la colecta	Departamento	Zona de vida	Nombre científico	Nombre común
1	Nueva Santa Rosa	Santa Rosa	Bosque húmedo subtropical templado, bh-S (t)	<i>Solanum americanum</i>	Quilete
2	San Miguel Panán	Suchitepéquez	Bosque muy húmedo subtropical cálido, bmh-S (c)	<i>S. americanum</i>	Hierba Mora
3	Poptún-San José	Petén	Poptún: Bosque muy húmedo subtropical cálido, bmh-S (c), San José: Bosque húmedo subtropical cálido, bh-S (c)	<i>S. americanum</i>	Hierba mora
4	Jícara	El Progreso	Monte espinoso subtropical, me-S	<i>S. americanum</i>	Quilete, macuy
5	Uspantán	El Quiché	Bosque muy húmedo montano bajo subtropical, bmh-MB	<i>S. americanum</i>	Hierba mora
6	San Pedro Sacatepéquez	San Marcos	Bosque muy húmedo montano bajo subtropical, bmh-MB	<i>S. nigrescens</i>	Hierba mora

Fuente: datos experimentales

Características de las especies colectadas: la Tabla 2 describe las características de cada planta colectada (altura, diámetro de cobertura, arquitectura, color de la flor, diámetro y color del fruto, semilla) de las seis colectas. El mayor número de semillas de las colectas dos a la seis se debe a que contienen semillas muy pequeñas que fueron aprovechadas después de los filtrados principales. Para tener mejor tamaño y calidad de semilla se debe efectuar únicamente los filtrados principales.

Tabla 2. Características de las especies colectadas

No. de colecta	Altura planta adulta (m)	Diámetro de cobertura (cm)	Arquitectura de la planta	Color de la flor	Diámetro del fruto (mm)	Semillas en 1 g	Color del fruto maduro
1	0.5 – 1.0	60	Recta o decumbente	Blanca o lila	7.0	3,284	Morado
2	1.0	75	Recta o decumbente	Blanca o lila	7.3	5,000	Morado
3	0.5 – 0.7	65	Recta	Blanca o lila	6.8	4,475	Morado
4	0.5 – 0.6	50	Recta	Blanca	6.0	4,286	Morado
5	0.4 – 1.0	35	Recta o decumbente	Blanca o lila	7.3	6,000	Morado
6	0.75 – 1.0	60	Recta	Blanca y lila	6.5	4,166	Verde y morado

Fuente: datos experimentales

Determinación taxonómica: Los resultados de la determinación botánica o taxonómica de los especímenes colectados se aprecia en la Tabla 3, así como el número de registro, o entrada, correspondiente al archivo del Herbario BIGU.

Tabla 3. Determinación taxonómica y nombre científico de las especies colectadas

No. de colecta	Especie	Registro BIGU
1	<i>Solanum americanum</i>	36671
2	<i>S. americanum</i>	36928
3	<i>S. americanum</i>	34032, 34036
4	<i>S. americanum</i>	34033
5	<i>S. americanum</i>	34034
6	<i>S. nigrescens</i>	34035

Fuente: datos experimentales

Establecimiento de la colección de materiales: en la Tabla 4 se presentan los porcentajes de germinación de las semillas de cada una de las colectas, siendo Nueva Santa Rosa la de mayor germinación.

Tabla 4. Porcentajes de germinación de semilla almacenada durante tres meses

No. de colecta	Germinación (%)
1	72
2	68
3	48
4	60
5	38
6	34

Fuente: datos experimentales

Descripción del área de establecimiento de la colección:

Los procesos de germinación y el posterior establecimiento de la colección de plantas se realizan en los campos de la Facultad de Agronomía.

- Ubicación: Latitud 14°35'11".
Longitud 90°31'58".
- Altitud: 1,502 msnm.
- Precipitación: 989.8 mm, distribuidos en 111 días.
- Humedad relativa: 79%.
- Temperatura: Máxima 20.6°C.
Mínima 17.4°C.

- Zona de vida: Bosque húmedo montano bajo subtropical.
- Suelo: Tipo Inceptisol, serie Guatemala.
pH 6.7
Fósforo: 24.1 µg /mL.
Potasio: 224 µg/mL.
Calcio: 11.22 Meq/100 mL de suelo
Magnesio: 3.26 Meq/100 mL de suelo.

Rendimiento de las colectas en estudio: Se obtuvieron los extractos etanólicos de seis colectas según los procedimientos descritos. En la Tabla 5 se observan la cantidad (en g) y el porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos de las colectas. Se obtuvieron los extractos etanólicos de cinco especímenes de *S. americanum* y uno de *S. nigrescens*. De los extractos obtenidos por percolación y posterior concentración en rotavapor, la colecta cuatro presentó el mayor porcentaje de rendimiento con un 50.97%, mientras que la colecta dos fue la de menor rendimiento con un 12.00%.

Tabla 5. Rendimiento de los extractos etanólicos de las especies en estudio

No. de colecta	Material vegetal (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
1	141.79	43.91	30.97
2	178.56	21.42	12.00
3	96.12	38.10	39.64
4	139.10	70.90	50.97
5	228.25	81.97	35.91
6	116.10	51.8	50.00

Fuente: datos experimentales

Determinación de la actividad contra bacterias y levaduras

Fase de tamizaje: Se determinó la actividad de los cultivares por el método de dilución, el procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y se basa en el método descrito por Mitscher *et al.* Las muestras fueron ensayadas contra las bacterias Gram (+): *B. subtilis* y *S. aureus*, bacterias gram (-): *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*; hongos levaduriformes: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. steatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans* y *S. cerevisiae*; y micobacterias: *M. smegmatis*. Se estableció como punto de corte una concentración 100 µg/mL, cuando un microorganismo era inhibido, se consideró que el extracto tenía actividad positiva (+), si se presentaba crecimiento era considerado negativo (-) o sin actividad. Como puede observarse en la tabla 6 las colectas 1, 3, 4, 5 y 6 presentaron actividad contra *C. albicans* y contra *C. neoformans* también presentaron actividad a excepción de la colecta cuatro. Contra *C.*

glabrata, *C. steatoidea*, *C. parapsilosis* y *S. cerevisiae* los extractos de las colectas 1, 3 y 4 presentaron actividad. Las colectas 5 y 6 únicamente para *C. steatoidea*, *C. parapsilosis* y *S. cerevisiae*.

Tabla 6. Tamizaje de la actividad antibacteriana y antilevadura de los extractos etanólicos por método de dilución

No. de colecta	Microorganismos												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
2	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
4	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
6	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+

Fuente: datos experimentales

A: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **B:** *Salmonella typhi* ATCC 14028, **C:** *Micobacterium smegmatis* ATCC 607, **D:** *Bacillus subtilis* ATCC 6051, **E:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, **F:** *Cryptococcus neoformans* C13, **G:** *Escherichia coli* ATCC 25922, **H:** *Candida albicans* ATCC 10231, **I:** *C. glabrata* **J:** *C. steatoidea*, **K:** *C. parapsilosis*, **L:** *C. krusei*, **M:** *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos positivos con actividad antilevadura: Esta determinación se realizó únicamente con extractos que presentaron actividad en la fase de tamizaje. Como se observa en la Tabla 7 las colectas cinco y seis presentaron un CIM de 500 µg/ mL, las colectas tres y cuatro. La colecta uno es el extracto con mayor actividad antilevadura (*C. albicans* y *C. neoformans*).

Tabla 7. CIM de los extractos positivos con actividad antilevadura (µg/mL)

No. de colecta	Microorganismos					
	A	B	C	D	E	F
1	250	125	500	62.5	125	62.5
2	250	250	-	500	-	500
3	-	250	1	500	125	125
4	500	500	500	500	125	62.5
5	500	500	-	62.5	500	62.5
6	250	125	-	500	125	125

Fuente: datos experimentales

A: *Cryptococcus neoformans* C13, **B:** *Candida albicans* ATCC 10231, **C:** *C. glabrata*, **D:** *C. steatoidea*, **E:** *C. parapsilosis*, **F:** *Saccharomyces cerevisiae*

(-) Actividad negativa a concentración de 1000 µg/mL

Actividad antifúngica contra hongos miceliares por método de dilución: en la Tabla 8 se presentan los resultados del tamizaje contra hongos filamentosos por el método de dilución en agar, obteniéndose actividad contra *T. mentagrophytes* y *S. schenckii*

Tabla 8. Tamizaje de la actividad antifúngica contra hongos miceliares de los extractos etanólicos por método de dilución en agar

No. de colecta	Microorganismos							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	-	-	-	-	-	+	+	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-	+	+	-
4	-	-	-	-	-	+	+	-
5	-	-	-	-	-	+	+	-
6	-	-	-	-	-	+	+	-

Fuente: datos experimentales

A: *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, **B:** *Aspergillus flavus* ATCC 9170, **C:** *Aspergillus niger* ATCC 9029, **D:** *Microsporium gypseum* C 115 2000, **E:** *Trichophyton rubrum* C 113 2000, **F:** *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, **G:** *Sporothrix schenckii* C19, **H:** *Fonsecaea pedrosoi*

(-) Actividad negativa a concentración de 1000 µg/mL

(+) Actividad positiva a concentración de 1000 µg/mL

CIM de la actividad antifúngica contra hongos miceliares por método de dilución en agar: a los extractos con actividad en la fase del tamizaje se les realizó el CIM para *T. mentagrophytes* y *S. schenckii*, siendo la colecta cuatro la de mejor CIM para ambos hongos (31.25 y 62.5 µg/mL respectivamente).

Tabla 9. CIM de los extractos con actividad positiva contra hongos miceliares en la fase del tamizaje por el método de dilución en agar (µg/mL)

No. de colecta	Microorganismos	
	F	G
1	62.5	62.5
2	-	500
3	125	62.5
4	31.25	62.5
5	125	125
6	125	500

Fuente: datos experimentales

F: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, **G:** *Sporothrix schenckii* C19,

(-) Actividad negativa a concentración de 1000 µg/mL

Actividad antifúngica por el método de microdilución en placa: En la tabla 10 se presentan los resultados del tamizaje en microdilución en placa tanto para hongos miceliares como levaduriformes. No hubo actividad contra los hongos filamentosos del género *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*), sin embargo los dermatofitos y los hongos levaduriformes si presentaron actividad.

Tabla 10. Tamizaje de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos a dosis por el método de microdilución en placa

No. de colecta	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4	-	-	-	+	-	+	+	+	+
5	-	-	-	+	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Fuente: datos experimentales

A: *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, **B:** *A. flavus* ATCC 9170, **C:** *A. niger* ATCC 9029, **D:** *Microsporium gypseum* C 115 2000, **E:** *Trichophyton rubrum* C 113 2000, **F:** *T. mentagrophytes* ATCC 9972, **G:** *Candida albicans*, **H:** *Cryptococcus neoformans*, **I:** *Saccaromyces cerevisiae* ATCC 9763.

(-) Actividad negativa a concentración de 1000 µg/mL

(+) Actividad positiva a concentración de 1000 µg/mL

Determinación de la CIM de los extractos con actividad positiva en la fase del tamizaje por la técnica de microdilución en placa: en la Tabla 11 se presentan los resultados de la CIM de los extractos con actividad positiva,

Tabla 11. CIM de los extractos etanólicos con actividad positiva en la fase el tamizaje por el método de microdilución en placa (µg/mL)

No. de colecta	A	B	C	D	E
1	-	-	125	62.5	31.2
2	250	-	-	-	-
3	-	-	250	62.5	62.5
4	32.2	32.2	250	62.5	31.2
5	32.2	32.2	500	62.5	31.2
6	-	62.5	250	62.5	31.2

Fuente: datos experimentales

A: *Microsporium gypseum* C 115 2000, **B:** *T. mentagrophytes* ATCC 9972, **C:** *Candida albicans*, **D:** *Cryptococcus neoformans*, **E:** *Saccaromyces cerevisiae* ATCC 9763.

Actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*: La letalidad de los extractos fue determinada según la letalidad de las muestras contra nauplios de *A. salina* de 48 horas de vida a los que se enfrentaron. En la fase de tamizaje se estableció como punto de corte 1000 µg/mL y se consideró que una muestra presentaba actividad si era capaz de matar a más del 50% de los nauplios contra los que se les evaluó. Este procedimiento se realizó por triplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los tres pozos de la prueba. Como puede observarse en la Tabla 11, las colectas uno y tres tienen actividad citotóxica a una concentración de 1000 µg/mL

Tabla 12. Actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina* ($\mu\text{g/mL}$)

No. de colecta	<i>Artemia salina</i>
1	1000
2	-
3	1000
4	-
5	-
6	-

Fuente: datos experimentales

(-) Actividad negativa a concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Sólidos extraíbles, porcentaje de humedad, densidad, pH y cenizas totales: en la Tabla 12 se presentan los resultados del sólidos extraíbles, porcentaje de humedad y cenizas totales de las seis colectas.

Tabla 13. Determinación de sólidos extraíbles, porcentaje de humedad, cenizas totales, densidad y pH.

No. de colecta	Sólidos extraíbles (%)	Humedad (%)	Cenizas totales (%)	Densidad (g/mL)	pH
1	10.85	10.62 \pm 0.56	12.13	**	**
2	92.73	9.80	**	1.0170	5.5
3	27.72	**	**	**	**
4	97.73	11.17 \pm 0.48	**	1.2169	5.5
5	5.02	10.89 \pm 2.0	14.31	0.9379	5.5
6	57.94	10.51 \pm 1.03	13.66	1.0140	5.9

Fuente: datos experimentales

** Muestra insuficiente

Tamizaje fitoquímico: mediante ensayos macro, semimicro y cromatografía en capa fina (CCF) se identificaron metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos. En las Tablas 14 a la 18 se muestran los metabolitos detectados así como las fases móviles y métodos detectados.

Tabla 14. Alcaloides

No. de colecta	Mayer	Dragendorff		Wagner		CCF		
	R	r	R	R	r	R	R	
1	Precipitación	+	Turbidez	+	Precipitación	+	Zonas color	+
2		++		+		+	naranja	+
3		++		+		+	(Vis)	+
4		+		+		+		+
5		++		+		0		+
6		0		+		0		+

Fuente: datos experimentales

Revelador: Dragendorff

Estándares: Atropina y papaverina

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (35-10-5)

Referencias: R= reacción; r = resultado

Tabla 15. Determinación de valores Rf de alcaloides

No. de colectas	Distancia de la muestra	Distancia de la fase móvil	Valor Rf	Presencia de alcaloides
1	7.5	7.7	0.97	+
2	3.5	7.7	0.45	+
3	3.0	7.7	0.39	+
4	3.0	7.7	0.39	+
5	7.5	7.7	0.97	+
6	7.5	7.7	0.97	+
Atropina (estándar)	2.5	7.7	0.32	++
Papaverina (estándar)	4.2	7.7	0.54	++

(+) Color naranja, presencia de alcaloides

Tabla 16. Cuantificación de alcaloides

No. de colecta	Alcaloides (%)
1	5.08 ± 3.86
2	8.83 ± 2.97
3	8.02 ± 2.49
4	2.44
5	5.37 ± 2.99
6	**

** No se obtuvieron resultados

Tabla 17. Determinación de valores Rf de saponinas

No. De Colecta	Distancia de muestra	Distancia de la fase móvil	Valor Rf
1	4.8	7.8	0.615
2	4.8	7.8	0.615
3	4.8	7.8	0.615
4	4.8	7.8	0.615
5	4.8	7.8	0.615
6	4.8	7.8	0.615
Ergosterol*	5.2	7.8	0.66
Colesterol*	5.2	7.8	0.66
Saponinas*	-	-	-
20-Hidroxiccdisona*	-	-	-

- = No se observaron las manchas

* Estándares

Tabla 18. Cuantificación de Saponinas

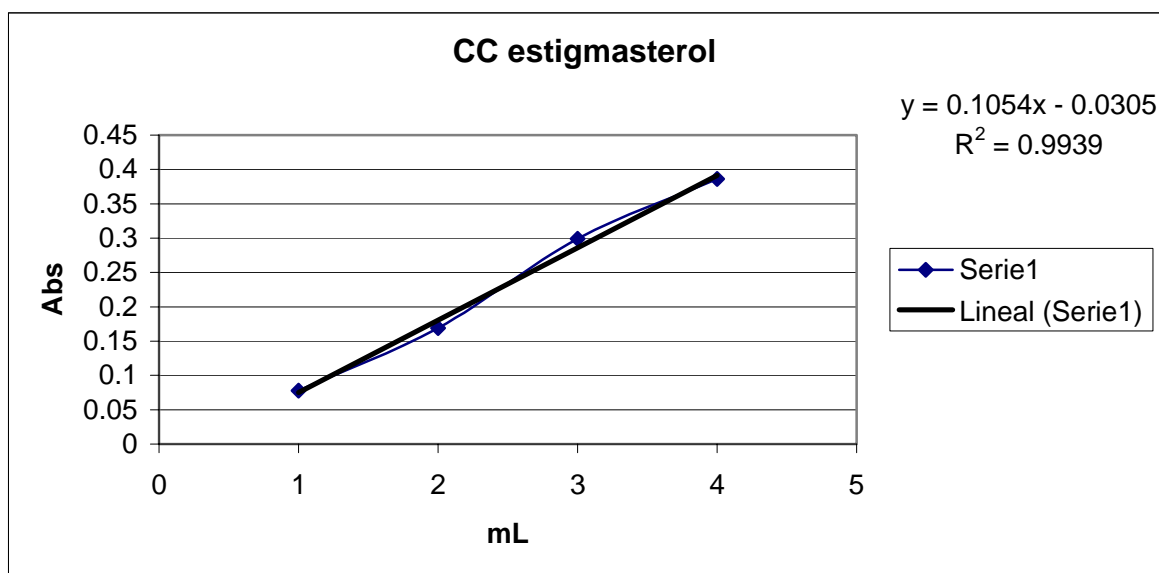
No. de colecta	Peso inicial	Dilución	Amax	Abs	Saponinas (%)
1	255.1 mg	1/10	418.0	0.511	2.01
2	252.9 mg	1/10	418.9	0.540	2.14
3	253.7 mg	1/10	416.9	0.516	2.04
4	261.3 mg	1/10	416.0	0.733	2.77
5	262.2 mg	1/10	418.0	0.374	1.46

Fuente: datos experimentales

Curva de calibración
Estándar: Estigmasterol

Peso del estándar	Dilución	Δ max	Abs
0.0444g	1/10ml	420.9	0.078
	2/10ml	420.0	0.169
	3/10ml	420.0	0.299
	4/10ml	420.0	0.386

Ecuación $Y = 0.1054x - 0.0305$ $R^2 = 0.9939$



Estándares aplicados

Estándares	Concentración	Longitud de onda	Absorbancia
B-sitosterol	40.90mg/10mL	418 nm	1.56
Estigmasterol	44.40mg/10 mL	420 nm	0.49
Saponinas	40.80mg/10mL	428.7nm	1.91
arsapogenina	40.00mg/10mL	427.60 nm	1.21
20-hidroxiccdisona	2.00mg/10mL	428.0nm	0.232

Determinación de la dosis letal media (DL₅₀): En la Tabla 18 se presentan los resultados de la DL₅₀ de los extractos de las colectas 1 y 6. La colecta 1 se eligió por ser el extracto de *S. americanum* con mejor actividad antifúngica y la 6 por ser el único extracto de *S. nigrescens*.

Tabla 18. Determinación de la dosis letal media

No. de colecta	No. de ratones inoculados	Dosis (mg/Kg)	No. de ratones muertos
1	25	250	1
		300	1
		350	1
		400	0
		450	0
6	25	250	2
		300	1
		350	0
		400	0
		450	0

Fuente: datos experimentales

Actividad Inmunomoduladora y de complemento: Para comprobar la presencia o ausencia de actividad Inmunomoduladora, se corrieron dos ensayos: el primero, un ensayo linfoproliferativo utilizando Concanavalina A (ConA) como control positivo por su actividad mitogénica y el segundo un análisis hemolítico sobre el sistema de complemento, en el que se empleó una mezcla de suero humano como control positivo. En la Tabla 19 a la 22 y se muestra los datos obtenidos para el ensayo linfoproliferativo, siendo la colecta 5 la de mejor actividad.

Tabla 19 Actividad Inmunomoduladora para el ensayo linfoproliferativo

No. de colecta	Actividad 1 mg/ml (Método con XTT)
1	* E +
2	** -
3	*** I ++
4	-
5	**** I+++
6	I++

Fuente: datos experimentales

* Estimulación, E + = 30-100%

** Porcentaje de estimulación o inhibición de 0-25% no significativo = inalterado

*** Inhibición, I++ = 51-75%

**** Inhibición, I +++ = 76-100%

Se determinó la Concentración Efectiva Mínima (CEM) utilizando diferentes concentraciones de los extractos, siendo estas de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.2 µg/mL y 15.7 µg/mL, éstos resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Determinación de la Concentración Efectiva Mínima (CEM) de los extractos que mostraron actividad sobre la actividad linfocítica ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

No. de colecta	500	250	125	62.5	31.2	15.7
1	E+ ¹	E +	E \pm ²	E \pm	- ³	-
3	I ++ ⁴	I+ ⁵	-	-	-	-
5	I++ + ⁶	I ++	I+	-	-	-
6	I++	I +	-	-	-	-

Fuente: datos experimentales

¹ Porcentaje de estimulación de 30-100 % = E +

² Porcentaje de estimulación de 25-30% = E +/-

³ Porcentaje de estimulación o inhibición de 0-25% no significativo = inalterado

⁴ Porcentaje de inhibición de 51-75 % = I ++

⁵ Porcentaje de inhibición de 31-50 % = I +

⁶ Porcentaje de inhibición de 76-100% = I +++

Los resultados de la actividad inmunomoduladora sobre el sistema de complemento muestran que para la vía alterna solo el extracto S3 posee actividad inhibitoria, como se aprecia en la tabla No. 21.

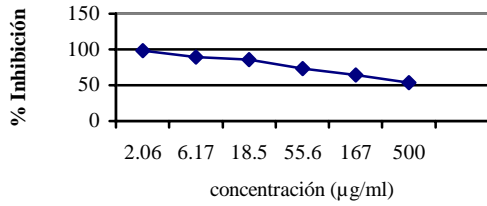
Tabla 21. Actividad Inmunomoduladora sobre el sistema de complemento y determinación de la IC₅₀

No. de colecta	Vía Alterna	IC ₅₀
1	No activa	188.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$
2	No activa	19.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$
3	Inhibidora	13.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$
4	No activa	239.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$
5	No activa	34.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$
6	No activa	138.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$

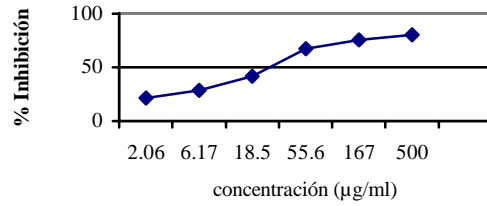
Fuente: datos experimentales

Para este ensayo se determinó la Concentración Inhibitoria media (CI₅₀), que es la cantidad de extracto necesaria para producir el 50% de hemólisis, partiendo de una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, luego 166.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 55.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 18.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se pueden observar en la Tabla 22, y las graficas 1 a 6 a continuación. Estos resultados sugieren que de los extractos estudiados presentan actividad inmunomoduladora, sobre el Sistema de Complemento y la actividad linfoproliferativa, la colecta 3, siendo ésta de tipo inhibitorio. También presentan actividad inhibitoria sobre la actividad linfoproliferativa las colectas 5 y 6 y de tipo estimuladorio la colecta 1.

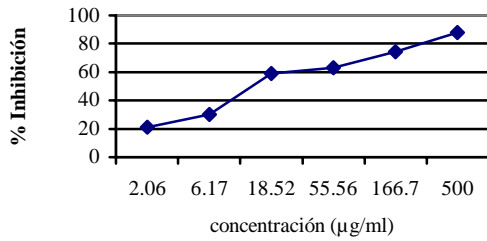
Gráfica No. 1
Extracto S1



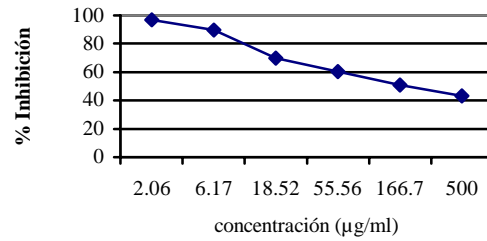
Gráfica No. 2
Extracto S2



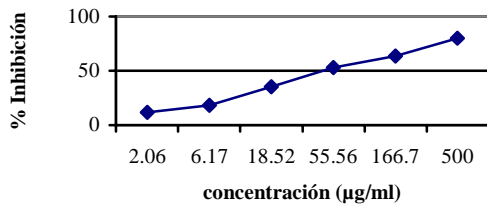
Gráfica No. 3
Extracto S3



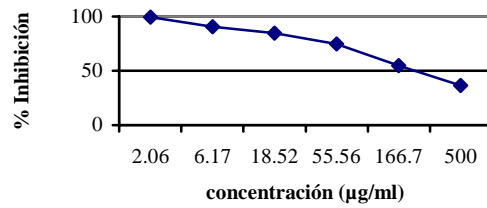
Gráfica No. 4
Extracto S4



Gráfica No. 5
Extracto S5



Gráfica No. 6
Extracto S6



**MONOGRAFIA DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO: *Solanum americanum* Miller y
Solanum nigrescens Mart & Gal (21)**

Familia

Solanaceae

Sinonimias

S. americanum: *S. nodiflorum* Jacq.,

S. nigrescens: *S. douglasii* Dunal., *S. oligospermum* Bitter

Otros nombres populares

Macuy, Hierba mora, Imut, Quilete

Partes usadas medicinalmente

Hojas

Descripción botánica

S. americanum hierba de 1 m de alto, tallo pubescente. Hojas en pares o solitarias, 3-14 cm de largo, lanceoladas, ápice agudo. Inflorescencia internodal, racemiforme. Flores en cálices de 1-2 mm, lóbulos ovalados, agudos; corola blanca, limbo partido 5-8 mm de ancho, estilo 2.5-3.5 cm de largo, mas largo que los estambres, ovario globoso. Frutos globosos, negros al madurar 4-8 mm de diametro; semillas pequeñas (22).

S. nigrescens hierba de 0.5-2 m de alto; tallo piloso. Hojas en pares o solitarias, diferentes en tamaño, similares en formas enteras o dentadas, lanceoladas, 3-18 cm de largo, ápice acuminado, base atenuada. Pecíolo 5-35 mm de diámetro. Inflorescencia internodal, racemiforme; pedúnculos 1-3 cm de largo, cáliz 1-1.5 de largo, lobulado; corola blanca o lila, mancha oscura en la base; filamentos ciliados; anteras 3-4 mm de largo; ovario glabro. Fruto globoso 4-7 mm de diámetro; semillas 1-1.5 mm de largo (22, 23).

Hábitat

S. americanum es nativa de América, México a Costa Rica, crece en matorrales y sembradillos de 350 a 1500 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa.

S. nigrescens es nativa de México a Costa Rica, crece en matorrales y bosques mixtos de 1500 a 3900 msnm. En Guatemala se ha descrito en Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepequez, San Marcos y Sololá (23).

Historia

Esta planta no se menciona en las fuentes históricas mexicanas del siglo XVI (24). Fuentes y Guzmán en la *Recordación florida* la menciona como "... útil a el remedio de muchas enfermedades, en especial a la de erisipela...". Hay dificultades taxonómicas ya que erróneamente los especímenes de la región han sido determinados como *S. nigrum* L.(23), planta nativa Eurasia que es hexaploide, mientras que el material local es *S. americanum* que es un espécimen diploide (25, 26).

Obtención

Se obtiene por recolección en lugares de crecimiento silvestre, recientemente hay en el mercado local la disponibilidad de follaje cultivado. Su propagación se hace por semilla, que germina a los 15-20 días, transplantar a los dos tres meses de una distancia de 30 a 40 cm a la sombra o media sombra; florece a los cinco o seis meses fructifica a los 6-9 meses. Para consumo como alimento se colecta el follaje al inicio de la floración; como medicina colectar la planta al final de la fructificación, separar las hojas y secarlas a la sombra. La recolección fresco: seco es baja (27).

Usos y propiedades medicinales

El cocimiento de hojas tiene amplio uso medicinal, por vía oral se administra en afecciones digestivas (cólico, diarrea, estreñimiento, gastritis, úlcera gástrica) y respiratorias (asma, amigdalitis, tos ferina), anemia, cirrosis, dolor de muelas, escorbuto, hinchazón, meningitis, nerviosismo, paludismo, presión alta, retención urinaria y reumatismo (28-32).

La decocción de hojas se usa por vía tópica en afecciones dermatomucosas (acné, abscesos, dermatitis, eczema, erisipela, exantema, heridas, leucorrea, llagas, mesquinos, vaginitis, pústulas, tiña, úlceras, hemorroides y verrugas); la cataplasma de hojas frescas se usa para tratar erisipela. Los frutos se usan para tratar verrugas y madurar abscesos (21, 31, 33-35).

Se le atribuye propiedad aperitiva, calmante, depurativa, diurética, desinflamante, emoliente, febrífuga, mineralizante, reconstituyente, sedante y vulneraria (24, 30-34, 36- 38).

Las hojas se consumen cocidas en todo el país, se acostumbra a comer durante la convalecencia y la recuperación de diversas enfermedades. Es una hierba que se consume en grandes cantidades en

Guatemala y es frecuentemente encontrarla en los mercados y supermercados. Se acostumbra a comer para la convalecencia y recuperación de diversas enfermedades (22, 30, 38).

Farmacología experimental y clínica

Estudios antibacterianos demuestran que la decocción de las hojas de ambas especies tienen actividad antibiótica. La decocción de *S. americanum* contra *S. aureus*; la de *S. nigrescens* contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pyogenes*, pero no contra *Vibrio cholerae* (39-42).

Estudios de espectro de inhibición con cepas de 20 pacientes demuestran que el extracto metabólico de *S. nigrescens* inhibió 50% de las cepas de *S. aureus*, 20% de las de *S. typhi* y 15% de las *P. aeruginosa*. El mejor disolvente para la extracción de la actividad antibiótica es el etanol (43-45).

Estudios antimicóticos demuestran que la decocción y tintura de hojas de ambas especies son activas contra *C. albicans* y *C. neoformans*. La tintura de *S. nigrescens* inhibe 6/9 (66.6%) cepas de *C. albicans* aisladas en lesiones patológicas de diferentes regiones anatómicas. La decocción de las hojas es activa contra los seis dermatofitos ensayados, la CIM es de 100 a 300 mg/mL demostrándose actividad fúngica el extracto hidroalcohólico es inactivo contra *A. fumigatus* (30, 46-49).

La decocción de hojas de *S. nigrescens* presenta cierta actividad inmunomoduladora en ratones demostrada por la proliferación de linfocitos y aumento de título de anticuerpos séricos contra EC. La infusión tiene actividad antiinflamatoria (500 mg/Kg) en un modelo de inflamación podal con carragenina. Estudios farmacológicos demuestran que la infusión de hojas no tiene actividad hipoglucémica en un modelo en rata (54). La infusión de las hojas tiene actividad espasmolítica frente a acetilcolina (640 mg) y frente al cloruro de bario (320 a 640 mg), de donde se deduce que inhibe el espasmo por mecanismos mucarínicos y musculotrópicos (48, 50, 51).

En un ensayo clínico con 50 pacientes con candidosis vaginal se demostró que el grupo experimental tratado con óvulos de *S. nigrescens* tiene un comportamiento similar al tratado con óvulos de nistatina (30, 47).

En un estudio de doble ciego se comparó la efectividad de una pomada a base de extracto de frutos secos de *S. nigrescens* en 37 pacientes padeciendo de verruga vulgaris, plana y filiforme, demostrándose una efectividad similar a los 15 días contra las verrugas tratadas con la droga de elección (nitrógeno líquido) (35).

Composición química y principios activos

La materia vegetal usada como medicina son las hojas sazonadas secas y frutos secos, que deben

reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos. En la revisión de literatura realizada no se encontraron referencias sobre la relación entre la actividad farmacológica atribuida y la composición química, ni estudios tendientes a la formulación de productos fitofarmacéuticos.

La actividad antibiótica del género *Solanum* se atribuye a α -solanina, un alcaloide esférico básico, peso molecular 559, agujas finas de alcohol al 85%, rotación óptica - 60° (piridina), soluble en álcali, insoluble en agua (25 mg/L a pH 6), éter y cloroformo, presenta actividad antifúngica (*C. albicans* y hongos), insecticida y antiinflamatorio. La solasodina y solasonina (alcaloides esféricos de peso molecular 413 y 884), son solubles en alcohol, sirven de material inicial para esteroides (49, 50, 52).

Por fraccionamiento bioguiado del extracto alcohólico, análisis de masa y resonancia magnética nuclear se demostró que el principio responsable de la actividad antifúngica en *S. nigrescens* es un glicósido de spiristanol (cantalasaponina) (49).

Ambas especies son de composición compleja aunque poco estudiadas. *S. americanum* contiene alcaloides (solasodina, solasonina, glucoalcaloides y alcalinas); El tamizaje fitoquímico de *S. nigrescens* demostró alcaloides, esteroides policíclicos insaturados, saponinas, azúcares 2-desoxigenados, taninos, cardenólidos, ácido málico, riboflavina, tiamina, ácido ascórbico y sales minerales.

S. nigrescens demostró alcaloides, esteroides policíclicos insaturados, saponinas, azúcares 2-desoxigenados, taninos, cardenólidos, ácido málico, riboflavina, ácido ascórbico y sales minerales (50).

Toxicología

Estudios de citotoxicidad demuestran que el extracto es hemolítico aún en altas diluciones (1/1000); en concentraciones terapéuticas no presenta citotoxicidad a células de fibroblastoma (1/64) en diluciones de 1/32 el 64% permanece viable después de incubación por 30 minutos; muestra cierta toxicidad subaguda al administrarse por vía IP 500 mg/mL. El clorhidrato de solanina se usa como insecticida en la agricultura, su DL₅₀ es 42 mg/Kg por vía intra peritoneal en ratón (46).

Los frutos de *S. nigrum* se consideran tóxicos al ganado, ovejas, caballos, pollos y patos, aunque las opiniones con relación a la toxicidad de una planta son contradictorias, ya que se han dado casos de envenenamiento en animales domésticos, pero también se usan en la elaboración de pasteles; los principios tóxicos se atribuyen a la solanina y solanidina; los síntomas de intoxicación son: vómitos, diarrea, dolor de cabeza y estómago, dificultad para ver y hablar, debilidad, sudoración, frío, alteración del pulso, alucinaciones e incoherencia, sin embargo esta toxicidad no ha sido demostrada en *S. nigrescens* ni en *S. americanum* (52).

Contraindicaciones

No se han reportado.

Precauciones y reacciones adversas

No se han reportado.

Indicaciones terapéuticas

A pesar de su amplio uso popular, no es una especie de uso oficial, solamente se encuentra en la Farmacopea Caribeña (52). Se comercializan algunos productos como tinturas y pomadas.

Por su actividad antifúngica y mineralizante está indicado su uso por vía oral en el tratamiento de infecciones dermatofíticas y en la fase de recuperación de pacientes con diversos estados debilitantes. Se recomienda administrar 3 veces al día hasta por 15 días 3 tazas al día en dosis de 1-2 g/taza en infusión o 1-2 mL de tinturas 1/10 en etanol al 35%.

Tópicamente está indicado para tratar afecciones de la piel y mucosas como dermatofíticas y candidiasis. Se recomienda aplicar una decocción de 10-30 g/L o 5-15 mg/L de la tintura en agua caliente en forma de compresa, lienzo o enjuague; puede usarse en supositorios o ungüentos. Por su actividad antifúngica y antiinflamatoria puede combinarse con Apacín, Frijolillo, Guchipilín y Nance (33).

Formas farmacéuticas y posología

Administrar 2-3 veces/día después de las comidas durante 3-4 semanas en dosis de: 1-2 g/taza en infusión, 2-3 mL de tintura 1:10 en etanol 35%.

Aplicar tópicamente una decocción de 10-30 g/L o 5-15 ml/L de la tintura en agua caliente en formas de compresa, lienzo o enjuague; o bien en supositorio o ungüento.

MONOGRAFÍA DE LOS LUGARES DE COLECTA Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES

Colecta 1: Nueva Santa Rosa, Santa Rosa

Los puntos de colecta se establecieron en los linderos que dividen a dos municipios del departamento de Santa Rosa, siendo estos Nueva Santa Rosa y Santa Rosa de Lima.

En el primer municipio se exploró la zona de la aldea Chapas, que está localizada a una latitud de 14°25'50", longitud 90°18'44", y se ubica en la parte norte de la cabecera municipal.

Las vías de acceso son por dos carreteras de terracería transitables en toda época. Dista a 36 km. de la cabecera departamental y a 82 km. de la ciudad capital. El valle sobre el cual se sitúa la aldea Chapas está a una altura de 1025 msnm.

En Santa Rosa de Lima se exploró la aldea San José El Rinconcito, ubicada al norte de la cabecera municipal. La aldea se ubica sobre el valle comprendido entre la Quebrada Seca y el Río Pinula. Localizada latitudinalmente a 14°26'16" y longitudinalmente 90°18'23".

Clima

El régimen climático es húmedo, la temperatura media anual es de 23°C, con máxima de 35 y mínimas de 10 a 20°C.

La precipitación media es de 1675 mm., siendo de mayo a octubre la época de mayor precipitación. La estación seca se marca de noviembre a abril, esta época origina un déficit de humedad en el suelo, lo cual impide el establecimiento de cultivos.

El área de colecta se encuentra ubicada en la zona de vida Bosque húmedo subtropical (templado), bh-S (t). Hidrográficamente pertenece a la vertiente del Pacífico.

Fisiografía y geología

El área corresponde a la región fisiográfica Tierras Altas Volcánicas.

En la geología de sus suelos se dice que se originaron en el período cuaternario a partir de rocas volcánicas, pómez y aluvión. Sus suelos pertenecen a la serie de suelos de los valles no diferenciados, en los cuales ningún tipo de suelo es dominante.

Topografía

El área se sitúa en un valle de topografía plana, con suaves ondulaciones y pendientes no mayores del 20%.

Colecta

Se recopiló material vegetal, frutos y muestras completas para la herborización, en las aldeas Chapas y San José El Rinconcito.

La zona cuenta con ríos y su actividad agrícola se centra en la siembra de caña de azúcar, café y algunas hortalizas. En el lugar de colecta los suelos son franco-arenosos de color café claro, con una profundidad mayor a los 20 centímetros, libres de pedregosidad, regular contenido de materia orgánica y una buena fertilidad natural.

La especie *S. americanum* es conocida como quilete. Su crecimiento es común y se ve reducido en la época de verano. Es aprovechada en la dieta alimenticia de los pobladores.

El quilete crece silvestre en áreas de siembras de gramíneas (maíz, sorgo) y de hortalizas (tomate, chile), donde los suelos han sido labrados y esta soltura favorece su germinación y desarrollo. Debido a su abundancia ocasiona que en algunos sistemas de cultivo sea considerada como una maleza importante, y su crecimiento se ve favorecido cuando concluye el ciclo agrícola de alguno de los cultivos de interés.

El quilete de esta zona cuando presenta frutos puede contar con una altura que va de los cincuenta centímetros a un metro. Las plantas presentan un crecimiento recto o decumbente. La mayoría de las flores son blancas y a veces se observan algunas de coloración lila en una misma planta. Los frutos maduros son de color morado.

El material vegetal fue secado. Los frutos maduros fueron separados y reunidos para iniciar el proceso de extracción de semilla.

Colecta 2: San Miguel Panán, Suchitepéquez

La colecta se realizó en la finca Bulbuxyá. Esta pertenece a la Universidad de San Carlos de Guatemala, bajo la administración de la Facultad de Agronomía. Se ubica en el municipio de San Miguel Panán, departamento de Suchitepéquez.

La finca está situada en las coordenadas 14°39'39" de latitud Norte, y 91°22'00" de longitud Este, a aproximadamente 340 msnm.

El área se encuentra en la zona de vida Bosque muy húmedo subtropical cálido, bmh-S (c).

Clima

Presenta una precipitación pluvial de 4000 mm. de lluvia anual, distribuidos en 140 días del año, ubicados entre los meses de mayo a octubre, con lluvias ocasionales en abril y noviembre. Una humedad relativa del 80% y se ha calculado una temperatura media anual de 25°C.

La definición del clima es la siguiente: cálido con invierno benigno, muy húmedo y sin estación seca bien definida.

Suelos

La finca Bulbuxyá se encuentra comprendida en la división fisiográfica que corresponde a los suelos de declive del Pacífico, que se extiende desde el pie de monte de las montañas volcánicas, hasta la orilla del litoral. Las series de suelos que se pueden encontrar son: serie Panán y serie Cutzán.

Colecta

Se recopiló material vegetal, frutos y muestras completas para la herborización, en la finca Bulbuxyá de La Universidad de San Carlos.

En esta área de colecta domina la topografía plana a ligeramente ondulada. La textura de los suelos es arenosa y franco-arenosa y de color café oscuro, con una profundidad mayor a los 20 cm, con pocas áreas que presenten pedregosidad, con buena presencia de materia orgánica y de fertilidad.

Las condiciones ambientales son calurosas y de alta humedad. La zona cuenta con ríos y la actividad agrícola es intensa, principalmente por la siembra de caña de azúcar, hule; además de las siembras de maíz y frijol.

La especie *S. americanum* es conocida como hierba mora. Su crecimiento es abundante y es aprovechado en la dieta de los pobladores.

Es común encontrar esta especie dentro de los sistemas productivos de maíz, favoreciendo su germinación los trabajos de volteo del suelo que se efectúan para el establecimiento del cultivo. El desarrollo de la hierba mora se ve beneficiado cuando concluyen las actividades productivas en el maíz.

La hierba mora puede estar alcanzando un metro de altura, con una arquitectura recta o decumbente. El número de tallos depende de la poda o alteraciones que se realizan al momento de ser cortadas para consumo o como medida para eliminarlas del sistema de cultivo. La mayoría de flores son blancas, pero también pueden observarse algunas de color lila. Los frutos maduros son de color morado.

El material vegetal fue secado. Los frutos maduros fueron separados y reunidos para iniciar el proceso de extracción de semilla.

Colecta 3: Poptún-San José, Petén

La colecta en el departamento de Petén incluye los municipios de San José y Poptún. En San José se recopiló material que estaba en la ruta que conduce a la reserva Bio-Itzá, y en Poptún se recopiló material de la aldea Las Lajas.

Condiciones climáticas y de suelo de Poptún

La temperatura media anual es de 23.1°C, con una máxima promedio mensual de 25.4°C de marzo a junio, y una mínima de 20°C de diciembre a enero. La precipitación media anual es de 1812.9 mm. Los

meses de mayor precipitación van de junio a noviembre, con un promedio aproximado de 20 días de lluvia al mes. Los meses de menor precipitación son de febrero a abril, con un promedio de 8 días de lluvia al mes. La humedad relativa se mantiene casi constante a través del año, con un promedio de 82%.

El clima se define como cálido, húmedo, con invierno benigno y sin estación seca bien definida. Este municipio se encuentra dentro de la zona de vida Bosque muy húmedo subtropical cálido, bmh-S (c).

Los suelos del área son poco profundos y excesivamente drenados.

El mapa de capacidad productiva de los suelos de Guatemala, escala 1:250000 indica que los suelos del área son de potencial productivo moderado bajo, bajo y muy bajo, aptos para la explotación forestal.

Condiciones climáticas y de suelo de San José

La formación del suelo es bastante calcárea. En las orillas del lago Petén Itzá abundan los guijarros, mucha arena, piedras, así como canteras limitando mármol y alabastro. En los bosques ha habido regular cantidad de maderas de construcción y de ebanistería, así como plantas tintóreas y medicinales. Cuenta asimismo con árboles de chicozapote, de los cuales se ha obtenido el látex denominado chicle.

Se ubica en la región fisiográfica Cinturón Plegado del Lacandón. Los paisajes característicos en las zonas onduladas son los montículos redondeados, las áreas planas entre ellos y los valles aluviales.

Su ubicación corresponde a la zona de vida Bosque húmedo subtropical cálido, bh-S (c). El régimen de lluvia va de 1,160 a 1,700 mm. como promedio total anual. La biotemperatura es de 22°C. La evapotranspiración potencial puede estimarse en promedio de 0.95. Su clima se define como cálido con invierno benigno, húmedo con vegetación natural característica y sin una estación seca bien definida.

La topografía en general es suave. Presenta suelos poco profundos y apropiados para el desarrollo forestal.

Colecta

Se recopiló material vegetal, frutos y muestras completas para la herborización, en Poptún y San José, en el departamento de Petén.

La topografía en los sitios de colecta que predomina es plana y a veces ligeramente ondulada. Son suelos de textura franco-arcillosa y de color café claro, la profundidad del suelo es no mayor de los 15 cm y con alguna presencia de pedregosidad. La cantidad de materia orgánica y las condiciones de fertilidad natural son bajas.

Las condiciones ambientales son calurosas y de alta humedad. La actividad productiva principal es la ganadería, además del cultivo de granos básicos.

La especie *S. americanum* es conocida como hierba mora. Es aprovechado en la dieta de los pobladores.

Esta especie crece en los sistemas agrícolas de granos básicos, terrenos de pastoreo, o en las orillas de senderos. Para su germinación y crecimiento necesita de suelos suaves y libres de competencia por luz y humedad, principalmente en las etapas iniciales.

El crecimiento de la hierba mora puede alcanzar una altura de cincuenta a setenta centímetros. El número de tallos puede ser numeroso debido a las alteraciones o perturbaciones a las que se ven expuestas. La mayoría de flores son blancas, y aparecen algunas de tono lila. El color de los frutos maduros es morado.

El material vegetal fue secado. Los frutos maduros fueron separados y reunidos para iniciar el proceso de extracción de semilla.

Colecta 4: Jícaro, El Progreso

El Jícaro es un municipio que pertenece al departamento de El Progreso. Se localiza a 92 km. de la capital de Guatemala. Sus coordenadas geográficas son 14°54'20" latitud Norte y 89°47'09" longitud Oeste, a una altura aproximada de 275 msnm.

Clima

La zona de vida a la que corresponde esta localidad es Monte espinoso subtropical, me-S. La temperatura media anual es de 26°C. El clima está clasificado como una región cálida, con invierno benigno seco, estepa, con invierno seco. La precipitación pluvial promedio oscila entre los 400 y 600 mm., distribuido de agosto a octubre.

Suelo

Estos suelos pertenecen al grupo de suelos desarrollados sobre materiales volcánicos. La roca madre es granito y gneis. Además, se encuentran a lo largo del río Motagua, donde se han formado grandes terrazas de materiales volcánicos durante períodos volcánicos activos. Son suelos poco profundos, con vegetación rala y pendientes inclinadas, excepto las áreas del Motagua.

Colecta

Se recopiló material vegetal, semilla y muestras completas para la herborización, en la localidad de La Estancia, El Jícaro.

En el sitio de colecta es plana la topografía dominante. La textura general de estos suelos es franca y el color es café claro, con una profundidad superior a los 20 centímetros, con áreas libres de pedregosidad. La cantidad de materia orgánica es regular y su grado de fertilidad es bajo.

Las condiciones ambientales imperativas son calurosas y con vientos secos. La actividad productiva es amplia, tal es el caso de ganadería, producción de frutales, etc.

La especie *S. americanum* es conocida como quilete o macuy. Se utiliza para el consumo humano. Esta especie crece dentro de las áreas baldías y de siembra, en los cuales exista la humedad necesaria para que pueda subsistir. También existen áreas en las cuales siembran el quilete para comercializarlo, y también es sembrado en pequeños huertos familiares.

La altura de estas plantas puede estar dentro de los cincuenta y sesenta centímetros. La arquitectura de la planta es recta. El número de tallos esta condicionado por las podas que se realizan para aprovechar su follaje. Domina la coloración blanca en sus flores. Sus frutos son de tono morado cuando están maduros.

El material vegetal fue secado. Los frutos maduros fueron separados y reunidos para iniciar el proceso de extracción de semilla.

Colecta 5: Uspantán, El Quiché

Se realizó la colecta en la aldea Xola o Cholá, que dista 3.5 km. de la cabecera municipal de San Miguel Uspantán, y a 101.5 km. de la cabecera departamental. La aldea se localiza a 15°21'53.4" latitud Norte, 90°51'28.3" longitud Oeste.

Clima

En el área se registran precipitaciones de 2065 a 3900 mm. con un promedio de 2,730 mm anuales y una temperatura en el rango de 12.5-18.6°C. La zona de vida corresponde a Bosque muy húmedo montano bajo subtropical, bmh-MB.

Fisiografía y geología

Fisiográficamente el área se ubica sobre la división de tierras altas cristalinas, además posee un origen geológico conformado por rocas ígneas y metamórficas que incluyen rellenos y cubiertas gruesas de cenizas pómez de origen diverso. Los suelos se clasifican como del tipo calante, considerados poco profundos y bien drenados a excesivamente bien drenados.

El área pertenece a la cuenca del río Chixoy y a la vertiente del golfo de México.

Colecta

Se recopiló material vegetal, semilla y muestras completas para la herborización, en la localidad de la aldea Cholá, Uspantán, en el departamento de El Quiché.

En el área de colecta la topografía dominante es inclinada, con algunas áreas ligeramente planas. La textura de estos suelos es arcillosa y el color es café oscuro, presentan una profundidad de suelo que supera los 20 centímetros, la presencia de pedregosidad es casi nula en las partes planas y es buena la cantidad de materia orgánica y la fertilidad natural.

Las condiciones ambientales son templadas y ligeramente húmedas. La actividad agrícola se centra en siembras de zanahoria, papa, coles, además del tradicional maíz.

La especie *S. americanum* es conocida como hierba mora. Es aprovechada para el consumo humano y también por el ganado al momento del pastoreo.

Esta especie crece en los terrenos de las siembras y se ve favorecido por las labranzas que se efectúan al suelo, lo cual permite la germinación de su semilla. También crece en la orilla de senderos, aunque de manera esporádica.

La altura común que puede alcanzar esta especie es cuarenta centímetros, aunque también más de un metro, pero este último dato es cuando esta libre de perturbaciones. La arquitectura de la planta es recta y decumbente. El número de tallos es a partir del grado de manipulación a las que se ven expuestas. En el color de las flores es generalmente blanca, pero también existe un buen número de flores con tono lila. El color de los frutos maduros es morado.

El material vegetal fue secado. Los frutos maduros fueron separados y reunidos para iniciar el proceso de extracción de semilla.

Colecta 6: San Pedro Sacatepéquez, San Marcos

La colecta se realizó en el caserío Nueva Reforma, aldea Champollap, municipio San Pedro Sacatepéquez, departamento San Marcos.

Clima

El área corresponde a la zona de vida Bosque muy húmedo montano bajo subtropical, bmh-MB.

La precipitación pluvial promedio es de 2730 mm. Las biotemperaturas van de 12.5 a 18.6°C. La evapotranspiración potencial se estima en 0.35. La topografía generalmente es accidentada. El clima se define como templado con invierno benigno.

Fisiografía y geología

Pertenece a la región de tierras altas volcánicas, en la vertiente del Pacífico, y se encuentra dentro de la cuenca del río Naranjo.

Colecta

Se recopiló material vegetal, semilla y muestras completas para la herborización, en la localidad de San Pedro Sacatepéquez, en el departamento de San Marcos.

En el área de colecta la topografía dominante es inclinada con áreas fuertemente onduladas. La textura de los suelos es franco arcillosa y el color es café claro, presentan una profundidad no mayor de los 20 centímetros, y presentan una ligera pedregosidad. La cantidad de materia orgánica y de fertilidad es regular.

Las condiciones ambientales son templadas a frías. La aldea donde se realizó la colecta se llama Champoiap y el caserío es Nueva Reforma. La actividad agrícola es siembra de hortalizas.

La especie *S. americanum* es conocida como hierba mora. Es aprovechada para el consumo humano y también por el ganado al momento del pastoreo.

Esta especie crece en áreas de siembras y en sitios donde la actividad productiva ha finalizado. También crece en orillas de senderos y en peñascos, principalmente en áreas que por el paso de la tormenta Stan sufrieron movimientos de tierra.

Esta especie generalmente tiene setenta y cinco centímetros, o más, de altura. La arquitectura de la planta es principalmente recta. El color de las flores puede ser blanca y lila. El color de los frutos maduros es generalmente verde, con unas ligeras manchas moradas. El material vegetal fue secado. Los frutos maduros fueron separados y reunidos para iniciar el proceso de extracción de semilla.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Se colectaron cinco especies de *S. americanum* provenientes de Nueva Santa Rosa, Santa Rosa; San Miguel Panán, Suchitepéquez; Poptún-San José, Petén; Jícaro, El Progreso y Uspantán, El Quiché y una colecta de *S. nigrescens* de San Pedro Sacatepéquez, San Marcos. Las áreas de colecta son zonas de bosque húmedo, a excepción de El Jícaro que son montes espinosos y el clima varía de subtropical templado hasta cálido (Tabla 1).

Las características de las especies colectadas fueron similares entre sí, con una altura que varía desde 0.5 a 1 m, son plantas rectas o decumbentes, flores blancas a lilas y fruto de color morado o morado-verdoso. La cantidad de semillas varía en cada una de las colectas desde 3,000-6,000 semilla/g de fruto, siendo la colecta de Uspantán la de mayor cantidad. El mayor número de semillas de las colectas 2 a la 6 se debe a que contienen semillas muy pequeñas que fueron aprovechadas después de los filtrados principales. Para tener mejor tamaño y calidad de semilla se debe efectuar únicamente los filtrados principales (Tabla 2).

Se colectó además un espécimen de cada una de las colectas para su determinación botánica o taxonómica y registro en el Herbario BIGU, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (Tabla 3).

En la Tabla 4 se presentan los resultados del porcentaje de germinación durante tres meses de cada una de las colectas siendo la colecta 1 (Nueva Santa Rosa, Santa Rosa) la de mayor germinación (72%), seguida de San Miguel Panán y El Jícaro (68 y 60% respectivamente). El área donde se estableció la colección de campo (campos de la Facultad de Agronomía) también es un bosque húmedo a una altitud de 1,502 msnm y una precipitación de 989.8 mm, distribuidos en 111 días. Humedad relativa: 79%, temperatura máxima de 20.6°C y mínima de 17.4°C. El suelo tenía un pH 6.7, 24.1 µg /mL de fósforo, 224 µg/mL de potasio, 11.22 Meq/100 mL de suelo de calcio y 3.26 meq/dL de suelo de magnesio.

Se obtuvieron los extractos en etanol al 50% de las seis colectas por extracción en percolador y concentración en rotavapor. De los extractos obtenidos la colecta 4 presentó el mayor porcentaje de rendimiento con un 50.97%, mientras que la colecta 2 fue la de menor rendimiento con un 12.00% (Tabla 5).

A los extractos se les determinó la actividad contra bacterias gram positivo y gram negativo, hongos miceliares y levaduriformes. La actividad antibacteriana y antilevadura se realizó utilizando la metodología de dilución en placa descrita por Mitcher *et al* y la actividad antiúngica contra hongos

miceliales por la técnica descrita por Brancato & Goldig modificado por McRae *et al.* Además, todos los hongos (levaduriformes y miceliales) se realizaron también por la técnica de microdilución en placa.

Las muestras fueron ensayadas contra las bacterias Gram positivo: *B. subtilis* y *S. aureus*, bacterias gram negativo: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*; hongos levaduriformes: *C. albicans* y *C. neoformans*; y micobacterias: *M. smegmatis*. Se estableció como punto de corte una concentración 1000 µg/mL, cuando un microorganismo era inhibido, se consideró que el extracto tenía actividad positiva, si se presentaba crecimiento era considerado negativo o sin actividad. Los resultados presentados en la Tabla 6 muestran que todas las colectas presentaron actividad contra *C. albicans* y *C. neoformans* (para este último la colecta 4 no presentó actividad). Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) siendo la colecta 1 el extracto con mejor actividad antilevadura (*C. albicans* y *C. neoformans*).

El ensayo antifúngico incluyó también el tamizaje y determinación de la CIM contra hongos miceliales del género *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*), dermatofitos (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*) y hongos causales de micosis subcutáneas (*Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*). Todos los extractos presentaron actividad contra *T. mentagrophytes* y *S. schenckii* excepto la colecta 2 que fue positiva únicamente para este último hongo. La mejor actividad de estos dos hongos fue la colecta 4, seguida de la colecta 1 y la 3.

Aunque no se había propuesto dentro del proyecto original la técnica de microdilución en placa, esta se realizó a los seis extractos. Al igual que para la técnica de dilución no se encontró actividad contra los hongos del género *Aspergillus*, pero sí para dos de los tres dermatofitos ensayados (*T. mentagrophytes* y *M. gypseum*). Ambas técnicas no son comparables entre sí, ya que su principio es distinto, sin embargo sí se pueden utilizar las técnicas macro para realizar un tamizaje inicial y la de microdilución para realizar la CIM, ya que es mucho más sensible. La técnica de microdilución en placa no se realizó para los hongos causales de micosis subcutáneas, ya que por el prolongado tiempo de incubación (21 días para *S. schenckii* y 28 para *F. pedrosoi*) el medio se consume en su totalidad y no es posible determinar eficientemente si hay o no actividad de los extractos.

A un compuesto que se administra es importante determinar su letalidad, en este estudio se determinó la actividad citotóxica de los seis extractos preparados contra nauplios de *Artemia salina* y la dosis letal media *in vivo* utilizando ratones como modelo animal. Se determinó que únicamente las colectas 1 y 3 tienen actividad citotóxica a una concentración de 500 µg/mL (Tabla 12). La dosis letal media se realizó únicamente al extracto de la colecta 1, ya que fue el extracto con mejor actividad antifúngica contra *C. albicans* y *C. neoformans* hongos para los cuales está reportado en otros estudios de su eficacia como tratamiento fitoterápico popular. También se le realizó a la colecta 6 por ser la única colecta de *S. nigrescens*.

En la tabla 13 se presentan los resultados de sólidos extraíbles, porcentaje de humedad y cenizas totales de las seis colectas, obteniéndose resultados similares para todas las colectas, con excepción de los sólidos extraíbles, ya que las colectas 2 y 4 dieron resultados de 92.73% y 97.73% respectivamente, comparados con los otros extractos que no pasaron de 30%.

Mediante ensayos macro, semimicro y cromatografía en capa fina (CCF) se identificaron metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos los cuales fueron alcaloides y saponinas (Tablas 14-16). Se realizó la detección cuantitativa de saponinas con un porcentaje de 2% en la mayoría de las colectas. Respecto a la cuantificación de alcaloides no se obtuvieron resultados reproducibles, debido a un margen de error alto en dos metodologías evaluadas para la valoración de alcaloides.

Para la determinación de la dosis letal media (DL_{50}) se eligió la colecta 1 debido a que presentó mejor actividad antifúngica, y la colecta 6 por ser diferente especie a la colecta 1. La dosis que se administra en ratones es de 200mg/kg, de extracto, siendo el resultado positivo y previo para realizar la DL_{50} . Las dosis empleadas fueron de 250, 300, 350, 400 y 450mg/kg, con cinco ratones para cada dosis. Se observaron los primeros síntomas, una rata falleció instantáneamente, esto se debió a la mala administración, porque los demás ratones no fallecieron inmediatamente de la colecta 6. A las 4 y 8 horas solo presentaba síntomas de sedación, a las 24 horas de la colecta 6 de la dosis de 250mg/kg falleció una, a los 48 horas fallecieron una de las dosis de 300 y 350mg/Kg de la colecta 1 y fallecieron uno de la dosis de 300mg/kg. A los siguientes días ningún ratón falleció. De las dos especies ensayadas ninguna es tóxica, la muerte de los ratones se debió a una mala administración del extracto provocando asfixia en el animal.

Los datos obtenidos, muestran que únicamente la colecta 3 presenta actividad sobre la vía alterna del Sistema de Complemento, por presentar una CI_{50} de 13.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que debe ser o está indicada por un valor igual o menor a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para considerarse positiva dicha actividad, este ensayo descrito por Klerx y colaboradores se basa en la hemólisis de los eritrocitos por el Complejo de Ataque a Membrana (CAM) generado al activarse el complemento (32), actuando por tanto como activadores y células blanco, tras esta activación se produce la lisis de los eritrocitos liberando hemoglobina la cual es medida y utilizada como parámetro para medir la actividad.

Para poder apoyar la actividad anti-inflamatoria reportada en la literatura, debe realizarse también el ensayo para la valoración de la vía clásica del Sistema de Complemento, por ser sus niveles utilizados como indicador de actividad inflamatoria, u otras patologías en las que es necesario disminuir la excesiva estimulación del sistema inmune.

En el caso de la actividad linfoproliferativa, presentan actividad inhibitoria las colectas 3, 5 y 6, mostrando mejor actividad el cultivar 5; de acuerdo a lo descrito por Cáceres en 1996 para *Solanum* en

donde refiere que *S. nigrescens* presenta cierta actividad inmunomoduladora en ratones medida por la proliferación de linfocitos y el aumento en títulos de anticuerpos séricos contra eritrocitos de carnero, se encuentran variantes respecto a la actividad linfoproliferativa ya que la realizada en este estudio es de tipo *in vitro* y la mencionada por Cáceres es un ensayo *in vivo*. Con todo ello, los resultados más interesantes los presenta el cultivar 3 por presentar actividad en ambos ensayos, para la determinación de actividad inmunomoduladora.

De acuerdo a los resultados de porcentaje de germinación y de la actividad antifúngica contra hongos miceliares y levaduriformes es la colecta 1 procedente de Nueva Santa Rosa, Santa Rosa la colecta que presentó mejores resultados, a pesar de que el rendimiento del extracto obtenido a partir del material vegetal no es el más alto, sin embargo no se considera un mal rendimiento. Esta colecta no presentó actividad interesante en los ensayos linfoproliferativos y de complemento. Los resultados de toxicidad *in vitro* e *in vivo* demostraron que no presenta toxicidad y por tanto se puede obtener preparados seguros para su uso en la industria fitofarmacéutica.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Las características botánicas de las especies colectadas fueron similares entre si, siendo únicamente la cantidad de semillas la que varía en cada una de las colectas.
- 9.2 El mayor porcentaje de germinación durante tres meses de las especies lo obtuvo la colecta 1 [Nueva Santa Rosa, Santa Rosa (72%)], seguida de la colecta 2 [San Miguel Panán (68%)] y la colecta 4 [El Júcaro (60%)].
- 9.3 De los extractos obtenidos la colecta 4 presentó el mayor rendimiento con un 50.97%, mientras que la colecta 2 fue la de menor rendimiento con un 12.00%.
- 9.4 Los extractos tanto de *S. americanum* como el de *S. nigrescens* no presentaron actividad contra ninguna de las bacterias ensayadas.
- 9.5 Todas las colectas presentaron actividad contra *C. albicans* y contra *C. neoformans* (a excepción de la colecta 4), siendo la colecta 1 es la que tiene mejor actividad contra *C. albicans* y *C. neoformans*.
- 9.6 De los hongos miceliares, los extractos de las seis colectas presentaron actividad únicamente contra *T. mentagrophytes* y *S. schenckii* excepto la colecta 2 que fue positiva únicamente para este último hongo, siendo la colecta 4 la colecta con mejor actividad, seguida de la colecta 1 y la 3.
- 9.7 Los extractos de las seis colectas no presentaron actividad citotóxica importante contra los nauplios de *A. salina*
- 9.8 Los resultados de sólidos extraíbles, porcentaje de humedad, densidad, pH y cenizas totales de las seis colectas, obtenidos fueron similares para todas las colectas, con excepción de los sólidos extraíbles, ya que las colectas 2 y 4 obtuvieron porcentajes de 92.73 y 97.73 respectivamente, comparados con los otros extractos que no pasaron de 5%.
- 9.9 El tamizaje fitoquímico de los extractos demostró la presencia de alcaloides y saponinas en los extractos de todas las colectas.
- 9.10 En todas las muestras de las colectas se obtuvo un porcentaje de saponinas cercano a 2%.

- 9.11 No fue posible cuantificar los alcaloides, ya que los resultados no fueron reproducibles, debido al error en las metodologías de valoración de alcaloides.
- 9.12 Las dos especies de *Solanum* (*S. americanum* y *S. nigrescens*) ensayadas para la dosis letal media no presentan toxicidad *in vivo*.
- 9.13 El extracto de la colecta 3 es el único que presentó actividad sobre la vía alterna del sistema de complemento.
- 9.14 Los extractos de las colectas 3, 5 y 6 presentaron actividad inhibitoria, de la actividad linfoproliferativa, mostrando mejor actividad el cultivar 5.
- 9.15 El extracto de la colecta 1 (Nueva Santa Rosa, Santa Rosa) fue el extracto que presentó mejores características por sus resultados de germinación y actividad antifúngica.
- 9.16 De acuerdo a los resultados del estudio la colecta 1 es el material vegetal colectado recomendado para evaluar su actividad como cultivar y hacer preparaciones para la industria fitofarmacéutica.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Evaluar las características agronómicas y con los cultivares que se obtendrán el próximo año provenientes de las colectas realizadas durante este proyecto.
- 10.2 Comparar la eficacia de los productos preparados (extractos y tinturas) contra los hongos y levaduras que presentaron actividad para las colectas.
- 10.3 Determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *S. americanum* y *S. nigrescens* obtenidos de los cultivares contra otras bacterias que afectan la piel.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Azurdía C. 1995. Caracterización de algunos cultivos nativos de Guatemala. Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, USAC. 172 p.
2. Andrews F.S. 1981. Principios de horticultura. 3 Ed. México, D.F., Continental, 575 p.
3. Centro regional de ayuda técnica. 1965. Semillas; manual para análisis de su calidad. Trad. José Mesa. México, Edit. Herrero. 515 p.
4. Delgado Giron FJ. 1984. Rendimiento y contenido de proteína de hierba Mora (*Solanum* sp.) a diferente número de días a cosecha y número de cortes. Tesis Ing. Agrónomo. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 79 p.
5. Catie SF. Fisiología de semillas. Turrialba, Costa Rica. 24 p.
6. Vázquez Solorzano JA. 1984. Estudio del progreso germinativo en hierba mora (*Solanum* sp.). Tesis Ing. Agrónomo. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 181 p.
7. Weaver RJ. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.
8. Mitscher LA *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia* 35: 157-166.
9. Mitscher LA, Darker S & Gollapudi A. 1987. A modern look at folkloric use a Anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 5: 1025-1041.
10. CYTED. 1993. Manual de Técnica de Investigación. Bogotá, Proyecto X-1, s/p.
11. Cáceres A *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62:195-202.
12. España, SM *et al.* 1994 Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 5. Vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia* 65: 273-274.
13. Brancato FP & Golding NS. 1983. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *J. Mycol.* 45:848-863.

14. Burlingame EM & Reddish GP. 1973. Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. J. Lab. Clin. Med. 14:649-653.
15. Cáceres A, *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. J. Ethnopharmacol. 40: 207-213.
16. Mac Rae WD, *et al.* 1988. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. J. Etnopharmacol. 22:143-172.
17. MacCarthy P, *et al.* 1992. Antifungal activity of meridine. A natural product from the marine sponge. J. Nat. Prod. 55: 1644-1668.
18. Vanbrenseghem R, De Vroey C. Takashio M. 1970. Production of macroconidia by *Microsporium ferrugineum* OTA 1922. Sabouraudia 7:252-56.
19. Saravia, A. 2005. Métodos de ensayos toxicológicos y farmacológicos experimentales in vivo e in vitro. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala.
20. Sperman Karber. 1956. In. D.J. Finney. Statistical Method in Biological Assay. Ch Griffin and Co London, pp 524.
21. House PR, *et al.* Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Tegucigalpa, UNAH/CIMN-H/CID/CIIR/GTZ, p. 436.
22. Gentry JL. Standley PC. Flora de Guatemala. Chicago: Fieldiana: Botany; 1974 24 (10):104.
23. Linares E *et al.* Selección de Plantas Medicinales de México. México, Ed. Limusa, 1988, p. 50.
24. Figueroa Marroquín H. Enfermedades de los Conquistadores. Guatemala, Ed. Universitaria. 1983 pp. 103
25. Bhiravamurty PV *et al.* Chemotaxonomy of some members of the *Solanum nigrum* L. complex *Solanaceae* Neslet 1989; 3:1-12.
26. Mendieta RM, Del Amo S. Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. Xalapa, INIREB. 1981. pp. 313
27. Mejía JV. Geografía de la República de Guatemala. Guatemala, Tipografía Nacional. 1927. pp 157.
28. Girón LM *et al.* Anticandidal activity of plants used for the treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of a *Solanum nigrescens* preparation. Journal of Ethnopharmacology. 1988; 22:307 - 313.

29. IIN. Aspectos de la medicina popular en el área rural de Guatemala. Guatemala Indígena 1978 13:4,237, 299, 422.
30. Macal DR. Ensayo clínico de *Solanum nigrescens* (Hierba Mora) en el tratamiento de verrugas vulgaris (Tesis) Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala. 1992.
31. Mellen GA. El uso de las plantas medicinales en Guatemala. Guatemala Indígena. 1974. 9:99.
32. Ronquillo FA *et al.* Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas semiáridas del nororiente de Guatemala. Cuadernos DIGI. 1988 229 p.
33. Cáceres A, *et al.* J. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimicrobial activity of 44 plant extracts. Journal of Ethnopharmacology. 1991; 31:263-276.
34. Cáceres A *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. 1. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants Journal of Ethnopharmacology; 1998. 62:195-202.
35. Cáceres A *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. Journal of Ethnopharmacology. 1990. 30:55.
36. Ramírez O. Espectro de inhibición de bacterias patógenas por extractos vegetales. Tesis. Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 1988. 49 p.
37. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996 402p.
38. Cáceres A *et al.* Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases Journal of Ethnopharmacology; 1987. 20:223-237.
39. Cáceres A *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. Journal of Ethnopharmacology; 1993. 38:31-38.
40. Cáceres A, *et al.* Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales de uso popular en Guatemala. Guatemala: Editorial universitaria (Cuaderno de Investigación 7-92, Dirección General de Investigación DIGI, USAC) 1993. 89p.
41. Cooney G *et al.* Fungicidal activity of *Solanum* plant extract from Guatemala, C.A, Abstracts; Pharmacy Word Cong. 91, Washington, FIP, 1991. Pp CS52.

42. He X *et al.* An antifungal compound from *Solanum nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1994 ; 43:173-177.
43. Lara R *et al.* Determinación de la actividad inmunomoduladora de los extractos de zarzaparrilla, quilete y pericón. *Memorias. VI Cong. Nac. Microbiol. Guatemala, 1991.* pp. 88
44. Ríos VG. Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de *Artemisia absinthium* L. (ajenjo), *Solanum nigrescens* Mart. & Gal. (macuy) y *Verbena litoralis* HBK (verbena). Tesis. Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 1993. 43p
45. Victoria AE. Investigación Farmacológica de la acción hipoglucemiante de las hojas de *Solanum nigrescens* Mart. & Gal. (macuy, quileta o hierba mora). Tesis. Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. 1980. 41p.
46. Cruz AMA Estudio farmacológico de la actividad antiespasmódica *in vitro* de *Medicago sativa* L (alfalfa), *Linum usitatissimum* L (linaza), *Jasminum gradiflorum* L. (jazmín), *Citrus medica* L. (cidra) y *Solanum nigrescens* Mart. & Gal. (quilete) Tesis, Guatemala, Fac. CCQQ y Farmacia, USAC 1990. 63 p.
47. Budavari S, *et al.* (2000). *The Merck Index Rahway & Co*, pp.8853
48. Lewis DA. *Anti-inflammatory Drugs from plants and marine Sources*. Basel, Birkhäuser Verlag, 1989. 337 p. (1989) p 203
49. Berdy J *et al.* *CRC Handbook of Antibiotic Compounds*. Boca Ratón, CRC Press, Part 1, 1982. 410 p.
50. Girón LM *et al.* Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991; 34:173-187
51. Morton JF. *Atlas of Medicinal Plants of Middle América*. Estados Unidos de América: Charles Thomas Publisher; 1981. 536 p.
52. Germosén-Robineau L. *Farmacopea Vegetal Caribeña*, Ediciones Emile Desormeaux. 1997. p. 305.