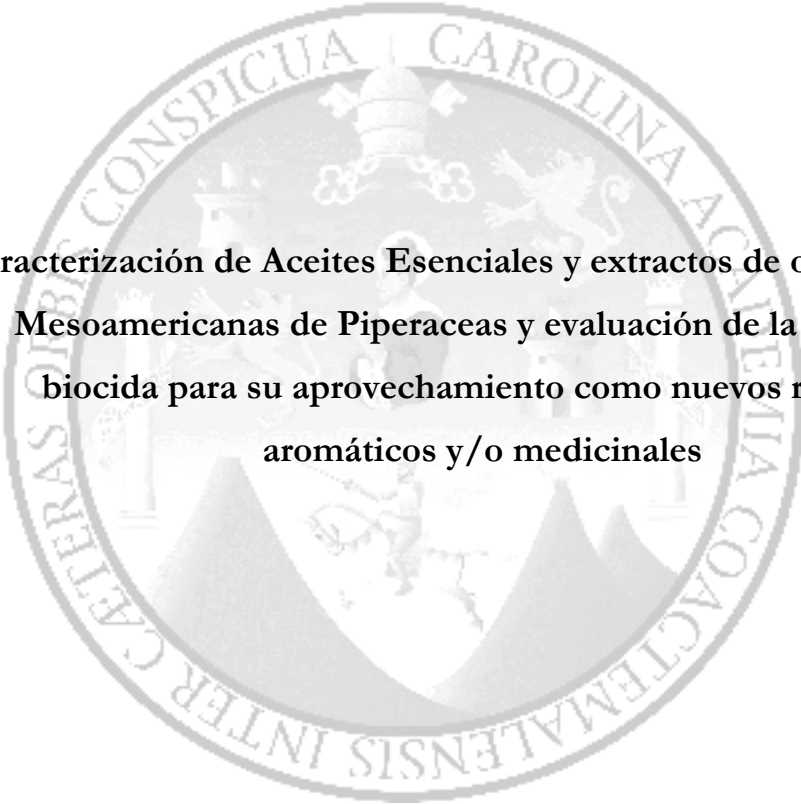


Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB)



**Caracterización de Aceites Esenciales y extractos de ocho especies
Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad
biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos
aromáticos y/o medicinales**

Coordinador: Ricardo Véliz.

Sully Cruz, Ana Gómez, Vinicio García, Luis Álvarez, Armando Cáceres, Julio Morales, Oscar Cobar,
Carmen Samayoa, Rodolfo Orozco, Isabel Gaitan.

Febrero – Diciembre 2006.

I. RESUMEN

La familia *Piperaceas* comprende 14 géneros y aproximadamente 700 especies, que están distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. De esta, las especies del género *Piper* suelen ser ricas en aceites esenciales, los cuales tienen diferentes aplicaciones, como repelente de insectos, larvicida y antimicrobiano entre otros. En Guatemala se describen aproximadamente 88 especies de *Piper* distribuidas en diferentes regiones del país, de las cuales se encuentra muy poca información química y farmacológica; basados en estudios etnobotánicos, se reportaron las especies de éste género como las más utilizadas para el tratamiento de diversas afecciones; estudios previos demostraron actividad contra protozoos y actividad contra líneas celulares de cáncer en *P. jacquemontianum* y *P. amalago*; por lo cual surgió la necesidad de contribuir al estudio de este género, evaluando su composición química y determinando la actividad biocida de las mismas para orientar su posible aprovechamiento.

El presente estudio permitió contribuir al estudio de las especies aromáticas y medicinales más importantes del género *Piper*, se generó información química y biológica y se realizó una revisión de literatura a través de las bases de datos.

Se logró identificar 16 especies en 3 departamentos de Guatemala, en Suchitepéquez se encontraron 4 especies (*Piper umbellatum*, *P. oradendrum*, *P. patulum* y *P. subcitrifolium*); en Alta Verapaz se encontraron 8 especies (*P. geniculatum*, *P. jacquemontianum*, *P. obliquom*, *P. variable*, *P. phytolaccifolium*, *P. shippianum*, *P. sempervirens* y *P. hispidum*) y en Izabal 4 especies (*P. peltatum*, *P. donnell smithii*, *P. fallens* y *P. diandrum*).

Se realizó la extracción mediante percolación con diclorometano y metanol obteniéndose el mayor rendimiento en los extractos diclorometánicos para *P. shippianum* (10.59%) *P. peltatum* (9.33%) y *P. phytolaccifolium* (8.92%), y los extractos metanólicos con mayores rendimientos fueron *P. sempervirens* (17.61%), *P. phytolaccifolium* (14.05%) y *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (11.01%).

Se realizó la caracterización química de los extractos mediante ensayos macro y semimicro y cromatografía en capa fina determinándose la presencia de alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles y cumarinas, se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites mediante el método de difusión para los aceites esenciales y el método de dilución en el caso de los extractos, evidenciándose actividad del extracto de *P. fallens* (diclorometánico), *P. umbellatum* (diclorometánico y hexánico), *P. peltatum* (diclorometánico), *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metabólico) y *P. phytolaccifolium* (diclorometánico) contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*. Los extractos diclorometánico de *P. fallens* y *P. jacquemontianum*, presentaron un CIM de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*, *P. variable* y *P. phytolaccifolium* presentaron un CIM de 1 mg/mL. Se determinó la actividad de Los aceites esenciales los cuales presentaron una actividad intermedia contra los microorganismos evaluados con un halo de inhibición de 6-9 mm. Ninguno de los extractos presentó

citotoxicidad contra *A. salina*, ni actividad insecticida contra *A. albimanus* y *A. aegypti* por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL. Se identificaron los constituyentes de los aceites esenciales mediante cooperación internacional obteniéndose el mayor rendimiento en *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (2.24%) y Laguna Lachúa (0.77%), *P. peltatum* (1.32%) y *P. variable* (0.72%). En el análisis del aceite esencial se observó que *P. phytolaccifolium* fue la especie que presentó mayor número de constituyentes (42), entre los cuales se identificaron germacrano D 18%, β -cariofileno 16% γ -muuroloeno 5.8%; *P. umbellatum* (39), presentó como mayoritarios *E*-nerolidol 23.4%, germacrano D 17.4%, β -cariofileno 8.5% y *P. variable* (36), el cual presentó alcanfor 28.4%, canfeno 16.6%, limoneno 13.9% y *P. jacquemontianum* que presentó linalool 69.4% como mayoritario un constituyentes interesante en la industria de perfumería.

II. INTRODUCCIÓN

Existen innumerables especies vegetales con propiedades aromáticas (Kajiwara y col., 1993; Rodríguez Avalos y Rodríguez, 1991), algunas familias botánicas son tradicionalmente fuentes de productos aromáticos, como las Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas y Asteráceas. Según distintos autores, el número aproximado de especies con esencia es de unas 3000, de las cuales se comercializan solamente unas 250.

El universo de las plantas aromáticas es muchísimo mayor, si se considera su origen biológico y su significación comercial. La variabilidad genética de las plantas es una de sus más valiosas virtudes, al aportar una casi infinita riqueza de posibilidades. A esta variabilidad deben sumarse factores ecológicos, culturales, metodológicos agrícolas e industriales.

Se estima que aproximadamente el 65% del mercado de esencias proviene de especies cultivadas, el 1% de especies silvestres y el 33% de árboles, mayormente explotaciones forestales. Estos valores son altamente significativos, pues demuestran la necesidad de la industria de disponer de productos en cantidad y calidad homogénea, algo muy difícil de lograr a través de una explotación de material silvestre.

La familia *Piperaceae* comprende 14 géneros y aproximadamente 700 especies, que están distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. De esta, las especies del género *Piper* suelen ser ricas en aceites esenciales, los cuales tienen diferentes aplicaciones, como repelente de insectos, larvicida y antimicrobiano entre otros.

En Guatemala se describen aproximadamente 88 especies de *Piper* distribuidas en diferentes regiones del país, de las cuales se encuentra muy poca información química y farmacológica, por lo cual surge la

necesidad de contribuir al estudio de este género, evaluando su composición química y determinando la actividad biocida de las mismas para orientar su posible aprovechamiento.

III. ANTECEDENTES

Las plantas aromáticas han sido utilizadas, durante siglos, en culinaria, perfumería y como medicamentos. Las plantas aromáticas son usadas directamente en culinaria, en su forma de plantas secas, especias y condimentos. En los productos de higiene y tocador, como componentes de formulaciones, o como materia prima para el aislamiento o semisíntesis de compuestos aromáticos de interés. En la industria de alimentos, como agentes saborizantes y antioxidantes. En medicina humana y veterinaria, como componentes de formulaciones farmacéuticas. En agricultura, como pesticidas y repelentes de insectos y como agentes antibacterianos y antifúngicos. Con el fin de orientar la búsqueda de nuevos materiales aromáticos hacia las especies más adecuadas para dicho fin, conviene clasificar a las plantas en cuatro categorías:

1. Especies cultivadas y aprovechadas por sus características aromáticas: Son las que representan actualmente el mayor porcentaje del mercado internacional de productos aromáticos de origen natural. Como elementos novedosos en esta categoría, podrían encontrarse clones de especies conocidas con mejores calidades de esencia o mejoras en el manejo agronómico o postcosecha, logrando mayores rendimientos.
2. Especies cultivadas pero no aprovechadas por sus propiedades aromáticas: Muchas especies maderables cultivadas contienen aceites esenciales pero son utilizadas solamente para otros fines, por su madera, su fibra, sus frutos, como sombra o protectores de vientos. Muchos campos utilizan especies como los *Eucalyptus*, Coníferas, *Acacia*, *Schinus*, y otras especies para delimitar potreros, o proteger cultivos de los vientos, pero también estas plantas podrían ser utilizadas para la producción de esencias. Otras especies de gran consumo en otras actividades, pueden ser productoras de materiales aromáticos, como los extractos, resinoides o absolutos.
3. Especies silvestres (es decir no cultivadas) aprovechadas: Se incluyen todas aquellas especies aromáticas silvestres que son utilizadas con fines industriales. Estas especies, al ser explotadas y no ser cultivadas, suelen estar amenazadas en su conservación. Solamente se justifica la permanencia de una especie en este rubro si su población natural existente es suficientemente abundante como para permitir el manejo sustentable de su explotación, por su fácil o rápida reproducción, gran dispersión geográfica, o una política regional aplicada para su conservación. Aunque por definición son especies ya explotadas, el hecho de pertenecer a poblaciones naturales permite suponer que presentan una variabilidad genética más

o menos importante, según el caso. Del estudio de esta biodiversidad intraespecífica pueden surgir valiosas calidades económicamente competitivas con respecto a la calidad habitual.

4. Especies silvestres no aprovechadas: Se pueden diferenciar entre las autóctonas de una región y las introducidas. Las especies autóctonas son las típicas de una región, mientras que las aclimatadas o introducidas son propias de otras regiones pero que se han adecuado al nuevo ambiente. En este ítem es donde prioritariamente más se debiera orientar la búsqueda de nuevos productos, porque es muy probable que se obtengan verdaderas novedades para la industria. Todos los países latinoamericanos tienen por tradición de uso o por conocimiento científico un sinnúmero de especies silvestres con reconocidas propiedades aromáticas. Por otro lado, dentro de la flora autóctona, se posee una riquísima variedad de especies aún por conocer, y donde seguramente se podrán encontrar diversas novedades aromáticas (Bandoni, 2000).

Modelo para la selección de plantas aromáticas y medicinales:

Se ha propuesto un modelo de gestión que orienta al analista sobre cuáles deben ser los pasos a seguir para identificar a las especies más promisorias para un desarrollo industrial a partir de su calidad aromática. Con este objetivo se proponen cinco protocolos de trabajo (Bandoni, 2000):

El primero de ellos describe las pautas mínimas a considerar para la caracterización de una especie aromática industrialmente viable. Cada elemento descriptor o parámetro se define con un valor finito, que pondera la importancia de dicho descriptor en la valoración total de la planta. La suma de estas ponderaciones da un número que, sobre un máximo posible de 44 puntos, permite interpretar qué grado de interés puede tener dicha planta a nivel industrial. Cuanto mayor sea el valor, mayor el interés que puede tener dicha especie. Esta puede ser una primera aproximación para el desarrollo de un nuevo producto aromático de origen vegetal. Los parámetros que se han considerado en este esquema de trabajo son los siguientes:

a) Criterios etnobotánicos: Existen dos fuentes de información que son imprescindibles para reconocer la trascendencia que pueda tener una planta aromática en la cultura de una región. Estas fuentes son el conocimiento popular y las publicaciones donde haya sido catalogada esta información. El uso común o el conocimiento popular de una especie por sus características aromáticas, es una señal clara de la relevancia que pueda tener su estudio. Más aún, la simple lectura de publicaciones científicas sobre las floras de la región, dan ejemplos típicos de especies aromáticas de indiscutible interés. Si una especie no ha sido nunca citada ni es conocida por sus características aromáticas, es mucho menos probable que sea interesante estudiarla.

b) Criterios botánicos y ecológicos: En este rubro hay muchas variables que deben considerarse. Es importante saber si la especie proviene de una familia reconocida como osmótica, como es el caso de las Labiadas, o las Verbenáceas. Lo mismo ocurre a nivel de género, pero con una mayor significancia: si hay dentro del género especies aromáticas, la especie desconocida también muy probablemente lo sea, como consecuencia de una más estrecha relación taxonómica. Otro aspecto importante a considerar es el tamaño de la población considerada y la facilidad de acceso a la misma. No es lo mismo estudiar una especie que crece en una sola zona de un país, o solamente a más de 3.000 metros de altitud, que otra que está difundida en toda América. Resulta fundamental conocer también la experiencia que se tenga sobre la domesticación o cultivo de la especie, el porte de la planta, cuál es la parte útil (el uso de las partes reproductivas o subterráneas puede complicar el procesamiento agrícola e industrial, o amenazar la conservación de una especie silvestre) y la velocidad de crecimiento.

c) Criterios fitoquímicos: Si se tienen antecedentes sobre el estudio de los componentes aromáticos de una especie, aunque sean precarios o insuficientes, pueden acelerar u orientar el trabajo. Dentro de estos antecedentes son fundamentales los que hayan evaluado las características organolépticas y los que hayan evaluado la variabilidad genética del material. Un factor trascendente es el rendimiento en el producto aromático.

d) Olor: Por ser la variable que otorga el valor comercial al producto, su ponderación debe tener casi el mismo peso que cualquiera de los otros criterios.

Los restantes protocolos son usados en la evaluación inicial de la especie seleccionada.

El segundo protocolo trata de identificar con precisión la muestra a estudiar, y detalla los principales parámetros que pueden tener influencia en la calidad de un material a analizar, describiendo los siguientes puntos: identificación botánica precisa del vegetal, incluyendo el nombre del botánico que realizó la identificación y la ubicación del ejemplar de herbario que lo certifica, parte de la planta utilizada, lugar (longitud, latitud y altitud), fecha y hora de recolección, tipo de suelo y clima del lugar, descripción del hábitat, un análisis aunque sea somero de la población donde se obtiene el material, características fenotípicas y estado fenológico de la planta en el momento de la cosecha.

El tercer protocolo se refiere al proceso de extracción de la muestra. Ya identificado el material por el protocolo anterior, se procede a dejar constancia del tratamiento con que es sometida dicha muestra, desde el tipo y condiciones de secado, hasta los parámetros físicos elementales del aceite esencial obtenido. El último ítem incluido, la densidad aparente del material vegetal en las condiciones de extracción, resulta muy útil para dimensionar un destilador a escala de producción. También se describe

en este protocolo las condiciones de envasado y almacenamiento de las muestras de aceites esenciales obtenidos, con el fin de lograr una aceptable estabilidad del producto.

El cuarto protocolo permite registrar el análisis químico del producto aromático obtenido, y el quinto su evaluación organoléptica. Para esta última tarea se consideran cuatro factores primordiales: en primer lugar la descripción tácita de las principales características organolépticas de la muestra (notas de salida o cabeza, notas centrales y de fondo, fuerza y persistencia). Con estos elementos ya se puede dar una evaluación básica sobre el producto, clasificándolo como, sin valor comercial, de escaso valor, interesante, muy interesante o excepcionalmente interesante. En segundo lugar, y teniendo en cuenta la descripción anterior, se propone una escala arbitraria de precios, para que el evaluador pueda estimar qué valor máximo podría tener el producto como para que se justifique su comercialización, si solamente lo ha considerado de escaso valor. Por supuesto que los productos clasificados como muy interesantes o excepcionalmente interesantes seguirán siéndolo aún con valores altos de comercialización. El tercer factor que es necesario documentar en la apreciación organoléptica es si el evaluador considera que usaría este producto y para qué lo usaría. Y finalmente, como último criterio de estimación, se le pregunta al evaluador si considera que el producto merece ser estudiado con mayor detalle para su aprovechamiento industrial, y con qué condicionantes, si los hubiera.

Estos cinco protocolos constituyen un registro básico para la identificación, caracterización y evaluación de un aceite esencial, y documentan sus propiedades y sus posibilidades comerciales.

Familia *Piperaceae*:

Reino Plantae

Filo Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Piperales

Presenta 10 géneros, aprox. 1400-2000 especies, la gran mayoría pertenecen a dos géneros, los más importantes *Piper* y *Peperomia*. Su distribución generalmente es en regiones tropicales y subtropicales.

Hábito: Hierbas (*Peperomia*) o pequeños arbustos aromáticos (*Piper*), menos a menudo arbustos o árboles, algunas veces lianas o epífitos. Hojas alternas, rara vez opuestas o verticiladas, con epidermis a menudo más o menos silicificada. Flores en espigas densas, con brácteas peltadas, sin perianto Androceo 1-10 estambres, anteras bisporangiadas, monotécicas (*Peperomia*) o tetrasporangiadas y ditécicas (*Piper*), dehiscencia longitudinal: polen anasulcado o inaperturado. Gineceo con varios carpelos o

unilocular, con 1-4 estigmas cortos, en *Piper* 3-4 carpelos, en *Peperomia* 1 sólo carpelo; primordios seminales ortótopos, solitarios.

Descripción Botánica del género *Piper*:

Arbustos o sufrútices terrestres, en ocasiones hemiepífitos, lianescentes o trepadores, bejucos o raras veces árboles pequeños; tallos solitarios o con frecuencia plantas cespitosas, vástagos a menudo heterofilos, los ejes monopódicos con hojas simétricas, basalmente equiláteras, a menudo de mayor tamaño que aquellas en los ejes simpódicos, éstas asimétricas y basalmente inequiláteras, nudos prominentes. Profilos a menudo prominentes y persistentes en ejes simpódicos, discretos y caducos tempranamente en ejes monopódicos. Hojas alternas, enteras pero a menudo lobuladas basalmente, palmatinervias o pinnatinervias, con frecuencia la morfología foliar puede variar drásticamente en una misma planta y las hojas de los tallos monopódicos tienden a ser simétricas y basalmente equiláteras mientras que las hojas de los tallos simpódicos (florigenos) tienden a ser asimétricas y basalmente inequiláteras; pecíolos cortos a largos, con márgenes a menudo muy desarrollados y estipulares en apariencia. Inflorescencias terminales, opuestas y solitarias, raramente (por reducción del número de articulaciones o partes de la articulación en ejes simpódicos) axilares, y entonces (en nuestro material) en grupos de espigas sobre un eje común ramificado simulando umbelas o panículas, raquis de la espiga a menudo fimbriado, las flores con frecuencia formando bandas alrededor de la espiga, brácteas florales, cuculadas o triangulares distalmente en forma de U o V, glabras, a veces marginalmente fimbriadas, flores sésiles o pediceladas; estambres 2–4 (–8), los filamentos a menudo persistentes en el fruto, anteras ditecas, con dehiscencia vertical, oblicua u horizontal; pistilo 3–4-carpelar con igual número de estigmas, sésiles o sobre un estilo prominente. Fruto al madurar ligeramente distorsionado por compresión de los frutos adyacentes, basalmente fijado o parcialmente inmerso en el caquis (Stevens, *et al.*, 2001).

Especies del género *Piper* promisorias en Latinoamérica:

El género *Piper* contiene aproximadamente unas 1500 especies, con cerca de 1000 en América tropical; las especies de este género son a menudo elementos conspicuos del sotobosque, alcanzando su mayor diversidad en bosques húmedos premontanos y de tierras bajas. *Piper* es utilizado localmente como antídoto contra mordeduras de serpientes y así mismo como remedio eficaz en el tratamiento de cálculos renales y afecciones bronquiales. Muchas especies se conocen con el nombre de "Cordoncillo" (Stevens, *et al.*, 2001).

El género *Piper* comprende un elevado número de especies, tiene interés por su amplia utilización en la medicina tradicional de varios países, dichas especies presentan una gran complejidad tanto desde el punto de vista botánico como químico.

El análisis de los constituyentes volátiles de dichas especies han revelado la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y arilpropanoides que han mostrado propiedades biológicas interesantes (Parmar *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 1998). Investigaciones fitoquímicas de extractos han revelado la presencia de muchos compuestos activos tales como amidas, alcaloides, lignanos, cromononas (Ruangrungsi *et al.*, 1992; Parmar *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Alécio *et al.*, 1998; Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002).

Como ejemplo de especies aromáticas promisorias en Latinoamérica se menciona una selección de siete especies del género *Piper* (*P. auritum*, *P. aduncum*, *P. lenticellosum*, *P. divaricatum*, *P. artanthe*, *P. chiadoense*, *P. peltatum* y *P. tuberculatum*). Esta selección se tomó como factor discriminatorio el conocimiento popular de la especie como aromática, o el conocimiento específico y técnico que se dispone de sus componentes volátiles (Bandoni, 2000).

En un estudio realizado en tres Piperaceas panameñas se identificó la composición química del aceite esencial de las hojas de *Piper arboreum*, *P. jimbrikatatum* y *P. obliquum*. Los principales constituyentes de *P. arboreum* fueron 8-cadineno, α -copaeno y β -pineno; en el aceite de *P. jimbrikatatum*, β -cariofileno y monoterpenos oxigenados como linalol y acetato de linalilo, en *P. obliquum* se identificó β -cariofileno, espatulenol y algunos sesquiterpenos no caracterizados previamente tales como 1,5-epoxisalvial-4 (14) eno y el β -selineno (Mundina *et al.*, 1997).

En un estudio etnobotánico de siete comunidades de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá realizado en Cobán Alta Verapaz, Guatemala se reporta las familias con mayor número de especies utilizadas como medicinales a las Piperaceas, dentro de ellas las más reportadas en más comunidades y por más informantes se menciona a *Piper aeruginosibaccum*, *P. amalago*, *P. tuerckheimii*, *P. cayoense*. Dentro de las plantas con usos medicinales más diversos se mencionan *P. amalago*, *P. tuerckheimii*, *P. aeruginosibaccum*, *P. variable*, *P. umbellatum* y *P. cayoense* (Cleaves, 2001).

Mercado de Plantas Aromáticas:

El mercado mundial de plantas aromáticas (ofrecidas como hierbas) se ha estimado en unas 50,000 ton/año (1994). En 1994 los principales países europeos importaron unas 13,000 ton de plantas aromáticas como hierba. El crecimiento estimado del sector es mayor a un 2% anual. No obstante no existe una demanda desabastecida, por lo que existe una competencia muy dura, sobre todo entre los países en desarrollo. Conviene tener en cuenta que muchas veces es más rentable comercializar las hierbas aromáticas como tal, que ofrecer sus esencias, aunque esto es muy variable según el país, las circunstancias, la capacidad de extracción instalada y las fluctuaciones económicas tanto locales como internacionales (Bandoni, 2000).

La demanda mundial de aceites esenciales está tradicionalmente cubierta por pocos países con una producción elevada. Entre los años 1993 y 1998 esta demanda creció a razón de un promedio de 6% anual. En algunos casos las plantas aromáticas representan el mayor valor de exportación de algunos países o regiones, y en consecuencia se instituyen como un símbolo de sus producciones agrícolas. Más del 50% de la producción mundial proviene de países en desarrollo, lo que demuestra la importancia de climas tropicales o subtropicales para estas especies, además de la necesidad de disponer de mano de obra barata, para poder competir en calidad y precio en el mercado global. Un 65% de las esencias existentes en el mercado proviene de especies cultivadas, un 1% de silvestres (2% en valores monetarios), y un 30% de árboles. Esto demuestra que, salvo muy raras excepciones, las exigencias en cuanto a cantidad y calidad que pretenden las industrias consumidoras de esencias difícilmente pueden ser logradas si no es a través de un cultivo (Bandoni, 2000).

Guatemala tiene una tradicional producción de cardamomo, te de limón y jengibre, aunque la producción de te de limón (en 1998 exportó a EEUU unas 30 ton) ha sufrido una fuerte disminución por la agresiva competencia de China con la esencia de *Litsea cubeba*. La venta externa de cardamomo y su esencia le ha significado a este país el 1% de sus exportaciones, en valores monetarios para 1998 (Banco de Guatemala, 1999).

Aceite Esencial:

Un aceite esencial o esencia se define como un grupo de sustancias volátiles generados a partir del metabolismo de un vegetal constituido generalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, que están asociados o no a otros componentes, y generan en conjunto el olor característico de dicho vegetal.

Como parte del metabolismo de una planta, las esencias abarcan una gama muy variada de constituyentes. Presentando también en su composición, ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, acetales, fenoles, glucósidos, ceras, hidrocarburos lineales, ácidos grasos, alcaloides, cumarinas, esteroides, y una cada vez más heterogénea variedad de compuestos heterocíclicos, a medida que se avanza en el conocimiento de su composición.

Esta riqueza estructural se acrecienta aún más si se considera la reconocida especificidad isomérica en toda biosíntesis natural, es decir la capacidad que tiene la naturaleza para producir estructuras químicas con una conformación espacial particular, algo mucho más complejo de lograr por síntesis químicas tradicionales. Conviene saber que así como existen esencias compuestas exclusivamente por terpenos, existen esencias que prácticamente carecen de ellos y están compuestas por derivados bencénicos, fenoles, ésteres e hidrocarburos lineales, o hasta por componentes difícilmente relacionables con las

esencias, como alcaloides (Thomas *et al.*, 1992), glucósidos y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, pirazínicos, sulfuros, aminas, etc.

Los principales métodos utilizados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas son: por destilación con agua o hidrodestilación, por arrastre con vapor, con agua y vapor (cohobación), previa maceración, sometida a una degradación térmica y por expresión (Bandoni, 2000; Sharapin, 2000).

Oleorresinas, concretos y absolutos:

El término oleorresina se utiliza para designar a los exudados naturales ricos en aceite esencial, sin embargo, es también utilizado para nombrar los extractos obtenidos mediante utilización de disolventes orgánicos en especies aromáticas, una vez que el disolvente ha sido removido completamente. Las oleorresinas de especies herbáceas contienen, además de los aceites esenciales, los aceites fijos, pigmentos, y algunos otros principios activos. La composición final es función del disolvente utilizado.

Los concretos se obtienen de plantas aromáticas frescas por extracción con disolventes apolares. Están constituidos por compuestos apolares y no contienen compuestos hidrosolubles. Tienen forma de semisólidos coloreados, libres del disolvente original. Generalmente se obtienen de flores, aunque pueden también obtenerse de hojas y de las partes aéreas de las plantas herbáceas. Los disolventes más utilizados son el hexano, el diclorometano y el éter de petróleo, que poseen un punto de ebullición inferior a 80°C. El proceso usado es la maceración, siendo realizada a temperaturas inferiores al punto de ebullición del disolvente, el cual debe evaporarse cuidadosamente. Los rendimientos se sitúan en el orden del 0.5%. El concreto resultante contiene no solamente la porción odorífera de la planta, sino también las ceras vegetales, aceites fijos y colorantes. Estos componentes no son muy solubles en las bases para perfumes, por lo que su conversión en absolutos es necesaria.

Los absolutos son productos de conversión de concretos por la extracción con etanol absoluto. Una vez completa la disolución, los absolutos se refrigeran a temperaturas de -5 a 10°C. A estas temperaturas las ceras se precipitan y pueden ser removidas por filtración. El rendimiento de concretos a partir de absolutos varía de 10 a 65% (Sharapin, 2000).

Cromatografía de Gases (CG):

Fundamento: La CG o cromatografía gas-líquido utiliza como fase móvil un gas, que suele ser nitrógeno, hidrógeno o helio, y como fase estacionaria un líquido muy viscoso retenido sobre un soporte sólido inerte. Se trata de un sistema de partición en el que los componentes de una muestra son separados por una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente, de modo que cada uno de ellos es eluído a distinta velocidad. La cromatografía de gases se utiliza principalmente para el análisis de sustancias volátiles.

La separación de los componentes depende tanto de la temperatura de trabajo como del tipo de columna y fase estacionaria utilizadas y del flujo de gas portador. A menudo, al trabajar a temperatura programada, pueden producirse pérdidas sensibles de fase estacionaria, por lo que debe seleccionarse previamente la temperatura más adecuada para evitar este inconveniente y, al mismo tiempo, conseguir una separación óptima.

Instrumental: El equipo empleado se denomina cromatógrafo de gases y consiste en: Una cámara de inyección, una columna cromatográfica (en la actualidad generalmente de tipo capilar) contenida en un horno, cuya temperatura es controlable y programable, un detector y un sistema de adquisición y tratamiento de datos. La CG puede emplearse con finalidad cualitativa y cuantitativa:

Análisis cualitativo: La identificación de los componentes de una muestra mediante CG se basa en la medida de sus tiempos de retención y comparación con los de sustancias ya conocidas. No obstante, en el caso de muestras complejas, puede ocurrir que dos o más componentes eluyan de la columna al mismo tiempo, por lo que en estos casos es indicado un doble análisis de la muestra en dos columnas de diferente polaridad. En el caso de aceites esenciales, la identificación de sus componentes únicamente a partir de sus índices de retención en distintas fases estacionarias resulta insuficiente, siendo necesaria su caracterización mediante alguna técnica espectroscópica, entre las cuales la espectrometría de masas (EM) ocupa un lugar primordial. De este modo, la cromatografía de gases acoplada a EM (CG-EM o GC-MS en inglés) constituye una herramienta imprescindible en la identificación de los componentes de los aceites esenciales.

Análisis cuantitativo: La cuantificación se realiza en base al área de los picos eluidos, que es directamente proporcional a la concentración de dicho compuesto. Ya que los detectores no siempre responden de la misma forma a todos los solutos, en ocasiones es necesaria la aplicación de factores de respuesta que relacionen el área con la concentración de los diferentes componentes de la muestra. Las determinaciones cuantitativas por CG se realizan, según cada caso particular, por los métodos habituales: normalización, patrón interno o patrón externo (Bandoni, 2000; Sharapin, 2000; Vila & Reig 2003).

Tamizaje Farmacológico y Tamizaje Fitoquímico:

El tamizaje farmacológico y el tamizaje fitoquímico constituyen etapas iniciales en la investigación sobre plantas medicinales. El tamizaje se define como un conjunto de técnicas relativamente simples y de bajo costo que permiten evaluar la posible acción farmacológica, la toxicidad y los principales grupos químicos presentes en una planta, permiten orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos en el sentido de los grupos de mayor interés o la bioactividad deseada.

Se entiende por pretamizaje a una serie de ensayos biológicos (bioensayos) generalmente *in vitro* que dan una idea preliminar de la posible bioactividad de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro. Las técnicas de pretamizaje pretenden orientar con técnicas relativamente sencillas, que no involucren animales, que tengan bajo costo y que pueda realizarse un número grande de muestras en forma rápida, sencilla, reproducible, de bajo costo y si posible, automatizable (Cáceres, 1996).

Tamizaje farmacológico: El tamizaje farmacológico de extractos de plantas busca descubrir aquellas que presentan actividad farmacológica. Debe ser cuidadosamente realizado para que sea seguro y reproducible. La cantidad del material necesaria para el tamizaje debe ser pequeña y los procedimientos deben programarse de tal manera que se pueda utilizar el material bruto, como extractos de plantas o fracciones de extractos. El tamizaje, sea general o específico, produce sólo probabilidades sobre la actividad que la muestra tendría en un ser humano enfermo.

El estudio farmacológico de las drogas tiene como finalidad:

- Establecer las acciones farmacológicas, es decir, determinar la actividad de dichas drogas sobre los organismos vivos. Pretende determinar tanto el efecto o efectos principales como los efectos secundarios.
- Determinar la estructura de las sustancias que son responsables de dichas acciones farmacológicas, establecer qué componentes de las drogas constituyen los principios activos.
- Realizar estudios de toxicidad para evaluar los posibles efectos tóxicos de las drogas que se están estudiando (Sharapin, 2000).

Antimicrobianos: La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad puede hacerse por métodos de difusión y dilución. El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistente, intermedio o susceptible para cada agente. El método de dilución se usa para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, basado principalmente en la técnica desarrollada por Mitscher *et al.* (1972), recomendado para el tamizaje de productos naturales, es reproducible, sensible y relativamente fácil de estandarizar y procesar gran cantidad de muestras. La CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible, esta prueba puede ser en caldo (tubo) y

en agar (placa). En el caso de hongos, existen técnicas similares (Brancato & Golding) que han sido puestas a punto en Guatemala y han permitido evaluar la actividad de una cantidad de especies usadas medicinalmente (Cáceres, 1996).

Tamizaje fitoquímico: El tamizaje (screening) fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico (Sharapin, 2000).

IV. JUSTIFICACIÓN

La extraordinaria biodiversidad vegetal de la región latinoamericana y especialmente la región mesoamericana y la reducida información técnica y científica existente sobre su caracterización taxonómica o composición química, indica la necesidad de realizar estudios sobre la flora nativa de la región.

El género *Piper* comprende un elevado número de especies y tiene interés por su amplia utilización en la medicina tradicional de varios países, presentando una gran complejidad tanto desde el punto de vista botánico como químico. El análisis de los constituyentes volátiles de estas especies ha revelado la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y arilpropanoides que han mostrado propiedades biológicas interesantes tales como insecticidas naturales, antimicrobianos, entre otros (Parmar *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 1998). Investigaciones fitoquímicas de los extractos han identificado la presencia de muchos compuestos activos tales como amidas, alcaloides, lignanos, cromononas (Ruangrunsi *et al.*, 1992; Parmar *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Alécio *et al.*, 1998; Navickiene *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002).

Es por ello que el estudio de estas especies constituye un recurso promisorio para el país, ya que es un género poco estudiado, se encuentran antecedentes que demuestran amplias propiedades medicinales y tienen potencial de aprovechamiento por sus aromas.

Con la presente investigación se espera dar continuidad y seguimiento al estudio sobre plantas aromáticas y medicinales y brindar apoyo a instituciones en los diferentes sectores para que puedan aplicar este conocimiento en el desarrollo de nuevos productos biológicamente activos, accesibles, seguros y efectivos. Este trabajo multidisciplinario abarca diferentes sectores (biológico, agronómico, farmacéutico, microbiológico y químico), con la finalidad que a mediano plazo la información obtenida pueda tener un

impacto real en la valoración de la biodiversidad regional mesoamericana, cuyo fin es conservar los recursos naturales y a largo plazo en la economía nacional al generar empleo rural, e industrializar productos competitivos para el mercado nacional e internacional.

V. OBJETIVOS

General:

- a) Generar información química de ocho especies del género *Piper* para validar su uso medicinal o aromático que sirva como instrumento de monitoreo para estudios de escalamiento, variabilidad y desarrollo de tecnología apropiada para la explotación sostenible de dichos recursos.

Específicos:

- a) Identificar y coleccionar ocho especies aromáticas del género *Piper* en tres departamentos de Guatemala.
- b) Extraer y determinar el rendimiento del aceite esencial de cinco especies del género *Piper*.
- c) Elaborar extractos de diferente polaridad de cinco especies del género *Piper*.
- d) Revisar la literatura sobre cada una de las especies en estudio a través de las bases de datos como NAPRALERT.
- e) Establecer contactos internacionales para elucidar la estructura química de los compuestos responsables de la bioactividad de las especies estudiadas.

VI. METODOLOGIA

6.1 Selección de las especies:

Mediante criterios etnobotánicos, agroecológicos (abundancia relativa de una especie determinada), fitoquímicos y farmacológicos propuestos en los protocolos de selección de plantas aromáticas promisorias, y distribución Mesoamericana descrita en la Flora de Guatemala, se identificaron 16 especies nativas del género *Piper* con una alta probabilidad de presentar actividad biológica significativa o un aceite esencial interesante.

6.2 Obtención y colecta del material vegetal:

La obtención y colecta del material vegetal se lleva a cabo en dos diferentes regiones del país, la zona Norte-Altiplano (Alta Verapaz, Izabal) y Sur (Suchitepéquez) realizando la colecta de poblaciones silvestres y cultivadas donde se distribuyen las especies del género *Piper*, el material fue identificado por el botánico del Herbario USCG del CECON y con apoyo de BIGU de la Escuela de Biología de la USAC. Se colectó en su mayoría una muestra representativa de 250-500 g de material vegetal por población para realizar la extracción, caracterización y evaluación de la actividad biológica.

6.3 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.

6.4 Estudio del rendimiento y caracterización de aceites esenciales:

La determinación de porcentaje de rendimiento de aceites esenciales de las especies aromáticas nativas del género *Piper* no estudiadas previamente, se realizó mediante la extracción por hidrodestilación utilizando un equipo Neoclevenger según la Farmacopea Europea (2001).

6.5 Obtención de extractos:

Del material vegetal a trabajar se obtuvieron dos extractos por percolación utilizando disolventes de diferente polaridad (diclorometano y metanol) conforme a las pruebas preliminares ya realizadas. Se pesaron de 100-200 g de material vegetal y se colocó en un percolador, al cual se le agregó el disolvente extractor y se realizó una percolación con el mismo durante un período de 5 días con recambios periódicos del disolvente hasta que la extracción fue exhaustiva. El extracto así obtenido se concentró a presión reducida a una temperatura inferior a 45°C en un evaporador rotatorio, y el extracto obtenido se colocó en una desecadora para posteriormente realizar las pruebas fitoquímicas y biológicas.

6.6 Caracterización Química:

En el caso de extractos crudos, se procedió a su caracterización (determinar su perfil químico o "huella digital") para lo cual se utilizaron las técnicas convencionales de selección Fitoquímica (tamizaje fitoquímico a escala semimicro) en combinación con técnicas de cromatografía en capa fina. Las pruebas de tamizaje químico se fundamentan en la reacción selectiva de grupos funcionales específicos con reactivos capaces de formar complejos visualizables por el desarrollo de coloraciones características, por la formación de precipitados o bandas fluorescentes. La respuesta reactiva de estándares conocidos de grupos funcionales particulares se utilizó frecuentemente como medio de comparación.

6.6.1 Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: Pesar 1 g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 % (p/v), luego añadir 25 mL de metanol a 60°C. Filtrar con papel filtro Whatman 1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: agregar 5 gotas del reactivo de Mayer. (Color blanco a crema).

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff. (Color rojo a naranja).

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner. (Color marrón).

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 1 g 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 de María a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60 F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 % en metanol (10 µL).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10); acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), cloroformo-dietilamina (90:10); acetona-agua-amonio concentrado (90:7:3)

Detección: Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo.

Reactivo de Dragendorff: zonas café o naranjas en vis, los colores no son estables.

6.6.2 Investigación de flavonoides y antocianinas:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol o metanol al 80 %, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 mL de metanol al 80 %, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 % (p/v).

Tubo 3: agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético.

Tubo 7: testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

Cromatografía en capa fina: Extraer 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10 µL). (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10)

Detección: Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

Solución 1: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas.

6.6.3 Investigación de antraquinonas:

Prueba de Bornträger: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80%, filtrar y concentrar en baño de maría (60°C). Disolver el residuo con 30 mL de agua destilada y filtrar. Extraer con 10 mL de benceno. A la fase bencénica añadir 5 mL de solución de prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Prueba de Bortränger modificado: Calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3% y calentar 10 minutos en baño de María a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10 mL de benceno. A

la capa bencénica adicionar 5 mL de solución de prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Cromatografía en capa fina: Extraer 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño maría (60°C) por 5 minutos. Filtrar y aplicar 10 µL en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: solución al 0.1 % en metanol de antraquinonas (10 µL). (Aloína, flangulina A/B, glucofrangulina A/B y sus agliconas, reina, aloe-emodina, extracto de sen)

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10).

Detección: Sin tratamiento químico: UV 254 nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%.

Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365 nm.

Antronas y antranolas: zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm.

6.6.4 Investigación de cumarinas:

Ensayos macro y semimicro: Medir 5 mL de extracto vegetal metanólico. Agregar 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N. Observar bajo luz ultravioleta de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal adicionar 10 mL de metanol y calentar 30 minutos en baño de maría. Filtrar y evaporar hasta 1 mL. Aplicar 20 µL en una cromatoplaque de sílica gel 60 F₂₅₄. Utilizar como estándar canela en metanol al 1 %, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7); tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 mL de tolueno y 50 mL de éter son mezclados durante 5 min con 50 mL de ácido acético al 10%, se filtra y se descarta la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter es usada).

Detección: Sin tratamiento químico UV 254 nm fluorescencia. UV 365 nm todas las cumarinas muestras una intensa fluorescencia azul o verde- azul.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%. UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

6.6.5 Investigación de cardenólicos y bufadienólicos:

Presencia de lactonas insaturadas: Extraer 10 g de material vegetal con 30 mL de etanol o metanol al 80% y filtrar. Colocar tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 mL) sobre un papel filtro. Secar y agregar unas

gotas del reactivo Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80%.

Presencia de azúcares 2-desoxigenadas: Evaporar 10 mL del extracto etanólico o metanólico, eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Secar el residuo y agregar 3 mL de reactivo Keller-Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2 mL de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. Observar la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo).

Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal agregar 20 mL de etanol al 50% y mantener en reflujo durante 15 minutos. Dejar enfriar y filtrar, el filtrado se trata con ácido acético glacial. Extraer en 3 porciones de 15 mL de diclorometano. Los extractos se filtran sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporan. Disolver con 1 mL de diclorometano/etanol (1:1) y aplicar 30-50 μ L en la cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar digoxina 5 mg/2 mL de metanol (20 μ L), lanatósido, A,B,C; oleandrin, k-strophantin.

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8), acetato de etilo-metanol-etanol-agua (81:11:4:8).

Detección:

Sin tratamiento químico: Fluorescencia por cardenólidos en UV-265 nm, la mayor fluorescencia es por los bufadienólidos. Los glicósidos cardíacos no fluorescen en UV-365 nm.

Detección del anillo lactónico de los cardenólidos: reactivo de Kedde, zonas rosa o azul violeta en vis, los bufadienólidos no reaccionan.

Reactivo de Kedde: 5 mL de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 3% en etanol, mezclado con 5 mL de NaOH 2M.

6.6.6 Investigación de esteroides o triterpenoides:

Reacciones de color:

Liebermann Burchard: Aplicar unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en la que las saponinas triterpenoidales dan color rosado o púrpura.

Resultados (verde, azul verdoso) posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.

Ácido tricloroacético: Se le añade a la muestra unos cristales de ácido tricloroacético.

Resultado: color naranja, rojo, rojo oscuro, triterpenos tetracíclicos y esteroides desarrollan color a 60°C, triterpenos pentacíclicos a 110°C.

Carr-Price: 1 mg de muestra en cloroformo se le agrega 2 mL de tricloruro de antimonio al 30% en cloroformo.

Resultado: color azul, posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.

6.6.7 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 se le adiciona 10 mL de agua destilada. Calentar en baño de maría (60°C) durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 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 persiste 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 µL en una cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 µL).

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

Detección: Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

(Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides).

(Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas). (Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas).

6.6.8 Investigación de principios amargos:

Cromatografía en capa fina: Calentar 1 g de material vegetal con 10 mL de metanol en baño de maría a 60°C por 10 minutos. Evaporar y filtrar a 2 mL. Aplicar en la cromatoplaque. Estándar: artemisina al 1 % en metanol (20 µL).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo-metanol (95:5).

Detección: vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafés-rojas, azules-verdes.

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

6.6.9 Investigación de taninos:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 %, filtrar y evaporar a sequedad. Añadir 25 mL de agua caliente al residuo y agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10 % y filtrar. Adicionar 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1% (p/v).

Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1% de gelatina y cloruro de sodio al 10%).

Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 % (p/v).

Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración.

Con cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol; negro-azulado: pirogalol)

6.6.10 Investigación de glicósidos cianogénicos:

Prueba de Guignard: Colocar 2 a 5 g de material vegetal pulverizado en un erlenmeyer de 125 mL y humedecer con agua; adicionar 1 mL de cloroformo. Aparte, introducir una tira de papel Whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente secar. La tira de papel húmedo insertarla en el erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar a una distancia de 1 cm de la muestra. Doblar el papel y tapar el erlenmeyer con un corcho. Calentar en baño de maría a 37°C durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo-café).

6.6.11 Investigación de aceites volátiles:

Cromatografía en capa fina:

Método A: Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano agitando por 15 minutos. Filtrar y evaporar en baño maría (60°C) a sequedad.

Disolver en 1 mL de tolueno y aplicar 20-50 µL en cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄.

Método B: Pesar 10-50 g (dependiendo del tipo de droga) de material vegetal y destilar con arrastre de vapor por 1 hora. Recolectar el aceite esencial en xileno. Diluir la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y aplicar 5 µL (1:10) en cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3 μ L).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, vanillina-ácido sulfúrico. Zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

6.6.12 Investigación de esteroides insaturados:

Ensayo macro y semimicro: Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 %. Filtrar y concentrar a sequedad. Remover pigmentos vegetales con porciones de 10 mL de éter de petróleo hasta que el éter salga incoloro. Adicionar 10 mL de benceno y agitar durante unos minutos. Decantar en un tubo y secar con sulfato de sodio anhidro. Filtrar y evaporar a sequedad. Agregar 10 mL de cloroformo, secar con sulfato de sodio anhidro, filtrar y dividir el filtrado en 3 tubos:

Tubo 1: Agregar 3 gotas de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (Liebermann-Buchard).

Tubo 2: Ensayo de anillo agregar ácido sulfúrico concentrado (Prueba de Salkowski).

Tubo 3: Testigo.

Usar como estándar una solución de colesterol en cloroformo 0.1%. Observar cambios de colores inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un período de una hora.

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

6.6.13 Investigación de sesquiterpenlactonas:

Prueba de Legal: 1-2 mg de muestra en agua o etanol se le agrega 1 mL de solución fresca de nitroprusiato de sodio 0.5% en agua y 1-4 gotas de KOH 2N. Se presenta colores característicos rojo oscuro, para lactonas α y β insaturada.

Prueba de Baljet:

Preparación de reactivo:

a) 1g de ácido pícrico en etanol al 95%.

b) 10 g de NaOH en 100 mL de agua.

Se mezcla a y b y se añade a la muestra unas gotas del reactivo, se presenta un color rojo claro a oscuro.

Cromatografía en capa fina:

Fase móvil: Cloroformo: éter etílico (5:1), cloroformo: metanol (99:1), éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo (2:2:1)

Detección: Se pueden emplear diferentes reveladores tales como: Vapores de yodo, solución acuosa de permanganato de potasio al 5%, ácido sulfúrico concentrado o al 50%, vainillina al 1% en etanol, luego del calentamiento de la placa por 5 min a 100 – 105°C aparecerán manchas verdes, amarillas, marrones, rojas o azules.

6.7 Determinación de la bioactividad:

6.7.1 Ensayo contra *Artemia salina* (camarón salino):

La *A. salina* es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son sensibles a gran variedad de sustancias, la citotoxicidad de extractos sirve para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, es una prueba útil aunque no es selectiva para ninguna molécula química.

La técnica consiste en la preparación de un medio salino adecuado, la colocación de huevos del crustáceo en dicho medio y su eclosión. Se transfiere la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con medio salino fresco. Se preparan para cada sustancia de prueba 3 niveles de dilución (1000, 500 y 250 µg) y se colocan por triplicado en 9 pozos de la microplaca, haciendo un volumen total por pozo de 100 µL de solución a ensayar. Posteriormente se agregan a cada pozo 100 µL de medio salino conteniendo de 10 a 15 nauplios y 100 µL de medio salino. Se usan 3 pozos como controles negativos los que se preparan en forma similar, utilizando como sustancia de prueba el medio de disolución de los extractos. Después de 24 horas se procede entonces a contar el número de sobrevivientes en cada dilución, del que por diferencia con el valor inicial, se calcula el número de decesos observados. La Concentración Letal Media (CL₅₀) se calcula mediante una regresión no paramétrica utilizando el programa Finney para Basic. Las larvas del crustáceo son sensibles a muchas sustancias de prueba, con lo que puede determinarse la bioactividad de las mismas. Como prueba de pretamizaje resulta idónea, principalmente en lo referente a la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, citotóxicas, antimicrobianas y/o plaguicidas.

6.7.2 Tamizaje antimicrobiano:

Se evalúa la actividad inhibitoria de un producto, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo y el espectro de inhibición. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad se hace por métodos de dilución, que sirve tanto para el tamizaje como para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano

para inhibir al microorganismo. La CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible en agar (placa), está basado en el descrito por Mitscher *et al.*

Se mide por el crecimiento de bacterias inoculadas en superficie de medios conteniendo moléculas bioactivas. El procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar que consiste en preparar cajas de Agar Muller-Hinton (AMH) con 1.0 mg/mL del extracto (AMH-E). Inocular las bacterias en caldo, incubar 24 horas a 36°C, diluir 1:100 en agua destilada estéril, inocular con estrías por cuadruplicado (error < 0.05) en la superficie de AMH-E e incubar a 36°C por 24 horas. Este procedimiento se aplica a levaduras, pero debe diluirse el inóculo 1:10 e incubar 48 horas. Se evalúa el crecimiento de bacterias (-) o su inhibición (+). Para la CIM se usan diluciones decrecientes (1, 0.5, y 0.25 mg/mL), se consideran positivos los extractos activos a concentraciones <1 mg/mL. El tamizaje debe efectuarse con las siguientes cepas de microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Cryptococcus neoformans* C 13, las cuales dan una referencia de las enfermedades que padece la población guatemalteca y que con mayor frecuencia se presentan en las estadísticas, tanto del Hospital Nacional San Juan de Dios como el Hospital Nacional Roosevelt, y el Hospital Nacional de Malacatán. Existen un sin número de bacterias que actúan sobre la población pero debido a su patogenicidad, condiciones de crecimiento y que no se cuentan con las instalaciones de bioseguridad adecuadas para manipular dichas bacterias se ha optado por utilizar las bacterias que anteriormente se describieron, las cuales presentan menor grado de patogenicidad, además la mayoría de cepas utilizadas tienen certificado tipo ATCC reconocidas mundialmente como cepas puras las cuales cuentan con el aval de la CDC de los Estados Unidos en Atlanta (Laboratorio de Control de Enfermedades de los Estados Unidos) y de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en la Universidad de San Carlos de Guatemala, para su mayor referencia y que reflejan, de acuerdo a los extractos a estudiar, las mismas condiciones de inhibición que una bacteria patógena que para fines de estudio son las más adecuadas en este tipo de investigación.

Bacteria o levadura	ATCC	Característica
<i>Escherichia coli</i>	25922	Gram negativo patología asociada: contaminación, diarreas
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Gram positivo patología asociada: contaminación es oportunista y se encuentra en la piel, lácteos.
<i>Salmonella typhi</i>	14028	Gram negativo patología asociada: contaminación vegetales, fiebre tifoidea.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Gram negativo patología asociada: contaminación en hospitales en especial operaciones postoperatorias y ambientes oportunistas, muy resistente a desinfectantes considerada como bacteria fastidiosa.
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	Bacteria alcohol ácido resistente, comensal o

		patógena para el hombre pero es muy utilizada en el laboratorio como referencia para la <i>M. tuberculosis</i> responsable de la tuberculosis.
<i>Bacillus subtilis</i>	----	Gram negativo, es comensal no patógena para el hombre pero se utiliza de referencia para <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> .
<i>Candida albicans</i> (lev.)	----	Levadura causante en mujeres de la vaginitis y es oportunista en especial pacientes con diabetes.
<i>Cryptococcus neoformans</i> (lev.)	----	Levadura se encuentra en las heces de los pájaros afecta a pacientes con VIH/SIDA.

6.7.3 Tamizaje antifúngico:

Los procedimientos son similares a los antibacterianos. El crecimiento de hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar.

La actividad antifúngica se evalúa por el crecimiento en medios conteniendo moléculas bioactivas; el procedimiento se basa en el descrito por Brancato & Golding modificado por MacRae *et al.* y adaptado para productos naturales. Consiste en purificar los hongos en Mycosel, inocular en medio de esporulación (Takashio), incubar a 25°C por 21 días, colectar las esporas, contarlas, estandarizar suspensiones de 1×10^5 esporas/mL y guardar a 4°C. Preparar cajas de agar Sabouraud con 1.0 mg/mL del extracto o fracción; perforar cuatro agujeros de 8 mm de diámetro, inocular 30 μ L de la suspensión de esporas e incubar, en el caso de *Aspergillus flavus* 24-48 horas y de *Trichophyton rubrum* 21 días. Para la CIM se usa el mismo procedimiento con concentraciones decrecientes. Medir el diámetro (D) del halo de crecimiento en mm y comparar con el control negativo con la fórmula: $\% = Dm/Dc \times 100$. Si el % de inhibición es $>75\%$ el extracto es activo (+), si es $<25\%$ es inactivo (-).

Actividad insecticida:

Consiste en evaluar la actividad de los extractos vegetales para matar larvas de insectos de importancia médica en un medio micrométrico líquido, en este estudio de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

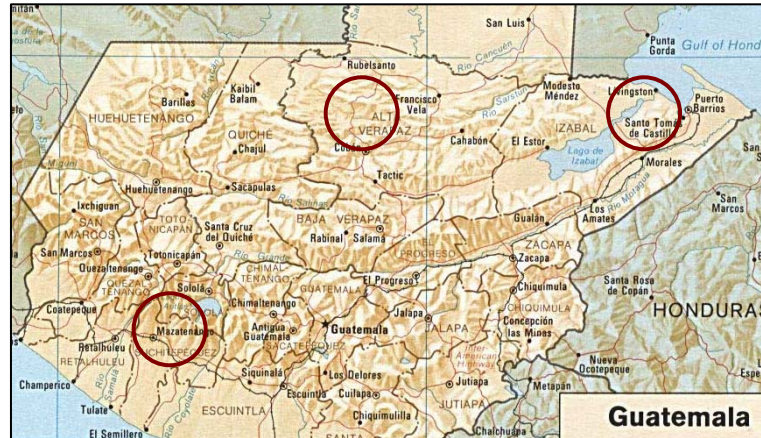
7.1 De campo:

Durante el período comprendido entre febrero y agosto de 2006 se realizaron las colectas del material vegetal y la identificación botánica de las especies, se visitaron cuatro regiones para el muestreo las cuales fueron los siguientes:

- Ecoparcela “El Cacaotal” en Samayac, Suchitepéquez

- Parque Ecológico Laguna Lachúa en Cobán, Alta Verapaz
- Parque Ecológico Cerro San Gil, municipio Livingston, departamento de Izabal y
- Aldea Pozo Seco, municipio Chisec, Alta Verapaz

Figura No. 1



En total se colectaron 18 especímenes del género *Piper* y se identificaron 16 especies, de las cuales 12 son nativas de la región. La determinación botánica se realizó en los herbarios del Laboratorio Farmaya y en el herbario del CECON, además, también se consultó las páginas web del Missouri Botanical Garden, Chicago Field Museum, New York Botanical Garden y del Instituto Smithsonian para estar actualizado con el nombre científico de las *Piper* determinadas. Si bien el proyecto contemplaba identificar 8 especies, se aprovechó la gran diversidad encontrada por lo que se colectaron las otras especies encontradas.

Cuadro. 1
Especies identificadas

Suchitepéquez	Alta Verapaz	Izabal
<i>Piper umbellatum</i>	<i>P. geniculatum</i>	<i>P. peltatum</i>
<i>P. oradendrum</i>	<i>P. jacquemontianum</i>	<i>P. donnell smithii</i>
<i>P. patulum</i>	<i>P. obliquom</i>	<i>P. fallens</i>
<i>P. subcitrifolium</i>	<i>P. variabile</i>	<i>P. diandrum</i>
	<i>P. phytolaccifolium</i>	
	<i>P. shippianum</i>	
	<i>P. sempervirens</i>	
	<i>P. hispidum</i>	

7.2 Extracción de aceites y obtención de extractos:

Se realizó la extracción del aceite esencial de las hojas de las diferentes especies, mediante hidrodestilación utilizando un equipo Neocleavenger y se obtuvieron los rendimientos en cada una de ellas, presentando mayor rendimiento *P. Jacquemontianum*, de la cual se evaluaron dos procedencias la del Cerro San Gil (2.24%) y la de Laguna Lachúa (0.77%), así como *P. peltatum* (1.32%) y *P. variable* (0.72%).

Se hicieron extractos por percolación utilizando como disolventes diclorometano y metanol, se observó el mayor rendimiento utilizando diclorometano para *P. shippianum* (10.59%), *P. peltatum* (9.33%) y *P. phytolaccifolium* (8.92%), y con metanol los mayores rendimientos fueron para *P. sempervirens* (17.61%), *P. phytolaccifolium* (14.05%) y *P. Jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (11.01%). Si bien el objetivo era realizar extractos utilizando las hojas, por la abundancia de tallos en algunas especies, se aprovechó para realizar una extracción del aceite y elaborar extractos de los tallos de *P. Jacquemontianum* y *P. umbellatum*, presentando el mayor rendimiento en aceite *P. Jacquemontianum* (1.27%) y el extracto diclorometánico (2.52%) y *P. umbellatum* presentó el mayor rendimiento del extracto metanólico (7.95%).

Cuadro No. 2
Rendimiento de aceites y extractos

Especies (Hojas)	Rendimiento de Aceite esencial		Rendimiento de extracto diclorometánico		Rendimiento de extracto metanólico		Humedad (%)
	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)	
<i>P. umbellatum</i>	0.1396	0.3259	14.22	7.90	16.53	9.18	11.02
<i>P. oradendrum</i>	0.2314	0.5902	8.90	4.94	10.84	6.02	10.30
<i>P. geniculatum</i>	0.1386	0.3465	3.64	6.52	4.79	8.58	8.69
<i>P. Jacquemontianum</i> (1)	0.4053	0.7795	9.85	5.47	12.48	6.93	9.85
<i>P. Jacquemontianum</i> (2)	0.9494	2.240	9.76	8.13	13.22	11.01	Nd
<i>P. peltatum</i>	0.6004	1.3205	16.80	9.33	7.16	3.98	9.70
<i>P. Donnell Smithii</i>	0.3092	0.7458	14.82	8.23	15.71	8.73	9.54
<i>P. fallens</i>	0.0748	0.1496	2.99	1.67	13.64	7.58	10.47
<i>P. obliquom</i>	0.0474	0.1185	1.13	2.53	1.24	2.75	11.27
<i>P. variable</i>	0.4401	0.7219	3.02	6.72	3.86	8.57	10.13
<i>P. phytolaccifolium</i>	0.1103	0.2758	7.63	8.92	12.02	14.05	9.69
<i>P. shippianum</i>	0.2139	0.4754	8.47	10.59	2.53	3.16	8.76
<i>P. sempervirens</i>	0.1095	0.2738	7.60	7.60	17.61	17.61	12.83
<i>P. Jacquemontianum</i> tallo	0.625	1.267	2.52	2.52	2.19	2.19	Nd
<i>P. umbellatum</i> tallo	0.0911	0.1513	2.76	2.32	9.46	7.95	Nd

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil. Nd: No determinada

7.3 Evaluación de la actividad biológica:

Se realizó el tamizaje antibacteriano de la primera colecta de especies para evaluar la actividad biológica presentando actividad *P. fallens* (diclorometánico), *P. umbellatum* (diclorometánico y hexánico), *P. peltatum* (diclorometánico), *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metabólico) y *P. phytolaccifolium* (diclorometánico) los cuales inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*.

Cuadro No. 3
Actividad antimicrobiana de 7 especies

Especies	Extracto	A	B	C	D	E	F
<i>P. fallens</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+
<i>P. fallens</i>	Diclorometano	-	-	+	+	+	+
<i>P. umbellatum</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+
<i>P. umbellatum</i>	Diclorometano	-	-	+	+	+	+
<i>P. umbellatum</i>	Hexano	-	-	+	+	+	+
<i>P. donnell smithii</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+
<i>P. donnell smithii</i>	Diclorometano	+	+	+	+	+	+
<i>P. peltatum</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+
<i>P. peltatum</i>	Diclorometano	-	-	+	+	+	+
<i>P. oradendron</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+
<i>P. oradendron</i>	Diclorometano	+	+	+	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	Metanol	-	-	+	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	Diclorometano	-	-	+	+	+	+
<i>P. phytolaccifolium</i>	Diclorometano	-	-	+	+	-	+

A. *Bacillus subtilis*, B. *Mycobacterium smegmatis*, C. *Escherichia coli*, D. *Staphylococcus aureus*, E. *Pseudomonas aeruginosa*, F. *Salmonella typhi*.

(1) Procedencia Laguna Lachúa.

(+) Presentó crecimiento.

(-) Inhibición del crecimiento.

Se realizó el tamizaje de la segunda colecta de especies, contra bacterias y levaduras los cuales presentaron actividad el extracto diclorometánico y metanólico de *P. sempervirens* contra *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *C. neoformans* y *C. albicans*; el extracto diclorometánico de *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil contra *B. subtilis*, *M. smegmatis* y *C. neoformans*; el extracto diclorometánico y metanólico del tallo de *P. jacquemontianum* presentó actividad contra *C. neoformans*; el extracto diclorometánico de *P. variable* contra *B. subtilis*, *M. smegmatis* y *C. neoformans*; el extracto diclorometánico de *P. phytolaccifolium* contra *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa* y *C. neoformans*; y el extracto diclorometánico de *P. geniculatum* contra *C. neoformans*.

Cuadro No. 4
Tamizaje de la actividad antimicrobiana de 8 especies

Especies	Extractos	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>P. sempervirens</i>	Metanol	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>P. sempervirens</i>	Diclorometano	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>P. schippianum</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. schippianum</i>	Diclorometano	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. Jacquemuntianum</i> (2)	Metanol	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. Jacquemuntianum</i> (2)	Diclorometano	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>P. Jacquemuntianum</i>	Metanol Tallo	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. Jacquemuntianum</i>	Diclorometano Tallo	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. umbellatum</i>	Metanol Tallo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. hispidium</i>	Etanol hoja	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. phytolaccifolium</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. phytolaccifolium</i>	Diclorometano	-	-	+	+	-	±	-	+
<i>P. geniculatum</i>	Metanol	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. geniculatum</i>	Diclorometano	+	+	+	+	+	+	-	+

A. *B. subtilis*, B. *M. smegmatis*, C. *E. coli*, D. *S. aureus*, E. *P. aeruginosa*, F. *S. typhi*, G.C. *neoformans*, H. *C. albicans*

(2) Procedencia Cerro San Gil

(+) Presentó crecimiento.

(-) Inhibición del crecimiento.

7.3.1 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CIM):

Se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especies que presentaron actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados, los extractos diclorometánico de *P. fallens* y *P. Jacquemontianum*, presentaron un CIM de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis* y *P. variable* y *P. phytolaccifolium* presentaron un CIM de 1 mg/mL.

Cuadro No. 5
Concentración mínima inhibitoria

Especies	Extractos	Bacterias	Diluciones		
			1.0 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml
<i>P. fallens</i>	Diclorometano	<i>B. subtilis</i>	-	-	+
		<i>M. smegmatis</i>	-	-	+
<i>P. Jacquemontianum</i>	Diclorometano	<i>B. subtilis</i>	-	-	+
		<i>M. smegmatis</i>	-	-	+

<i>P. jacquemontianum</i>	Metanol	<i>B. subtilis</i> <i>M. smegmatis</i>	+ +	+ +	+ +
<i>P. peltatum</i>	Metanol	<i>B. subtilis</i> <i>M. smegmatis</i>	+ +	+ +	+ +
<i>P. fallens aceite esencial</i>	Metanol	<i>B. subtilis</i> <i>M. smegmatis</i>	+ +	+ +	+ +
<i>P. variable</i>	Diclorometano	<i>B. subtilis</i> <i>M. smegmatis</i>	- -	+ +	+ +
<i>P. variable</i>	Metanol	<i>B. subtilis</i> <i>M. smegmatis</i>	+ +	+ +	+ +
<i>P. phytolaccifolium</i>	Diclorometano	<i>B. subtilis</i> <i>M. smegmatis</i>	- -	± ±	+ +

(+) Presentó crecimiento.

(-) Inhibición del crecimiento.

7.3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales.

Se realizó la determinación de la actividad en aceites esenciales utilizando el método de difusión en disco y todos los aceites evaluados presentaron una actividad intermedia contra los microorganismos evaluados.

Cuadro No. 6
Actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Especies	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>P. donnell smithii</i>	6	7	7	6	6	6	7	6
<i>P. oradendron</i>	7	6	8	7	7	7	6	7
<i>P. jacquemontianum</i>	7	6	7	7	7	7	6	7
<i>P. peltatum</i>	6	6	6	7	6	7	6	6
<i>P. variable</i>	6	6	6	7	6	6	6	6

A. *C. neoformans*, B. *E. coli*, C. *M. smegmatis*, D. *S. typhi*, E. *B. subtilis* F. *S. aureus*, G. *P. aeruginosa*, H. *C. albicans*
Halo de inhibición en mm.

Interpretación: > 6 mm es negativo, 6-9 mm es intermedio y >9 mm es positivo.

7.4 Resultados de la actividad citotóxica contra *A. salina*

Se realizó la evaluación de la actividad citotóxica en los extractos diclorometánico y metanólico y ninguno de los que fueron evaluados presentó citotoxicidad, por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL.

Cuadro No. 7
Actividad citotóxica contra *A. salina*

Especie	Actividad	Concentración
<i>P. fallens</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. fallens</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. Donnell smithii</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. Donnel smithii</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. oradendron</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL

<i>P. oradendron</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. umbellatum</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. umbellatum</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. variable</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. variable</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. peltatum</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. peltatum</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. obliquom</i> (Metanol)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. obliquom</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. umbellatum</i> (Hexano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. phytolaccifolium</i> (Diclorometano)	(-)	> 1 mg/mL
<i>P. fallens</i> (aceite esencial)	(-)	> 1 mg/mL

7.5 Resultados de la actividad insecticida contra larvas de *Aedes albimanus* y *Aedes aegypti*:

Se evaluó la actividad insecticida contra larvas de *A. albimanus* y *A. aegypti* en sus 4 estadios de los extractos metabólicos y ningún extracto presentó actividad por lo que se determinó que la concentración es mayor a 1 mg/mL.

Cuadro No. 8
Actividad insecticida contra *A. albimanus* y *A. albimanus*

Especie	1er. estadio	2do. estadio	3er. estadio	4to. estadio
<i>P. umbellatum</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. shippianum</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. oradendron</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. peltatum</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. sempervirens</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. phytolaccifolium</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. donnell smithii</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. obliquom</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. fallens</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. geniculatum</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. variable</i> (hoja)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (hoja) (2)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (hoja) (1)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	>1 mg/mL	>1mg/mL	>1mg/mL	>1 mg/mL

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

7.6 Tamizaje fitoquímico: Se realizaron las pruebas macro y semimicro y cromatografía en capa fina (CCF) para determinar los metabolitos presentes en las especies.

Todas las muestras presentaron alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas excepto *P. shippianum*, ninguna de las muestras presentó taninos, todas las que presentaron metabolitos en los ensayos macro y semimicro fueron confirmadas por CCF.

Cuadro No. 9
Investigación de alcaloides ensayos macro y semimicro

Especie	Reactivo de Mayer's	Reactivo de Dragendorff	Reactivo de Warner
<i>P. umbellatum</i>	+	+	+
<i>P. shippianum</i>	-	+	+
<i>P. oradendron</i>	-	+	+
<i>P. peltatum</i>	-	-	+
<i>P. sempervirens</i>	+	-	-
<i>P. phytolaccifolium</i>	+	+	+
<i>P. donell smithii</i>	+	+	+
<i>P. obliquom</i>	+	+	+
<i>P. fallens</i>	+	+	+
<i>P. geniculatum</i>	+	+	+
<i>P. variable</i>	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	+	+
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	+	+	+
Estándar de papaverina	+	+	+
Estándar de atropina	+	+	+

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Cuadro No. 10
Investigación de alcaloides cromatografía de Capa Fina (CCF)

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	2	0.36, 0.54
<i>P. shippianum</i>	+	2	0.36, 0.86
<i>P. oradendron</i>	+	4	0.23, 0.43, 0.78, 0.94
<i>P. peltatum</i>	+	3	0.23, 0.48, 0.76
<i>P. sempervirens</i>	+	3	0.56, 0.76, 0.96
<i>P. phytolaccifolium</i>	+	4	0.23, 0.43, 0.74, 0.96
<i>P. donell smithii</i>	+	4	0.23, 0.57, 0.73, 0.93
<i>P. obliquom</i>	+	1	0.93
<i>P. fallens</i>	+	4	0.43, 0.57, 0.74, 0.94
<i>P. geniculatum</i>	-	0	-
<i>P. variable</i>	+	6	0.34, 0.43, 0.48, 0.58, 0.76, 0.94
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	2	0.34, 0.94
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	4	0.34, 0.43, 0.60, 0.94
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	+	1	0.5
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	+	4	0.34, 0.4, 0.48, 0.94

Estándar atropina	+	2	0.24, 0.47
Estándar papaverina	+	1	0.48
Estándar brucina	+	1	0.23
Estándar reserpina	+	1	0.46

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (35:10:5). Detección: Reactivo de Dragendroff.

Cuadro No.11
Investigación de flavonoides y antocianinas ensayos macro y semimicro

Especie	Ácido sulfúrico concentrado	Cloruro férrico al 10%	Ácido clorhídrico concentrado	Magnesio metálico y HCl	Álcali
<i>P. umbellatum</i>	+	-	+	+	+
<i>P. shippianum</i>	++	+	+	+	-
<i>P. oradendron</i>	++	+	+	+	-
<i>P. peltatum</i>	+	+	+	+	-
<i>P. sempervirens</i>	+	+	-	+	+
<i>P. phytolaccifolium</i>	++	+	+	+	+
<i>P. donell smithii</i>	+	+	+	+	+
<i>P. obliquom</i>	-	+	+	+	+
<i>P. fallens</i>	+	+	+	+	+
<i>P. geniculatum</i>	-	+	+	-	+
<i>P. variable</i>	+	++	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	-	++	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	++	+	+	+
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	-	+	+	+	+
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	-	++	+	-	+

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Cuadro No. 12
Investigación de flavonoides cromatografía en capa fina (CCF)

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	4	0.31, 0.44, 0.60, 0.14
<i>P. shippianum</i>	-	0	-
<i>P. oradendron</i>	+	5	0.23, 0.34, 0.42, 0.64, 0.74
<i>P. peltatum</i>	+	5	0.08, 0.18, 0.23, 0.51, 0.74
<i>P. sempervirens</i>	+	6	0.25, 0.34, 0.42, 0.5, 0.58, 0.72
<i>P. phytolaccifolium</i>	+	4	0.09, 0.34, 0.42, 0.53
<i>P. donell smithii</i>	+	4	0.12, 0.28, 0.42, 0.5
<i>P. obliquom</i>	+	4	0.26, 0.32, 0.40, 0.53
<i>P. fallens</i>	+	5	0.34, 0.40, 0.70, 0.76, 0.88
<i>P. geniculatum</i>	+	8	0.09, 0.28, 0.36, 0.50, 0.63, 0.72, 0.77, 0.82
<i>P. variable</i>	+	4	0.20, 0.50, 0.68, 0.89
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	7	0.22, 0.27, 0.36, 0.42, 0.61, 0.72, 0.88
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	5	0.26, 0.35, 0.36, 0.72, 0.88
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	+	5	0.24, 0.30, 0.51, 0.77, 0.88

<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	+	1	0.35
estándar quercetina	+	1	0.70
estándar rutina	+	1	0.39
estándar ácido clorogénico	+	2	0.13, 0.85
estándar hiperósido	+	1	0.73

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético glacial-agua (33.33:3.6:3.6:9). Detección: Reactivo de Productos Naturales.

Cuadro No. 13
Investigación de Cumarinas ensayos macro y semimicro

Especie	Fluorescencia	Color
<i>P. umbellatum</i>	+	verde
<i>P. shippianum</i>	-	amarillo
<i>P. oradendron</i>	+	verde
<i>P. peltatum</i>	+	verde
<i>P. sempervirens</i>	+	verde
<i>P. phytolaccifolium</i>	+	amarillo
<i>P. donell smithii</i>	+	verde
<i>P. obliquom</i>	+	verde
<i>P. fallens</i>	+	verde
<i>P. geniculatum</i>	+	verde
<i>P. variabile</i>	+	verde
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	verde
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	verde
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	+	amarillo
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	+	verde
estándar cumarina	+	verde
estándar p-cumárico	+	verde
estándar umbeliferona	+	verde

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Cuadro No. 14
Investigación de cumarinas cromatografía de Capa Fina (CCF)

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	2	0.23, 0.60
<i>P. shippianum</i>	-	0	-
<i>P. oradendron</i>	+	2	0.48, 0.60
<i>P. peltatum</i>	+	3	0.09, 0.24, 0.60
<i>P. sempervirens</i>	+	2	0.28, 0.60
<i>P. phytolaccifolium</i>	+	3	0.24, 0.36, 0.60
<i>P. donell smithii</i>	+	4	0.13, 0.33, 0.47, 0.60
<i>P. obliquom</i>	+	1	0.40
<i>P. fallens</i>	+	1	0.88
<i>P. geniculatum</i>	+	2	0.24, 0.45
<i>P. variabile</i>	+	2	0.69, 0.89
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	3	0.09, 0.36, 0.59

<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	4	0.09, 0.37, 0.60, 0.72
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	+	3	0.09, 0.59, 0.84
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	+	1	0.41
estandar umbeliferona	+	1	0.93
estandar cumarina	+	1	0.1

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (46.5:3.5). Detección: Hidróxido de potasio 10%

Cuadro No. 15
Investigación de antraquinonas ensayos macro y semimicro

Especie	Reactivo de Bonträger
<i>P. umbellatum</i>	-
<i>P. shippianum</i>	-
<i>P. oradendron</i>	-
<i>P. peltatum</i>	-
<i>P. sempervirens</i>	-
<i>P. phytolaccifolium</i>	+
<i>P. donell smithii</i>	-
<i>P. obliquom</i>	-
<i>P. fallens</i>	-
<i>P. geniculatum</i>	-
<i>P. variable</i>	-
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	-
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	-

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Cuadro No. 16
Investigación de antraquinonas cromatografía de Capa Fina (CCF)

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	3	0.26, 0.34
<i>P. shippianum</i>	+	2	0.82, 0.87
<i>P. oradendron</i>	+	4	0.28, 0.36, 0.81, 0.85
<i>P. peltatum</i>	+	3	0.063, 0.29, 0.84
<i>P. sempervirens</i>	+	2	0.36, 0.82
<i>P. phytolaccifolium</i>	+	1	0.82
<i>P. donell smithii</i>	+	2	0.31, 0.74
<i>P. obliquom</i>	+	1	0.74
<i>P. fallens</i>	+	3	0.31, 0.46, 0.81
<i>P. geniculatum</i>	+	4	0.36, 0.62, 0.71, 0.81
<i>P. variable</i>	+	3	0.15, 0.30, 0.81
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	2	0.58, 0.81
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	1	0.81
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	+	2	0.26, 0.72
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	+	2	0.74, 0.82

Extracto de Sen	+	6	0.096, 0.19, 0.42, 0.70, 0.75, 0.89
-----------------	---	---	-------------------------------------

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: acetato de etilo, metanol, agua (50:8.5:6.5). Detección: Hidróxido de potasio al 10%.

Cuadro No. 17
Investigación de saponinas ensayos macro y semimicro y CCF

Especie	Prueba de espuma	No. de bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	-	3	0.12, 0.19, 0.34
<i>P. shippianum</i>	-	2	0.32, 0.45
<i>P. oradendron</i>	-	4	0.23, 0.3, 0.35, 0.80
<i>P. peltatum</i>	-	2	0.21, 0.32
<i>P. sempervirens</i>	-	4	0.12, 0.22, 0.31, 0.84
<i>P. phytolaccifolium</i>	-	3	0.23, 0.71, 0.88
<i>P. donell smithii</i>	-	4	0.13, 0.22, 0.32, 0.81
<i>P. obliquom</i>	+	2	0.12, 0.22
<i>P. fallens</i>	-	4	0.13, 0.19, 0.33, 0.51
<i>P. geniculatum</i>	-	5	0.23, 0.35, 0.58, 0.75, 0.88
<i>P. variable</i>	-	2	0.32, 0.54
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	-	4	0.12, 0.25, 0.32, 0.7
<i>P. jacquemontianum</i> (1).	-	4	0.13, 0.23, 0.34, 0.7
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	-	1	0.26
<i>P. jacquemontianum</i> (tallo)	-	4	0.32, 0.60, 0.67, 0.82
Estándar de saponinas	+	1	0.86
Estándar de Colesterol		1	0.96

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: Cloroformo, metanol (95:5). Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico.

Cuadro No. 18
Investigación de Principios amargos cromatografía de Capa Fina (CCF)

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	5	0.12, 0.26, 0.41, 0.51, 0.66
<i>P. shippianum</i>	+	3	0.25, 0.66, 0.82
<i>P. oradendron</i>	+	2	0.12, 0.43
<i>P. peltatum</i>	+	4	0.22, 0.35, 0.82, 0.84
<i>P. sempervirens</i>	+	1	0.79
<i>P. phytolaccifolium</i>	+	1	0.12
<i>P. donell smithii</i>	+	5	0.12, 0.43, 0.67, 0.88, 0.91
<i>P. obliquom</i>	+	3	0.12, 0.43, 0.71
<i>P. fallens</i>	+	4	0.23, 0.57, 0.65, 0.86
<i>P. geniculatum</i>	+	2	0.12, 0.87
<i>P. variable</i>	+	5	0.34, 0.51, 0.65, 0.74, 0.88
<i>P. jacquemontianum</i> (2)	+	2	0.75, 0.90
<i>P. jacquemontianum</i> (1)	+	1	0.79

<i>P. umbellatum</i> (tallo)	+	3	0.35, 0.44, 0.53
<i>P. Jacquemontianum</i> (tallo)	+	4	0.12, 0.22, 0.43, 0.69
Estándar <i>Neurolaena lobata</i> (Tres puntas)	+	1	0.28, 0.95

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: Acetato de etilo, metanol, agua (77:15:8). Detección: Anisaldehído-ácido sulfúrico.

Cuadro No. 19
Investigación de Taninos ensayos macro y semimicro

Especie	Gelatina al 1%	Gelatina-NaCl	Cloruro férrico
<i>P. umbellatum</i>	-	-	-
<i>P. shippianum</i>	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	-	-	-
<i>P. peltatum</i>	-	-	-
<i>P. sempervirens</i>	-	-	-
<i>P. phytolaccifolium</i>	-	-	-
<i>P. donell smithii</i>	-	-	-
<i>P. obliquom</i>	+	-	-
<i>P. fallens</i>	-	-	-
<i>P. geniculatum</i>	-	-	+ (grisáceo negro)
<i>P. variable</i>	-	-	-
<i>P. Jacquemontianum</i> (2)	-	-	+ (grisáceo negro)
<i>P. Jacquemontianum</i> (1)	-	-	+ (grisáceo negro)
<i>P. umbellatum</i> (tallo)	-	-	-
<i>P. Jacquemontianum</i> (tallo)	-	-	+ (grisáceo negro)

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Cuadro No. 20
Investigación de aceites volátiles cromatografía de Capa Fina (CCF)

Especie	CCF	No. Bandas	Rf
<i>P. umbellatum</i>	+	2	0.41, 0.56
<i>P. shippianum</i>	+	2	0.33, 0.55
<i>P. oradendron</i>	+	2	0.33, 0.55
<i>P. peltatum</i>	+	3	0.33, 0.43, 0.56
<i>P. donell smithii</i>	+	2	0.36, 0.54
<i>P. geniculatum</i>	+	6	0.086, 0.26, 0.39, 0.55, 0.72, 0.80
<i>P. variable</i>	+	3	0.26, 0.35, 0.56
<i>P. Jacquemontianum</i> (2)	+	4	0.26, 0.35, 0.42, 0.56
<i>P. Jacquemontianum</i> (1)	+	4	0.26, 0.38, 0.55, 0.69
<i>P. Jacquemontianum</i> (tallo)	+	5	0.26, 0.38, 0.45, 0.55, 0.71
Estándar carvacrol	+	1	0.51
Estándar fenchona	+	1	0.32
Estándar isopulegol	+	1	0.36
Estándar linalool	+	1	0.38
Estándar terpineol	+	1	0.27

Mezcla de aceites	+	3	0.25, 0.33, 0.51
-------------------	---	---	------------------

(1) Procedencia Laguna Lachúa. (2) Procedencia Cerro San Gil.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (46.5:3.5). Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico

7.7 Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases masas.

Se realizó el análisis de los aceites esenciales por cromatografía de gases masas en la Universidad de Rio Grande do Sul en Porto Alegre Brasil, como parte de la cooperación internacional, ya que el equipo de la Facultad de Farmacia se encontraba en mantenimiento y reparación, además de que se atrasó la compra por trámites administrativos de la institución, de la columna cromatográfica solicitada a DIGI.

Condiciones del análisis:

Muestras: dilución 2:100 (V/V) en éter etílico (Merck).

Separación y cuantificación de los constituyentes de los aceites volátiles: cromatógrafo de gases GC-17A (Shimadzu) equipado con inyector con divisor de flujo (*splitter*), con partición de la muestra 1:50. Helio utilizado como gas de arrastre a una presión de 80 Kpa y velocidad linear de 1 ml por minuto. Nitrógeno e hidrógeno fueron utilizados como gases auxiliares en el detector, a razón de 1:1:10, respectivamente. La cuantificación fue obtenida por integración electrónica, por la técnica de normalización. Para la separación de los constituyentes fue utilizada una columna apolar Durabond-DB5 (John Wiley & Sons Scientific, U.S.A.), con 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno, rellena con polidimetildifenilsiloxano conteniendo 5% de grupos fenilo con una película de 0,25 μm de espesor, y columna polar LM-120 (L & M, San Carlos, SP), rellena con propilenglicol, con las mismas especificaciones.

El análisis cualitativo fue realizado utilizando el mismo equipo acoplado a un espectrómetro de masas GC/MS - QP5000 (Shimadzu), equipado con cuadruplo cilíndrico, operando con energía de ionización de 70 eV. La ionización fue obtenida por la técnica de impacto electrónico.

Condiciones del equipo DB5:

- Programa de temperatura: 60 a 300°C, a 3°C/min
- Tiempo de análisis: 60 minutos
- Inyector: 220°C
- Detector (DIC) / Interface (EM): 250°C
- Cantidad de muestra inyectada: 1 μl de dilución en éter etílico.

En el análisis del aceite esencial se observó que *P. phytolaccifolium* fue la especie que presentó mayor número de constituyentes (42), entre los cuales se identificaron germacrano D 18%, β -cariofileno 16%

γ -muuroleno 5.8%; *P. umbellatum* (39), presentó como mayoritarios *E*-nerolidol 23.4%, germacrano D 17.4 %, β -cariofileno 8.5% y *P. variable* (36), el cual presentó alcanfor 28.4%, canfeno 16.6%, limoneno 13.9% y *P. jacquemontianum* que presentó linalool 69.4% como mayoritario un constituyentes interesante en la industria de perfumería.

Cuadro No. 21
Compuestos identificados en el aceite de *P. variable*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	6.655	908	Triciclono	0.2
2	7.037	918	alfa-pineno	2.9
3	7.583	933	Canfeno	16.6
4	8.515	958	beta-pineno	0.7
5	9.048	973	Mircenp	0.3
6	9.569	987	alfa-felandreno	0.2
7	10.426	1008	orto-cimeno	6.3
8	10.659	1014	Limoneno	13.9
9	15.785	1128	Alcanfor	28.4
10	15.905	1130	Z-beta-terpineol	1.4
11	16.675	1147	Isoborneol	0.3
12	16.861	1150	Ni	0.4
13	22.139	1267	Acetato de bornilo	0.5
14	22.683	1279	para-cimen-7-ol	1.5
15	22.801	1282	Timol	0.3
16	23.105	1289	3`-metoxi-acetofenona	2.2
17	24.269	1315	Ni	0.3
18	28.1	1398	beta-cariofileno	2.3
19	29.863	1440	Seicelono	2.7
20	30.694	1460	Germacrano D	1.0
21	31.312	1475	beta-selineno	0.3
22	33.793	1538	Elemicina	0.4
23	34.12	1546	E-nerolidol	1.8
24	34.676	1561	Espatulenol	1.4
25	34.844	1566	Óxido de cariofileno	2.2
26	35.552	1584	Guaiol	6.3
27	35.665	1587	Óxido humuleno I	0.7
28	36.656	1614	Ni	0.3
29	37.154	1627	alfa-muurolol	0.2
30	37.325	1632	Ni	0.7
31	37.458	1636	beta-eudesmol	0.3
32	37.571	1639	Ni	1.8
33	38.108	1653	Bulnesol	0.2
34	38.822	1673	Ni	0.3
35	39.033	1678	Ni	0.4
36	53.269	2100	Nonadecanal	0.7

Cuadro No. 22
Compuestos identificados en el aceite de *P. umbellatum*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	7.014	917	alfa-pineno	0.2
2	7.506	931	Canfeno	0.5
3	10.353	1007	orto-cimeno	1.1
4	10.551	1011	Limoneno	2.1
5	13.669	1083	Linalool	0.3
6	15.554	1123	Alcanfor	0.5
7	22.125	1267	Acetato de bornilo	0.3
8	25.036	1331	alfa-cubebeno	0.4
9	26.198	1357	alfa-copaeno	1.2
10	26.573	1365	beta-bourboneno	0.2
11	26.825	1370	beta-cubebeno	1.4
12	26.918	1373	beta-elemeneno	1.8
13	28.145	1399	beta-cariofileno	8.5
14	28.48	1407	beta-gurjuneno	0.2
15	29.507	1432	neril propanato	2.1
16	30.832	1463	germacrano D	17.4
17	30.958	1466	beta-selineno	0.2
18	31.395	1477	Biciclo-germacrano	4.4
19	31.535	1480	alfa-muuroleno	0.3
20	31.748	1485	Germacrano A	1.9
21	32.033	1492	gamma-cadineno	0.1
22	32.133	1494	Cubebol	0.8
23	32.409	1501	cis-calameneno	0.7
24	34.307	1551	E-nerolidol	23.4
25	34.788	1564	Espatulenol	5.8
26	34.917	1568	Óxido de cariofileno	4.4
27	35.879	1593	Epóxido de humuleno	0.3
28	36.163	1601	Cariofiladienol II	0.3
29	36.507	1610	Ni	0.1
30	36.718	1616	iso-espatulenol	3.6
31	37.172	1628	alfa-muurolol	1.0
32	37.321	1632	Ni	0.8
33	37.361	1633	Ni	0.7
34	38.289	1658	calamenenol (isómero no identificado)	0.7
35	38.367	1660	Ni	0.4
36	38.816	1673	Ni	0.2
37	44.484	1831	Ni	0.9

38	45.316	1855	ftalato (contaminante)	5.6
39	53.328	2102	Nonadecanal	5.2

Cuadro No. 23
Compuestos identificados en el aceite de *P. oradendron*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	7.046	918	alfa-pineno	12.0
2	7.528	931	Alcanfor	0.2
3	8.406	955	Sabineno	0.5
4	8.57	960	beta-pineno	30.3
5	9.051	973	Mirceno	1.2
6	9.81	993	alfa-felandreno	1.5
7	10.559	1011	Limoneno	1.2
8	22.161	1267	Acetato de bornilo	0.3
9	24.538	1321	delta-elemeno	1.9
10	25.84	1349	Ciclosativeno	0.2
11	26.017	1353	alfa-ylangeno	0.1
12	26.235	1358	alfa-copaeno	0.3
13	26.612	1366	beta-bouborneno	0.2
14	26.85	1371	beta-cubebeno	0.1
15	26.939	1373	beta-elemeno	0.7
16	28.107	1398	beta-cariofileno	2.7
17	28.527	1408	beta-gurjuneno	0.4
18	29.548	1433	alfa-humuleno	0.7
19	30.584	1457	gamma-muuroleno	0.3
20	30.794	1462	Germacrano D	14.8
21	30.944	1466	beta-selineno	0.2
22	31.387	1477	Biciclogermacrano	2.8
23	31.528	1480	Alfa-muuroleno	1.9
24	31.73	1485	germacrano A	0.5
25	32.158	1495	gamma-cubebeno	0.3
26	32.432	1502	beta-cadineno	1.1
27	33.812	1538	Germacrano B	0.7
28	34.105	1546	E-nerolidol	0.4
29	34.666	1561	Espatulenol	2.5
30	34.851	1566	Óxido de cariofileno	1.0
31	34.925	1568	Globulol	0.1
32	35.208	1575	epi-globulol	0.6
33	36.348	1606	1,10-di-epi-cubenol	0.4
34	36.517	1610	Ni	0.2
35	36.782	1617	iso-espatulenol	12.8
36	37.081	1625	Ni	1.6
37	37.197	1629	Ni	0.7
38	37.342	1633	alfa-muurolol	0.5

39	37.5	1637	Ni	0.4
40	37.651	1641	Ni	1.0
41	37.817	1645	Ni	0.3
42	38.419	1662	Ni	0.4
43	39.041	1679	Ni	0.1
44	39.481	1691	Ni	0.2

Cuadro No. 24
Compuestos identificados en el aceite de *P. geniculatum*

<i>P. geniculatum</i>				
PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	7.025	918	Alfa-pineno	0.3
2	8.518	958	Beta-pineno	0.2
3	13.684	1082	Linalool	1.8
4	25.068	1332	Alfa-cubebeno	0.3
5	26.211	1357	Alfa-copaeno	1.0
6	27.682	1389	Cipereno	0.7
7	28.088	1398	beta-cariofileno	3.3
8	28.921	1418	beta-gurjuneno	1.3
9	29.381	1429	Ni	0.2
10	29.524	1432	Alfa-humuleno	0.6
11	29.842	1440	Alo-aromadendreno	1.0
12	30.389	1453	Cadina-1(6)-4-dieno	0.5
13	30.52	1456	gamma-muuroleno	1.2
14	30.705	1460	Germacrano D	3.5
15	30.917	1465	beta-selineno	0.7
16	31.033	1468	Ni	0.3
17	31.131	1470	epi-sesquifelandreno	0.6
18	31.293	1474	gamma-gurjuneno	3.0
19	31.515	1480	alfa-muuroleno	1.7
20	31.717	1484	Germacrano A	0.1
21	32.073	1493	gamma-cadineno	3.9
22	32.15	1495	Ni	1.0
23	32.502	1504	delta-cadineno	11.0
24	32.811	1512	E-cadina-1-4-dieno	0.3
25	33.027	1517	alfa-cadineno	0.3
26	34.086	1546	E-nerolidol	1.1
27	34.237	1550	Leedlo	0.8
28	34.383	1553	Ni	0.3
29	34.568	1558	germacrano D-4-ol	4.0
30	34.842	1566	Globulol	0.4
31	34.905	1567	epi-globulol	0.8
32	35.442	1581	Ni	0.4
33	35.642	1587	Ni	0.7
34	36.705	1615	Ni	3.0
35	37.19	1628	Ni	15.1
36	37.325	1632	alfa-muurolol	0.5

37	37.477	1636	Ni	0.7
38	37.657	1641	Ni	3.9
39	38.161	1655	Ni	0.9
40	39.157	1682	Ni	28.6

Cuadro No. 25
Compuestos identificados en el aceite de *P. phytolaccifolium*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	7.047	918	Alfa-pineno	3.4
2	8.543	959	beta-pineno	5.3
3	9.063	973	Mirceno	0.4
4	10.571	1012	Limoneno	0.9
5	11.849	1041	gamma-terpineno	0.2
6	13.703	1083	Linalool	0.1
7	17.201	1162	terpinen-4-ol	0.3
8	24.529	1320	delta-elemeno	0.3
9	25.069	1332	alfa-cubebeno	0.4
10	26.025	1353	alfa-ylangeno	0.5
11	26.249	1358	alfa-copaeno	2.7
12	26.609	1366	beta-bourboneno	0.3
13	26.936	1373	beta-elemeno	0.3
14	28.214	1401	beta-cariofileno	16.8
15	28.536	1409	beta-copaeno	1.4
16	28.933	1418	Aromadendreno	0.3
17	29.417	1430	E-muurola-3,5-dieno	0.3
18	29.558	1433	alfa-humuleno	0.2
19	29.946	1442	Z-muurola-4(14),5-dieno	0.9
20	30.425	1454	E-cadina-1(6),4-dieno	0.6
21	30.68	1460	gamma-muuroleno	5.8
22	30.87	1464	Germacrano D	18.4
23	30.998	1467	beta-selineno	0.4
24	31.184	1472	epi-biciclosesquifelandreno	0.6
25	31.334	1475	gamma-amorfeno	3.3
26	31.413	1477	Biciclogermacrano	1.6
27	31.563	1481	alfa-muuroleno	2.4
28	31.828	1487	delta-amorfeno	0.7
29	32.128	1494	gamma-cadineno	3.4
30	32.568	1505	delta-cadineno	9.2
31	32.858	1513	E-cadina-1(2),4-dieno	0.7
32	33.064	1518	alfa-cadineno	0.6
33	33.236	1523	alfa-calacoreno	0.3
34	33.835	1539	Germacrano B	1.4
35	34.096	1546	E-nerolidol	0.4
36	34.658	1561	Espatulenol	0.2
37	34.848	1566	Globulol	1.2

38	34.933	1568	epi-globulol	0.2
39	36.115	1599	1,10-di-epi-cubenol	0.2
40	36.533	1611	Ni	0.3
41	36.638	1613	Z-cadin-4-en-7-ol	1.0
42	36.789	1618	Ni	0.6
43	37.197	1629	Cubenol	3.2
44	37.341	1633	Ni	0.8
45	37.7	1642	Ni	3.1
46	38.872	1674	Ni	1.7
47	53.31	2066	Nonadecanal	1.2

Cuadro No. 26
Compuestos identificados en el aceite de *P. jacquemontianum*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	7.013	917	alfa-pineno	3.2
2	7.504	931	Alcanfor	0.1
3	8.498	958	Beta-pineno	2.4
4	9.033	972	Mirceno	0.4
5	10.358	1007	orto-cimeno	0.1
6	10.544	1011	Limoneno	0.7
7	10.623	1013	1,8-cineol	1.4
8	10.937	1020	Z-beta-ocimeno	0.2
9	11.388	1030	E-beta-ocimeno	2.5
10	12.444	1054	Óxido cis-linalool	0.3
11	13.131	1070	Terpinoleno	0.2
12	14	1089	Linalool	69.4
13	17.199	1162	terpinen-4-ol	0.1
14	17.829	1176	alfa-terpinol	1.1
15	20.843	1237	E-beta-geraniol	0.2
16	22.142	1267	Acetato de bornilo	0.3
17	22.225	1269	E-linalool óxido acetato	0.4
18	22.778	1281	E-sabinil acetato	0.1
19	26.54	1364	geranil acetato	1.6
20	28.076	1398	beta-cariofileno	0.4
21	29.523	1432	alfa-humuleno	0.2
22	30.513	1456	gamma-muuroleno	0.1
23	30.693	1460	Germacrano D	1.0
24	30.902	1465	beta-selineno	0.1
25	31.278	1474	Viridifloreño	0.3
26	31.498	1479	alfa-muuroleno	0.2
27	32.431	1502	delta-cadineno	0.3
28	34.159	1547	E-nerolidol	8.0
29	36.749	1616	gamma-eudesmol	0.3
30	37.092	1626	tau-cadinol	0.1

31	37.305	1632	Cubenol	0.2
32	37.457	1636	beta-eudesmol	0.6
33	37.606	1640	Alfa-eudesmol	1.0
34	38.283	1658	Ni	0.4
35	40.161	1709	E-nerolidol acetato	2.2

Cuadro No. 27
Compuestos identificados en el aceite de *P. donnellsmithii*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	7.081	919	alfa-pineno	21.4
2	8.557	959	beta-pineno	7.7
3	10.613	1015	Limoneno	0.2
4	14.878	1109	Ni	0.6
5	26.237	1358	alfa-cipaeno	1.0
6	26.621	1366	alfa-bourboneno	1.6
7	26.944	1373	beta-elemeneno	3.3
8	27.707	1390	Cipereno	1.8
9	27.912	1394	alfa-gurjuneno	0.7
10	28.11	1399	beta-cariofileno	5.7
11	28.934	1418	beta-gurjuneno	2.0
12	29.542	1433	alfa-humuleno	0.7
13	29.644	1435	Ni	0.7
14	29.727	1437	E-beta-farneseno	2.4
15	29.859	1440	seiceleno	2.5
16	30.147	1447	Ni	1.5
17	30.748	1461	Germacrano D	11.8
18	31.393	1477	biciclogermacrano	8.5
19	31.75	1485	Germacrano A	6.3
20	32.464	1503	delta-cadineno	1.7
21	33.299	1525	Ni	0.3
22	33.817	1538	Germacrano B	4.0
23	34.658	1561	Espatulenol	4.6
24	35.036	1571	Globulol	3.1
25	35.218	1576	Ni	0.9
26	35.67	1587	Óxido humuleno I	4.4
27	37.616	1639	epoxi-alo-aloaromadendreno	0.8

Cuadro No. 28
Compuestos identificados en el aceite de *P. fallens*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	7.09	919	alfa-pineno	10.6
2	8.616	961	beta-pineno	18.1
3	9.073	973	Mirceno	0.6
4	10.587	1012	Limoneno	1.5
5	22.156	1269	Acetato de bornilo	0.3

6	22.686	1280	timol	1.4
7	22.8	1283	Acetato de E-sabinil	0.6
8	26.227	1357	alfa-copaeno	0.3
9	26.61	1366	beta-bourboneno	0.4
10	26.99	1374	beta-elemene	4.1
11	27.715	1390	alfa-gurjuneno	0.8
12	28.166	1400	beta-cariofileno	4.9
13	29.003	1420	Aromadendreno	4.3
14	29.582	1434	alfa-humuleno	2.0
15	29.859	1440	alo-aromadendreno	0.4
16	30.601	1458	gamma-gurjuneno	1.4
17	30.814	1463	Germacrano D	5.5
18	31.042	1468	beta-selineno	5.4
19	31.473	1479	Viridifloreño	11.5
20	31.583	1481	alfa-muroleno	0.6
21	31.784	1486	Germacrano A	0.9
22	32.117	1494	gamma-cadineno	1.1
23	32.535	1504	delta-cadineno	3.6
24	32.853	1513	cadina-1,4-dieno	0.6
25	33.828	1539	Germacrano B	0.8
26	34.198	1548	E-nerolidol	5.3
27	34.511	1557	E-isoelemicina	0.3
28	34.712	1562	Espatulenol	2.4
29	34.858	1566	Óxido de cariofileno	0.6
30	34.967	1569	globulol	1.3
31	35.288	1577	epi-globulol	1.9
32	35.691	1588	Ni	0.8
33	37.211	1629	alfa-murolol	1.3
34	37.367	1633	Ni	1.4
35	37.7	1642	Ni	2.3
36	44.351	1827	Ni	0.4
37	47.061	1907	Ni	0.5
38	48.229	1943	Ni	0.2

Cuadro No. 28
Compuestos identificados en el aceite de *P. schippianum*

PICO	TREM	IKEM	COMPUESTO	%
1	6.983	917	alfa-pineno	0.23
2	8.466	957	beta-pineno	0.74
3	10.517	1010	Mirceno	0.32
4	26.177	1356	alfa-copaeno	1.03
5	26.893	1372	bete-elemeno	8.31
6	28.044	1397	beta-cariofileno	3.26
7	29.364	1428	Ni	3.14
8	29.503	1432	alfa-humuleno	1.14
9	29.672	1436	E-beta-farneseno	1.25

10	29.951	1442	dehidro-aromadendreno	40
11	30.109	1446	Ni	3.95
12	30.477	1455	gamma-muuroleno	0.7
13	30.666	1459	Germacrano D	5.71
14	30.868	1464	beta-selineno	2.05
15	31.172	1471	Valenceno	1.99
16	31.28	1474	Biciclogermacrano	9.27
17	31.68	1484	Germacrano A	3.87
18	31.837	1487	beta-bisaboleno	6.54
19	32.419	1501	delta-cadineno	2
20	32.777	1511	ni	0.46
21	34.78	1564	Óxido de cariofileno	2.16
22	37.267	1630	ni	0.22
23	37.586	1638	ni	1.64

Ni: No identificado. TREM: tiempo de retención. IKEM: índice de Kowats.

Cuadro No. 29
Análisis del aceite esencial de 9 especies de *Piper*

Especie	Compuestos identificados	Compuestos mayoritarios
<i>P. variable</i>	36	alcanfor 28.4% canfeno 16.6 limoneno 13.9
<i>P. umbellatum</i>	39	<i>E</i> -nerolidol 23.4% germacrano D 17.4 β -cariofileno 8.5
<i>P. oradendron</i>	35	β -pineno 30.3 % germacrano D 14.8 isoespatulenol 12.8
<i>P. geniculatum</i>	28	Δ -cadineno 11.0 %
<i>P. phytolaccifolium</i>	42	germacrano D 18% β -cariofileno 16 γ -muuroleno 5.8
<i>P. jacquemontianum</i>	34	Linalool 69.4% <i>E</i> - nerolidol 8.0 α -pineno 3.2
<i>P. donellsmithii</i>	22	α -pineno 21.4% germacrano D 11.8 biciclogermacrano 8.5
<i>P. fallens</i>	32	β -pineno 18.1% viridifloreno 11.5 α -pineno
<i>P. donellsmithii</i>	22	α -pineno 21.4% germacrano D 11.8 biciclogermacrano 8.5
<i>P. fallens</i>	32	β -pineno 18.1% viridifloreno 11.5

		α -pineno 10.6
--	--	-----------------------

VIII CONCLUSIONES

8.1 Se identificaron 16 especies, en Suchitepéquez se colectaron 4 especies (*Piper umbellatum*, *P. oradendrum*, *P. patulum* y *P. subcitrifolium*); en Alta Verapaz 8 especies (*P. geniculatum*, *P. jacquemontianum*, *P. obliquom*, *P. variable*, *P. phytolaccifolium*, *P. shippianum*, *P. sempervirens* y *P. hispidum*) y en Izabal 4 especies (*P. peltatum*, *P. donnell smithii*, *P. fallens* y *P. diandrum*).

8.2 El mayor rendimiento del aceite esencial lo presentó *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (2.24%) y Laguna Lachúa (0.77%), *P. peltatum* (1.32%) y *P. variable* (0.72%).

8.3 Los extractos diclorometánicos con mayor rendimiento fueron *P. shippianum* (10.59%) *P. peltatum* (9.33%) y *P. phytolaccifolium* (8.92%), y los extractos metanólicos con mayores rendimientos fueron *P. sempervirens* (17.61%), *P. phytolaccifolium* (14.05%) y *P. jacquemontianum* procedente del Cerro San Gil (11.01%).

8.4 Los extractos de *P. fallens* (diclorometánico), *P. umbellatum* (diclorometánico y hexánico), *P. peltatum* (diclorometánico), *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metabólico) y *P. phytolaccifolium* (diclorometánico) presentaron actividad contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*.

8.5 Los extractos diclorometánico de *P. fallens* y *P. jacquemontianum*, presentaron un CIM de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis*, *P. variable* y *P. phytolaccifolium* presentaron un CIM de 1 mg/mL.

8.6 Los aceites esenciales evaluados presentaron una actividad intermedia contra los microorganismos evaluados con un halo de inhibición de 6-9 mm.

8.7 Ninguno de los extractos presentó citotoxicidad contra *A. salina*, ni actividad insecticida contra *A. albimanus* y *A. aegypti* por lo que se determinó la concentración letal mayor a 1 mg/mL.

8.8 Todas las muestras presentaron alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas excepto *P. shippianum*, y ninguna de las muestras presentó taninos.

8.9 En el análisis del aceite esencial se observó que *P. phytolaccifolium* fue la especie que presentó mayor número de constituyentes (42), entre los cuales se identificaron germacrano D 18%, β -cariofileno 16% γ -muuroleno 5.8%; *P. umbellatum* (39), presentó como mayoritarios *E*-nerolidol 23.4%, germacrano D 17.4 %, β -cariofileno 8.5%; *P. variable* (36), el cual presentó alcanfor 28.4%, canfeno 16.6%, limoneno 13.9% y *P. jacquemontianum* que presentó linalool 69.4% como mayoritario un constituyentes interesante en la industria de perfumería.

IX. RECOMENDACIONES

9.1 Realizar muestreos en diferentes regiones para identificar otras especies de *Piper* y continuar así con la investigación química y biológica del género.

9.2 Colectar en diferentes épocas del año y condiciones climáticas para comparar la composición química y actividad biológica presente en las especies.

9.3 Evaluar otras partes de la planta para determinar si presentan actividad biocida y si existe diferencia en cuanto a la composición química.

9.4 Fraccionar los extractos que presentaron actividad para aislar y elucidar la naturaleza química de las moléculas responsables de la bioactividad.

9.5 Realizar estudios agronómicos de las especies promisorias con el fin de generar un cultivo sustentable a largo plazo.

9.6 Continuar con el estudio químico y biológico de las especies potenciales con la finalidad de llegar a formular un producto que pueda tener un uso medicinal, agrícola, aromático y/o cosmético.

X. BIBLIOGRAFÍA

10.1 BANDONI, A. (2000). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latioamérica. La Plata, Ed. Univ. Nac. de la Plata, 410 p.

10.2 BASE DE DATOS NAPRALERT, 2000.

10.3 BRANCATO FP y GOLDING NS (1953) The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. Mycologia 45:848-864.

10.4 British Herbal Pharmacopeia. London: Department of Health, Social Services and Public Safety, 2002.

- 10.5 CAÑIGUERAL, S. Identidad y pureza de drogas vegetales y extractos. Seminario Taller sobre Estandarización de Extractos Vegetales y Garantía de Calidad de Productos Fitoterápicos, Cartagena, Colombia, 4-8 de agosto, 2003.
- 10.6 CLEAVES, C. (2001). Etnobotánica participativa en siete comunidades de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachúa, Cobán, Alta Verapaz. Guatemala. 282 p. Tesis Licenciada en Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Biología.
- 10.7 DIAS DOS SANTOSA, P. *et al.*, (2001). Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry* (58): 547–551.
- 10.8 DÍAZ, D., P. y J. Dorado. (1986). Constituyentes químicos de las hojas de *Piper lenticillosum* C. D. C., *Rev. Latinoamer. Quím.* 17(1-2):58-60
- 10.9 DÍAZ, P. P., B. C. Ramos y G. E. Matta. (1986). New C6-C3 and C6-C1 compounds from *Piper lenticillosum*. *J. Nat. Prod.* 49(4):690-691.
- 10.10 DUKE, J.A. 1985. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC, New York, pp. 378-383, 521, 563.
- 10.11 FONEGRA, R. Ed. Simposio sobre Plantas Medicinales y Aromáticas, Curso Nacional para el Conocimiento de las Plantas Medicinales y Aromáticas. Documentos Ocasionales No. 2 Herbario Universidad de Antioquia. 349 p.
- 10.12 JOLY, A.B. 1977. *Botânica-Introdução á Taxonomia Vegetal*. Companhia Editora Nacional, São Paulo, Brazil.
- 10.13 KUKLINSKI, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega. Barcelona. 515 p.
- 10.14 LOCK, O. (1994). *Investigación Fitoquímica*. 2ª. Ed. Fondo Editorial. Perú. 300 p.
- 10.15 MANUAL DE OPERACIONES. (2005). Procedimiento Estándar de Operación. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales.
- 10.16 MARTINS, AP. *et al.*, (1998). Essential oils from four *Piper* Species. *Phytochemistry* 49(7), pp. 2019-2023.
- 10.17 MILLER, J.N. y MILLER, J.C. (2002) *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ta. Edición. Printice Hall, España, pp 228-232.
- 10.18 MITSCHER LA *et al.* (1972) Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction rationale and methodology. *Lloydia* 35:157-166.

- 10.19 MOREIRA, D.L et al. 1998. Essential oil analysis of two *Piper* species (Piperaceae). *An. Acad. Bras. Ci.* 70 (4) 751-754.
- 10.20 MUNDINA, M. *et al.*, (1998). Leaf essential oils of three Panamanian *Piper* species. *Phytochemistry*. 47(7). pp. 1277-1282.
- 10.21 ORJALA, J. *et al.*, (1993). Aduncamide, a Cytotoxy and antibacterial beta-Phenylethylamine derived amide from *Piper aduncum*. *Nat Product Lett* 23, 231–236.
- 10.22 PARMAR, V.S. *et al.* 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochem.* 46 (4) 597-673.
- 10.23 REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA (2002) 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 p.
- 10.24 RODRÍGUEZ, J. y SUÁREZ, Y. A. (1981) Estudio fitoquímico del aceite esencial de *Piper lenticillosum* C. DC. Segunda parte y determinación de la actividad del aceite sobre la motilidad de la lombriz de tierra (*Andiodrilus bogotensis*).
- 10.25 SÁEZ, J., *et al.*, (1998) Piperlonguminina y estigmasterol, compuestos de raíces y tallos de *Piper auritum*, Actividad insecticida de extractos. *Revista Colombiana de Química* 27(1):77.
- 10.26 SANTA CRUZ, L. Manual: Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. 92 p.
- 10.27 SANTANA, AI., *et al.*, Composición química de aceites esenciales de *Piper augustum*, *Piper corrugatum* y *Piper darienense* de Panamá. Poster. Centro de Investigaciones de la Flora Panameña.
- 10.28 SANTOS, P.R *et al.* 2001. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochem.* 58: 547–551.
- 10.29 SHARAPIN, N. (2000) Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247 p.
- 10.30 SOLIS, P. *et al.*, (2005). Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos (OEA/AICD/AE089/03). 132 p.
- 10.31 STANDLEY PC, y STEYERMARK JA (1952) Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 24(3), 275 337 p.
- 10.32 STEVENS, WD, *et al.*, (2001). Flora de Nicaragua. USA. Missouri Botanical Garden Press. (3), 2510.

- 10.33 TREASE y EVANS, 1991. Farmacognosia. 13ª. Edición. México. Interamericana. McGraw Hill. pp. 261-280.
- 10.34 TRELEASE, W. y T. G. YUNCKER. (1950). *The Piperaceae of Northern South America*. Ed. University of Illinois Press, Urbana, Tomo I, página 247-249.
- 10.35 VILA, R y REING, M. (2003). Métodos de Control de Calidad. Madaus, UB Virtual, Imicromat. 39 p.
- 10.36 VILA, R. Métodos Cromatográficos y otras determinaciones de identidad y pureza, Curso Iberoamericano de Control de Calidad de Medicamentos Fitoterápicos, OEA/CIPRONA/CYTED, San José, Costa Rica, Julio 19-23, 2004.
- 10.37 VIRINDER S. *et al.*, (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46(4), pp. 591-673.
- 10.38 WAGNER, H. *et al.* (1984). *Plant Drug Analysis*. Berlin, Springer-Verlang, 320 p.
- 10.39 WHO (1998) *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO. 115 p.
- 10.40 WHO (2003). *Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*. Geneva: WHO.