



UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE:**

MÁGISTER EN QUÍMICA APLICADA

TÍTULO DEL PROYECTO:

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LÁTEX
DE *Argemone mexicana* (CARDO SANTO)**

TUTOR

PhD. HAYDELBA TRINIDAD D'ARMAS REGNAULT

AUTOR

CARLOS SANTIAGO CURAY YAULEMA

MILAGRO, JULIO 2022

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor de Proyecto de Investigación, nombrado por el Comité Académico del Programa de Maestría en Administración Pública de la Universidad Estatal de Milagro.

CERTIFICO

Que he analizado el Proyecto de Investigación con el tema **COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LÁTEX DE Argemone mexicana (CARDIO SANTO)** elaborado por el **CARLOS SANTIAGO CURAY YAULEMA**, el mismo que reúne las condiciones y requisitos previos para ser defendido ante el tribunal examinador, para optar por el título de **MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA**

Milagro, 29 de junio del 2022



Firmado electrónicamente por:
**HAYDELBA TRINIDAD
D ARMAS REGNAULT**

Dc. Ph Ch. D ARMAS REGNAULT HAYDELBA TRINIDAD

C.I: 096158190-7

Declaración de autoría de la investigación

El / la autor/a de esta investigación declara ante el Comité Académico del Programa de Maestría en Química Aplicada de la Universidad Estatal de Milagro, que el trabajo presentado de mi propia autoría, no contiene material escrito por otra persona, salvo el que está referenciado debidamente en el texto; parte del presente documento o en su totalidad no ha sido aceptado para el otorgamiento de cualquier otro Título de una institución nacional o extranjera

Milagro, 29 de Junio del 2022



Firmado electrónicamente por:
**CARLOS SANTIAGO
CURAY YAULEMA**

FIRMA

C.I. 060302830-9

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE DEFENSA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA

En la ciudad de Milagro, a los quince días del mes de julio del dos mil veintidos, siendo las 10:00 horas, bajo la modalidad PRESENCIAL, comparece el/la maestrante, DR. CURAY YAULEMA CARLOS SANTIAGO, a defender el Trabajo de Titulación (PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO) cuyo tema es: "COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LÁTEX DE CNICUS BENEDICTUS (CARDO SANTO)", ante el Tribunal integrado por: Dc Ph Ch. D ARMAS REGNAULT HAYDELBA TRINIDAD, Tutor/a del trabajo de titulación; Dr. ECHAVARRIA VELEZ ANA PAOLA, en calidad de Presidente/a del Tribunal; y, Dr. HERNANDEZ DOMINGUEZ CARMEN SAGRARIO, docente que actúa como Secretario/a del Tribunal.

Una vez examinado la/el maestrante compareciente, de acuerdo a las disposiciones legales, durante el tiempo reglamentario, obtuvo la calificación de: **100.00** equivalente a: **EXCELENTE**, el Tribunal Examinador le confirió la aprobación de la sustentación de su trabajo de titulación. Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto los miembros integrantes de este tribunal, y la/el maestrante sustentante, siendo las 11:00.



Firmado electrónicamente por:
HAYDELBA TRINIDAD
D ARMAS REGNAULT

Dc Ph Ch. D ARMAS REGNAULT HAYDELBA TRINIDAD
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
ANA PAOLA
ECHAVARRIA
VELEZ

Dr. ECHAVARRIA VELEZ ANA PAOLA
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
CARMEN SAGRARIO
DOMINGUEZ

Dr. HERNANDEZ DOMINGUEZ CARMEN SAGRARIO
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
CARLOS SANTIAGO
CURAY YAULEMA

DR. CURAY YAULEMA CARLOS SANTIAGO
MAGISTER

DEDICATORIA

La vida nos pone en el camino a las personas indicadas para cada etapa de nuestra vida, es por ello que en esta ocasión quiero dedicar este trabajo al ser de LUZ que cada día guía mi vida, a pesar de su ausencia, mi PADRE; a la mujer que constantemente lucha día a día y que con su ejemplo seguimos adelante con tenacidad, esfuerzo y honestidad, mi MADRE; A mis hermanos que hicieron posible esta etapa de mi vida y que por su apoyo se logró la culminación de esta etapa formativa; A mis hijos Santiago Joel, Carla Salomé y Carly Sarahí por existir y ser una parte de mí, para ellos que son una inspiración en mi vida; A mi compañera de vida por apoyarme incondicionalmente y que además ha sabido comprender mis errores y aciertos.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a mi tutora de tesis la PhD. Haydelba D'Armas que ha sabido guiarme con sus conocimientos para la realización del presente trabajo. A cada uno de los miembros de mi familia que me ha inspirado a seguir adelante y superar los obstáculos. Para todas las personas que a pesar de las vicisitudes presentadas me han apoyado directa e indirectamente, un cordial y merecido agradecimiento.

Cesión de derechos de autor

Sr. Dr.

Jorge Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Mediante el presente documento, libre y voluntariamente procedo a hacer entrega de la Cesión de Derecho del Autor del Trabajo realizado como requisito previo para la obtención de mi Título de Cuarto Nivel, cuyo tema fue **COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL LÁTEX DE Argemone mexicana (CARDO SANTO)**, y que corresponde a la Dirección de Investigación y Posgrado.

Milagro, 29 de junio del 2022



Firmado electrónicamente por:
CARLOS SANTIAGO
CURAY YAULEMA

FIRMA

C.I. 060302830-9

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
EL PROBLEMA	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1.1. Problematización	3
1.1.2. Delimitación del problema	3
1.1.3. Formulación del problema	4
1.2. OBJETIVOS	4
1.2.1. Objetivo General	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II	6
2.1. MARCO TEÓRICO	6
2.1.1 GENERALIDADES DE LA PLANTA	6
2.1.2 Valoración de principios activos y metabolitos secundarios en plantas	7
2.1.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO	8
2.1.3.1 Tamizaje Fitoquímico	8
2.1.4 Cromatografía	9
2.1.4.1 Cromatografía en capa fina	9
2.1.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	10
2.1.4.3 Cromatografía de Gases	11
2.1.4.4 Espectrometría de masas	12
2.1.4.5 Espectroscopía Infrarrojo	13
2.1.5 Compuestos fitoquímicos	14
2.1.5.1 Alcaloides	15
2.1.5.2 Flavonoides	15
2.1.5.3 Esteroles	16
2.1.5.4 Saponinas	16
2.1.5.5 Sesquiterpenlactonas	17
2.1.5.6 Cumarinas	17

2.1.5.7 Quinonas	17
2.1.5.8 Taninos	18
2.1.5.9 Terpenos.....	18
2.1.6 Actividad biológica	18
2.1.6.1 Antibiograma o prueba de Kirby Bauer	19
2.1.7 HONGOS	20
2.1.7.1 <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	21
2.1.7.2 <i>CLADOSPORIUM SPP.</i>	21
CAPÍTULO III	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Tipo de estudio.....	22
3.2 Lugar de investigación.	22
3.3 Identificación de la planta.....	22
3.4 Preparación del material Vegetal.	22
3.5 Extracción del látex y obtención de los extractos.....	23
3.6 Determinaciones físico-químicas	23
3.6.1 pH.	23
3.6.2 Índice de refracción.....	23
3.6.3 Densidad.....	24
3.7 Determinación en ESPECTROFOTÓMETRO INFRARROJO FT-IR	24
3.8 Cromatografía de gases y espectrometría de masas.....	25
3.9 Tamizaje Fitoquímico.	26
3.9.1 Descripción de las pruebas químicas.	28
3.9.1.1 Ensayo de Sudan.....	28
3.9.1.2 Ensayo de Dragendorff	29
3.9.1.3 Ensayo de Mayer	29
3.9.1.4 Ensayo de Wagner	29
3.9.1.5 Ensayo de Baljet	29
3.9.1.6 Ensayo de Borntrager	30
3.9.1.7 Ensayo de Liebermann-Burchard	30
3.9.1.8 Ensayo de catequinas.....	30
3.9.1.9 Ensayo de resinas	31

3.9.1.10 Ensayo de Fehling	31
3.9.1.11 Ensayo de la espuma	31
3.9.1.12 Ensayo del cloruro férrico	31
3.9.1.13 Ensayo de Shinoda.....	32
3.9.1.14 Ensayo de antocianidinas	32
3.9.1.15 Ensayo de mucílagos.....	33
3.9.1.16 Ensayo de principios amargos y astringentes.....	33
3.10 Actividad Biológica	33
3.10.1 Preparación del agar.....	33
3.10.2 Método de siembra.	34
3.10.3 Método Kirby – Bauer	34
CAPÍTULO IV.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1.1 concentración de los extractos.....	37
4.2 Pruebas Físico – Químicas y organolepticas	38
4.3 análisis y perfil fitoquímico	39
4.4 Espectro InfrarRojo	41
4.5 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	44
4.5.1 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS	44
4.6 cromatografía de gases acoplado a un cromatógrafo de masas (CG-EM). 47	
CAPITULO V.....	55
5.1. CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	6
Taxonomía de la especie	
Cuadro 2	27
Pruebas químicas realizadas al extracto etanólico del látex de <i>A. mexicana</i> .	
Cuadro 3	27
Pruebas químicas realizadas al extracto acuoso del látex de <i>A. mexicana</i>	
Cuadro 4	34
Masa de material vegetal fresco usado para la extracción del látex-extracto acuoso.	
Cuadro 5	35
Masa de material vegetal fresco usado para la extracción del látex-extracto etanólico	
Cuadro 6	36
Látex vs solvente utilizado	
Cuadro 7	37
Análisis organoléptico de los extractos de <i>A. mexicana</i> .	
Cuadro 8	37
Análisis físicos de los extractos del látex de <i>A. mexicana</i> .	
Cuadro 9	38
Familias de metabolitos secundarios detectados en el látex de <i>A. mexicana</i> mediante el tamizaje fitoquímico.	
Cuadro 10	42
Longitud de onda vs %transmitancia del espectro IR.	
Cuadro 11	44
Actividad Antifúngica del látex de <i>Argemone mexicana</i>	
Cuadro 12	46
Compuestos identificados en el extracto acuoso del látex de <i>A. mexicana</i>	
Cuadro 13	48
Compuestos identificados en el extracto etanólico del látex de <i>A. mexicana</i>	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1
Cardo santo

Figura 2
Protopina

Figura 3
Cromatografía en capa fina

Figura 4
Esquema de una cromatografía líquida de alta resolución

Figura 5
Esquema de un cromatógrafo de gases

Figura 6
Esquema de un espectrómetro de masas

Figura 7
Esquema de espectroscopia infrarroja cercana

Figura 8
Estructura general de una cumarina

Figura 9
Espectro infrarrojo del látex de *A. mexicana*

Figura 10.
Cepas de *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp* bioensayadas.

Figura 11.
Siembra de microorganismos en agar PDA y Saubourad.

Figura 12.
Halos de inhibición obtenidos para la actividad antifúngica de los extractos del látex de *A. mexicana*

Figura 13.
Perfil cromatográfico del extracto acuoso del látex de *A. mexicana*

Figura 14.
Perfil cromatográfico del extracto etanólico del látex de *A. mexicana*.

RESUMEN

Ecuador cuenta con una amplia diversidad de especies vegetales que han sido usadas como medicina tradicional, entre ellas la especie *Argemone mexicana* (Cardo Santo), la cual se encuentra distribuida en varias zonas de la sierra central, el látex es usado en forma tópica, de manera directa y en emplastos, debido a que presenta propiedades antifúngicas. El presente trabajo de investigación se enfoca en la caracterización e identificación de las especies químicas presentes en el látex de dicha especie, para lo cual se obtuvieron dos extractos (acuoso y etanólico). Se realizaron cortes en la planta y mediante jeringuillas esterilizadas se extrajo el látex para su posterior caracterización por medio de un tamizaje fitoquímico, que es un análisis químico referencial; y por medio de CG-EM (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas). Paralelamente, se realizaron pruebas de bioactividad, mediante la técnica de Kirby Bauer, en dos cepas de hongos *Botrytis cinerea* y *Cladoosporium spp*, y con dos medios de cultivo (agar PDA y Saubourad), donde se logró comprobar la actividad antifúngica del extracto acuoso del látex a concentraciones de 10 μ l y 20 μ l del extracto, mediante la observación evidente de la formación de halos de inhibición bien definidos. Utilizando los metabolitos secundarios identificados por cromatografía de gases-detector de masas se realizó una comparación de sus estructuras químicas y bioactividad con trabajos similares reportados en la literatura, lo que permitió atribuirle la actividad antifúngica a los compuestos que podrían ser responsables de la actividad biológica.

Palabras claves: *Argemone mexicana* Cardo Santo), Cromatografía de gases-espectroscopía de masas, actividad biológica, tamizaje fitoquímico, Kirby Bauer.

ABSTRACT

Ecuador has a wide diversity of plant species that have been used as traditional medicine, including the Mexican Argemone species (Cardo Santo), which is distributed in various areas of the central highlands, latex is used topically, directly and in plasters, because it has antifungal properties. The present research work focuses on the characterization and identification of the chemical species present in the latex of said species, for which two extracts (aqueous and ethanolic) were obtained. Cuts were made in the plant and the latex was extracted using sterilized syringes for its subsequent characterization by means of a phytochemical screening, which is a referential chemical analysis; and by means of GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry). At the same time, bioactivity tests were carried out, using the Kirby Bauer technique, in two strains of fungi *Botrytis cinerea* and *Cladoosporium* spp, and with two culture media (PDA and Saubourad agar), where it was possible to verify the antifungal activity of the aqueous extract of the latex at concentrations of 10 μ l and 20 μ l of the extract, through the evident observation of the formation of well-defined inhibition halos. Using the secondary metabolites identified by gas chromatography-mass detector, a comparison of their chemical structures and bioactivity with similar works reported in the literature was made, which allowed attributing the antifungal activity to the compounds that could be responsible for the biological activity.

Keywords: Argemone mexicana (Cardo Santo), gas chromatography-mass spectroscopy, biological activity, phytochemical screening, Kirby Bauer.

INTRODUCCIÓN

Ecuador tiene una superficie de 280.000 km² y alberga una gran diversidad vegetal, 18.198 especies de plantas vasculares aproximadamente, esto es debido a los diferentes pisos climáticos con los que el país cuenta, es por ello que las plantas han sido utilizadas desde la antigüedad como un recurso al alcance del ser humano para la alimentación y como alternativa de tratamiento de varias enfermedades en humanos, animales y plantas.

En nuestro país las plantas tienen varios usos, que va enfocados desde alimento, medicina alternativa y/o aplicaciones fitopatológicas, esto en la actualidad ha ido en aumento, a pesar de ello, pocas especies de vegetales han sido estudiadas mediante parámetros científicos y teniendo en cuenta normas éticas definidas que sustenten estas aplicaciones.

En los últimos años, se ha observado una tendencia creciente en la investigación sobre los especies vegetales que presenten propiedades antifúngicas, pese a ello, el desconocimiento en la aplicación de alternativas antifúngicas conlleva, en la mayoría de los casos, a aplicaciones inadecuadas de productos antifúngicos, que pueden disminuir la producción y encarecer productos en el caso de que hongos ataquen a especies agrícolas y/o a una inadecuada prescripción médica en caso de que los hongos afecten al ser humano.

Uno de los microorganismos que más incidencia tiene en afecciones a humanos, animales y plantas son los hongos, esto se traduce en costosos métodos de control, por lo tanto, las alternativas de productos antifúngicos deben ser evaluadas correctamente, con el fin de establecer parámetros y entornos reales de una afección y de esta manera optimizar su aplicación, las pruebas de actividad biológica antifúngica permite establecer condiciones de aplicación y de esta manera dinamizar la interacción entre especies propias de la región.

El presente trabajo presenta un estudio de la composición química presente en el látex de la planta *Argemone mexicana* (Cardo Santo) y su posible actividad anti fúngica, lo que conduce a sugerir el uso de esta especie como una alternativa para tratamientos anti fúngicos.

Por medio de la identificación de los compuestos químicos presentes en el látex de la planta, se definen cuales son los metabolitos secundarios responsables de la bioactividad observada, en el caso de que la planta muestre propiedades anti fúngicas. Mediante la prueba del antibiograma basada en el método Kirby Bauer se determina la actividad antifúngica del extracto del látex de *Argemone mexicana* frente a dos cepas de hongos: *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp.*

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1. Problematización

En Ecuador se desconoce en cifras reales sobre la incidencia de problemas relacionados con hongos, pero aproximadamente 300 millones de personas de todas las edades sufren de una infección fúngica grave cada año en todo el mundo, en el caso de la agricultura los hongos pueden afectar pre o post cosecha a verduras, hortalizas frutas y cereales, ocasionando pérdidas cuantiosas, no solo en el aspecto económico, sino también en el aspecto de alteraciones biológicas y químicas en las propiedades de ciertas especies vegetales.

La búsqueda imperante para diversas patologías que pueden presentar la presencia de hongos resulta primordial, ya que su presencia que pueden afectar directa o indirectamente al ser humano.

Los tratamientos antifúngicos recomendados, resultan en la mayoría de los casos costosos y de largo plazo, la planta *Argemone mexicana* (Cardo Santo) puede presentar una alternativa natural para el tratamiento de afecciones provocadas por hongos. Esta especie vegetal es encontrada en todo el callejón interandino en varios países de Latinoamérica, en tal sentido el presente estudio tiene como finalidad determinar la posible actividad antifúngica y los compuestos químicos que pueden ser responsables de esta actividad biológica.

1.1.2. Delimitación del problema

La presente investigación se llevó a cabo durante un lapso aproximado de 60 días, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; específicamente en los laboratorios de Química Instrumental,

Microbiología y Fitoquímica, se realizaron espectroscopía IR a los extractos de látex de *Argemone mexicana*, además de la actividad antifúngica por el método de Kirby Bauer. En el Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIBE) de la ESPOL, se realizaron los análisis de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

1.1.3. Formulación del problema

El uso de plantas medicinales es una de las alternativas principales para el tratamiento de diversas patologías tanto en humanos como en especies vegetales, sin embargo el desconocimiento de los componentes presentes en una planta conduce directamente a un uso inadecuado y/o a obviar propiedades potenciales de las mismas. Las propiedades y características de una planta agregan un valor a su composición química y pueden generar una alternativa de tratamiento.

Actualmente, no se ha realizado un estudio del látex presente en la especie *Argemone mexicana*, por lo que se busca encontrar una alternativa de uso para el tratamiento de afecciones causadas por hongos y comprobar sus propiedades antifúngicas.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la composición química y la actividad antifúngica del *Argemone mexicana* (Cardo Santo)

1.2.2. Objetivos Específicos

Identificar los compuestos químicos o metabolitos secundarios presentes en el látex extraído del tallo y hojas de la planta.

Analizar la actividad antifúngica mediante la técnica Kirby Bauer frente a cepas de *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp.*

1.3. JUSTIFICACIÓN

El aumento en el uso de especies naturales, para diferentes afecciones en humanos, animales y plantas, desde el ámbito alimenticio hasta el uso de especies como alternativa medicinal ha desencadenado en los últimos años la imperiosa necesidad del estudio de la composición química de plantas. La falta de estudios ha desencadenado que varias especies sean usadas de manera empírica, incluso a generado una inadecuada explotación de especies vegetales propias de una zona, por lo tanto, el conocimiento de los diferentes compuestos que posee una especie implica adjuntar un valor agregado a las mismas, además, su uso se ejecuta de manera correcta y óptima.

La presencia de hongos indiferentemente al organismo que esté afectando, representa uno de los problemas más comunes que demanda una primordial atención; las diferentes alternativas para este tipo de problema, en la mayoría de los casos, implica un gasto excesivo y en varias ocasiones ineficaz; en este sentido la presente investigación facilita una alternativa para tratar afecciones causadas por hongos. Las cepas de los hongos *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp*, representan un grupo común de microorganismos causantes de varias patologías, por lo que mediante las pruebas de actividad antifúngica se determinó la actividad biológica del látex de la planta *Argemone mexicana*.

La investigación de los grupos de compuestos presentes en el látex de *Argemone mexicana* permite tener una idea concreta de los metabolitos secundarios responsables de esta bioactividad, generando una opción de tratamiento natural y/o su uso adecuado.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1 GENERALIDADES DE LA PLANTA

Cuadro 1. Taxonomía de la especie estudiada.

TAXONOMIA	
Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
Filo:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Magnoliidae</i>
Orden:	<i>Papaverales</i>
Familia:	<i>Papaveraceae</i>
Subfamilia:	<i>Papaveroideae</i>
Tribu:	<i>Papavereae</i>
Género:	<i>Argemone L.</i>
Especie:	<i>A. mexicana L.</i>

La planta *Argemone mexicana*, es una hierba anual erecta, es una especie de amapola espinosa ampliamente dispersada en todo el mundo, con flores de 4 a 7 cm de diámetro de color amarillo brillante, tallo glabro, glauco espinoso, las hojas sésiles, fruto capsular oblongo, puede medir hasta 1,2 m de altura es extremadamente resistente a sequias y a suelos pobres desde el punto de vista nutricional, es por ello que es denominada como “mala hierba”, posee un látex de color amarillo brillante, presenta propiedades venenosas para animales de pasto y de corral, sus semillas contienen aproximadamente del 22 al 33% de aceite no comestible denominado aceite de argemone, conteniendo aceites como la sanguinarina y dimetiloxisanguinarina. Tiene en su composición alcaloides como isoquinolina, dehidrocoridalmina, jatrorrizina, columbamina y oxiberbetina, el látex contiene berbetina y protopina, además de varios alcaloides de tipo benzofenantridina y bencilisoquinolina, al entrar en contacto con el oxígeno y luz sufre procesos de pardeamiento tornándose de color negro. (S. Singh, Singh,

Singh, et al., 2010)



Figura 1. Cardo santo

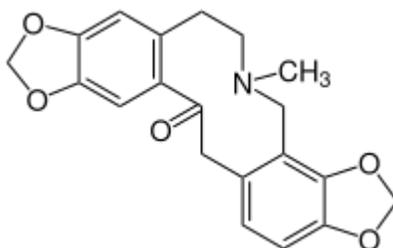


Figura 2. Protopina

2.1.2 VALORACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS Y METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

Valorar e identificar los principios activos o metabolitos secundarios en especies vegetales, permite establecer y determinar su calidad y/o pureza, la calidad o cantidad de un metabolito secundario presente en una planta se traduce en su valor específico, es decir, su potencial uso para un determinado tratamiento. Una vez realizada la identificación de los principios activos o metabolitos secundarios se realiza una comparación de una muestra representativa de la droga problema frente un espécimen auténtico, confirmando el resultado con la información suministrada por la literatura científica que refiere su equivalencia.

En la ejecución de un estudio de perfil fitoquímico, las diferentes actividades

realizadas en un laboratorio tienen por objetivo a la identificación y evaluación de principios activos o metabolitos secundarios mediante el empleo de los métodos físico-químicos, tanto cualitativos como cuantitativos y algunos métodos de purificación y aislamiento, mediante métodos aprobados y comprobados científicamente.

2.1.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Las especies vegetales cumplen un proceso de fotosíntesis, como resultado de ello se producen los denominados “metabolitos primarios” como son proteínas, carbohidratos, lípidos y además se sintetizan otros compuestos químicos denominados “metabolitos secundarios” los cuales se asume que se emplean como mecanismo de defensa contra la depredación de animales, insectos o microorganismos. Estos compuestos se pueden clasificar y pertenecen a diferentes grupos como son: aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles y polifenoles, flavonoides, glucósidos, gomas, iridoides, lignanos, mucílagos, pectinas, quinonas, saponinas, taninos y terpenos, xantonas, flavonas y flavonoides, terpenoides (Castillo Olvera et al., 2017).

El objetivo fundamental del análisis fitoquímico es determinar la presencia de metabolitos en una especie vegetal, éste análisis comprende varias técnicas de caracterización desde el tamizaje fitoquímico hasta técnicas instrumentales como la cromatografía de gases, cromatografía de capa delgada, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrofotometría de masas, espectroscopia infrarroja, entre otras. Las técnicas mencionadas constituyen una herramienta para la investigación del potencial biológico y farmacológico que puede poseer una especie vegetal (Castillo Olvera et al., 2017).

2.1.3.1 Tamizaje Fitoquímico

Actualmente, para la determinación de la composición química de una planta, se

utilizan técnicas analíticas avanzadas, sin embargo, los ensayos fitoquímicos son una forma confiable de realizar un análisis cualitativo, ya que proyectan una información básica y preliminar acerca de su composición química. El tamizaje fitoquímico se basa en la obtención de extractos de planta en solventes como agua, alcohol y éter. Este método se basa en la aplicación de pruebas químicas de identificación cualitativas de los distintos grupos funcionales, los resultados de las reacciones son reportados como positivo (+) o negativo(-) para el metabolito secundario que se trate (Castillo Olvera et al., 2017).

2.1.4 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una de las aplicaciones más importantes en la Química analítica, que se usa para separar mezclas complejas, constituye un método de separación excepcionalmente versátil de carácter físico-químico, es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva (Corzo, 2019) que se compone de dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido, la fase móvil puede estar constituido de un líquido, un fluido súper crítico o un gas el cual es portador de la mezcla. Esta técnica emplea diferentes procedimientos, entre los más importantes son cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, la cromatografía en columna y la cromatografía de gases (Castillo Olvera et al., 2017).

2.1.4.1 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina es un método muy valioso utilizado en química basado en la separación de componentes por efecto de la migración diferencial, es usada para la separación y análisis de muestras que presentan una amplia variedad mezclas. Se puede utilizar para separar mezclas de iones inorgánicos, moléculas orgánicas y compuestos biorgánicos tales como pigmentos, lípidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares (BIOTED, 2013).

La muestra que va a ser analizada se aplica uniformemente por medio de un capilar sobre la superficie adsorbente inerte que puede ser sílica o alúmina. Esta técnica constituye una herramienta importante en la determinación de componentes químicos de una mezcla, ya que permite proporcionar información sobre la naturaleza homogénea de una mezcla de componentes y garantiza que las sustancias de una actividad biológica o química estén presentes.

A continuación, se puede observar un esquema del procedimiento.

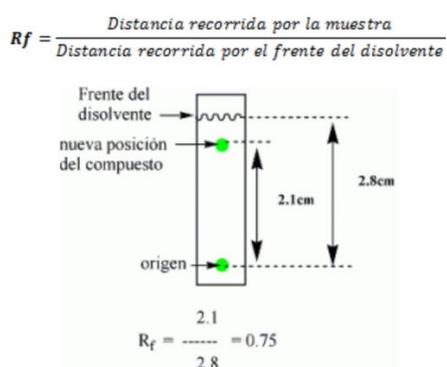


Figura 3. Cromatografía en capa fina

2.1.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC siglas por su nombre en inglés), es una técnica utilizada para separar los componentes de mezclas complejas con el propósito de identificarlas, cuantificarlas y purificarlas, consiste en dos fases; una fase estacionaria no polar denominada columna y una fase móvil. La fase estacionaria generalmente es sílica y la fase móvil actúa de portador de la muestra, el compuesto pasa por una columna cromatográfica a través de la fase estacionaria por medio de un líquido que es introducido a alta presión, la muestra es colocada en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente, esto depende de la interacción química y física con la fase estacionaria.

Esta una técnica de determinación que puede ser considerada como una de las técnicas de purificación más versátiles y confiables, tiene una amplia aplicación en la investigación en diferentes ramas tales como química, bioquímica, alimentos, entre otras.

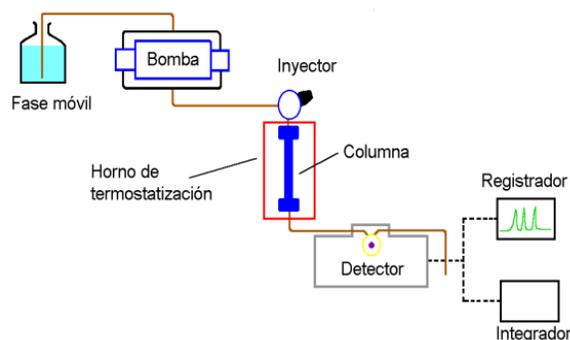


Figura N° 4. Esquema de una cromatografía líquida de alta resolución (Hernández, 2017).

2.1.4.3 Cromatografía de Gases.

Es una técnica básicamente de separación, que consiste en la volatilización de una muestra que se inyecta en la cabeza de un mechero de una columna cromatográfica. La principal diferencia que existe entre los otros tipos de cromatografía es que la fase móvil no interactúa con las moléculas de la sustancia a analizar; la única función es la de transportar la sustancia a analizar a través de la columna. El desarrollo de instrumentación para la realización de esta técnica permite operar en continuo, obteniendo mayor eficiencia y eficacia en la separación por elución (Parrales et al., 2012; Yagües, 2008).

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC). La cromatografía gas-líquido es la técnica que se utiliza más ampliamente, denominándose simplemente cromatografía de gases (GC).

La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Este consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno) y el detector.

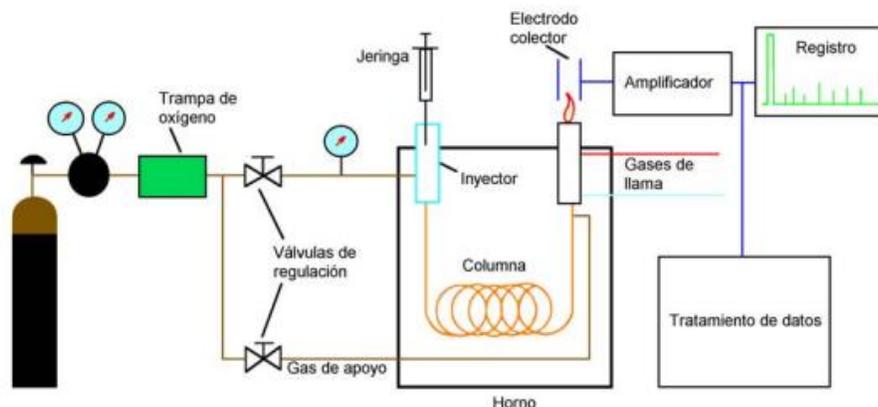


Figura 5. Esquema de un cromatógrafo de gases.

2.1.4.4 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (*Mass Spectrometry, MS*), es una técnica muy usada en el análisis de biomoléculas. Es una técnica de análisis químico cualitativo que en comparación con otras técnicas de espectrofotometría, ésta no utiliza radiación, por lo tanto, no debería ser considerada como una técnica espectroscópica, durante la obtención del espectro ocurren cambios químicos, con lo que la muestra utilizada se destruye y no puede ser recuperada (Araceli Peña-Álvarez & Alejandra Castillo-Alanís, 2015).

Un espectrómetro de masas está en la capacidad de desempeñar 4 funciones:

- 1) Debe ser capaz de volatilizar sustancias de diferente volatilidad.
- 2) En la muestra volatilizada debe tener la capacidad de originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa.
- 3) Los iones generados deben ser separados en función de su relación masa/carga.
- 4) Los iones separados, deber ser detectados y registra la información adecuadamente.

Debido a que el espectrofotómetro cumple estas cuatro funciones, este consta de cuatro partes más o menos independientes:

- 1) Sistema de introducción de muestras.
- 2) Fuente de iones.
- 3) Analizador para la separación de iones
- 4) Sistema detector y registrador.

El esquema de un espectrómetro de masas es el siguiente:

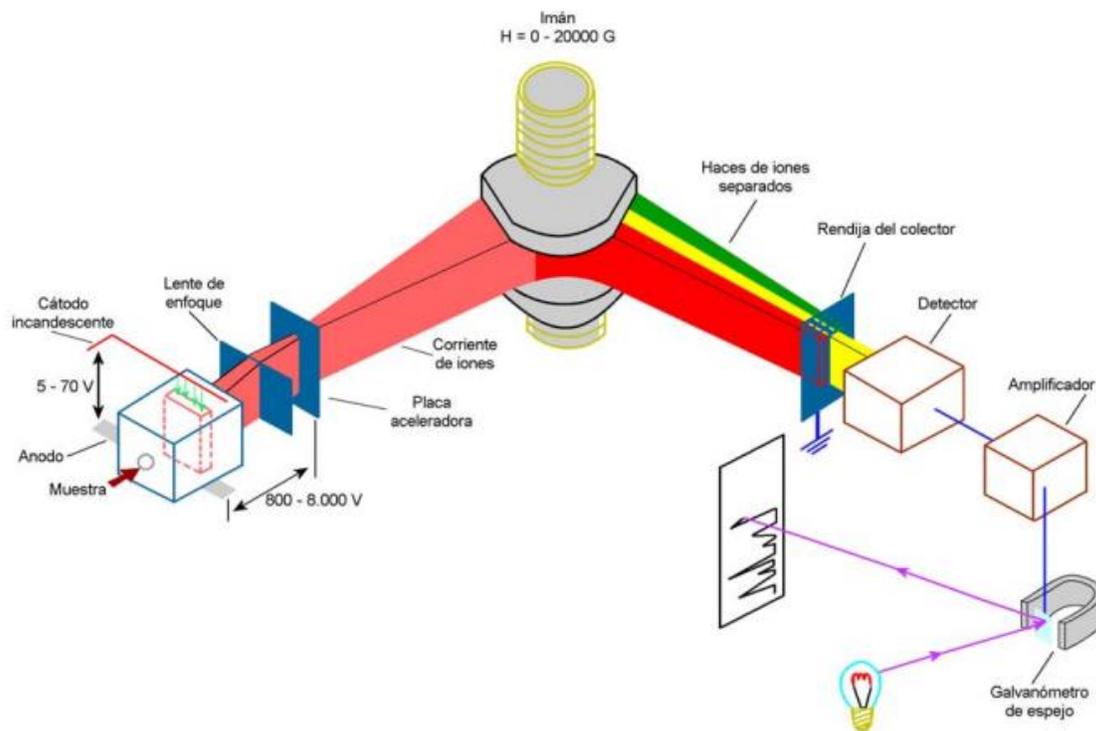


Figura 6. Esquema de un espectrómetro de masas

2.1.4.5 Espectroscopía Infrarrojo

La espectroscopia infrarroja NIRS (*Near InfraRed Spectroscopy*) es una técnica de determinación de grupos funcionales que estudia la interacción de la radiación electromagnética de origen infrarrojo con la materia.

El espectro infrarrojo electromagnético se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano, medio, y lejano, nombrados así por su relación con el espectro visible. El

infrarrojo lejano ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede usarse en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) puede usarse para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano ($14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) puede excitar vibraciones armónicas (Arias et al., 2020).

La tecnología NIR se basa principalmente en la aplicación de radiación infrarroja sobre una especie química, la cual, en función de su composición absorberá una cierta cantidad de energía. Este proceso cumple la ley de Lambert-Beer, de modo que la absorbancia (A) es directamente proporcional a la concentración de los distintos componentes de dicha muestra. La forma más habitual de cuantificar dicha absorción de energía es a partir de la medida de la energía reflejada ($A = \log(1/R)$) o transmitida ($A = \log(1/T)$) por la muestra, donde R y T son el valor de reflectancia o transmitancia respectivamente (Arias et al., 2020).

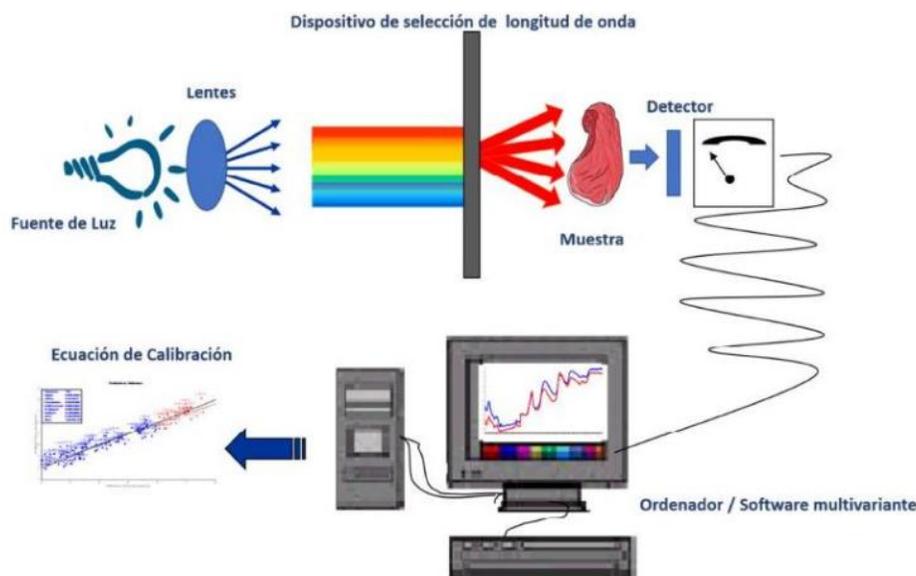


Figura 7. Esquema de espectroscopia infrarroja cercana

2.1.5 COMPUESTOS FITOQUÍMICOS

Los compuestos que pueden estar presentes en una planta pueden ser muy

diversos, iniciando desde los compuestos que son útiles para cumplir funciones fundamentales como soporte, alimentación, respiración, entre otras; a estos compuestos se les denomina metabolitos primarios y compuestos que sirven para otorgar una característica propia de la planta, color olor, sabor, entre otras a estos compuestos se les denomina metabolitos secundarios, cada una de estas sustancias químicas tienen su propia característica y para su análisis fitoquímico se agrupan en alcaloides, carbohidratos, flavonoides, proteínas y quinonas, glucósidos, saponinas, esteroides, fenoles, taninos, cumarinas, diterpenos y triterpenos, entre otros. Para tener una noción más clara, describiremos a cada uno de ellos.

2.1.5.1 Alcaloides

Los alcaloides pertenecen a un grupo de compuestos químicos con una presencia amplia en la naturaleza, en su estructura contienen uno o más átomos de nitrógeno en un anillo heterocíclico, de carácter levemente básico. Pueden ser generados por funciones de organismos vivos como animales (peces y ranas del género *Phyllobates*), plantas (más de 100 familias fanerógamas y en menor proporción criptógamas) o bacterias (ergot), la clasificación se da en base a su estructura o función. Estos compuestos son generados en los tejidos de la planta que tienen intensa actividad celular, es decir, hojas, raíces y/o semillas, variando su concentración y naturaleza, por lo regular son catalogados como derivados de aminoácidos y tienen una alta actividad farmacológica, son los primeros compuestos en ser estudiados en las plantas (Arango, 2008).

2.1.5.2 Flavonoides

Los flavonoides son considerados fitonutrientes, son los responsables de los intensos colores de frutas y verduras, se han caracterizados más de 6000 tipos de flavonoides, se encuentran en plantas vasculares en forma de glicósidos y tienen un alto poder antioxidante (Cartaya & Reynaldo, 2001); son compuestos

polifenólicos con quince átomos de carbono cuya estructura consta de dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos, El esqueleto se representa por el sistema C6-C3-C6, en el cual tienen dos anillos aromáticos llamados A y B que están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden formar un tercer anillo. Se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y glicósidos, siendo las más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas las isoflavonas, las chalconas y auronas, algunos de ellos como la quercitina son más activos que otros (Castillo Olvera et al., 2017).

2.1.5.3 Esteroles

Los esteroides son compuestos que se encuentran distribuidos en los reinos: animal y vegetal, formando parte de la estructura de las membranas celulares y como precursores de hormonas, ácidos biliares y vitamina D. Se han descrito más de 200 tipos diferentes de esteroides encontrados en varias especies vegetales, entre los más abundantes se pueden citar: el β -sitosterol, campesterol y stigmasterol, lo que representa aproximadamente del 95-98% de los esteroides identificados en laboratorio (Jáuregui et al., 2011).

Los esteroides son compuestos cuya estructura presenta el sistema anular del ciclopentano perhidrofenantreno, metilos en los carbonos 10 y 13 y un radical lineal en el carbono 17. Se clasifican en fitoesteroides y fitoestanoles, presentan una estructura semejante al colesterol de origen vegetal (Castillo Olvera et al., 2017).

2.1.5.4 Saponinas

Son compuestos glicosídicos solubles en agua que tienen las propiedades de disminuir la tensión superficial del agua formando espuma abundante, es decir actúan como tensoactivos naturales, tienen un elevado peso molecular y elevada polaridad. La mayoría se ajustan a la fórmula general ($C_nH_{2n-8}O_{10}$). Las saponinas poseen diversas actividades biológicas, tales como antimicrobiana, antioxidante,

antiinflamatoria, hemolítica, anticancerígena (Puentes & Nelly, 2009).

2.1.5.5 Sesquiterpenlactonas

Son sustancias abundantes en la naturaleza, existen alrededor de 3000 estructuras conocidas. Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono, incluyendo una lactona α - β insaturada que teóricamente derivan de la unión cabeza-cola de tres fragmentos de isopreno y se considera biogenéticamente derivados del farnesil difosfato (Majeed et al., 2021), parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólido amargas que se encuentran en todas partes de las plantas, se derivan de los sesquiterpenos, compuestos lactónicos que se clasifican con base en su esqueleto carbocíclico como germacronólidos, guaianólidos, eudesmanólidos y pseudo-guaianólidos, entre otros (el sufijo ólido se refiere a la función lactona) (Majeed et al., 2021).

2.1.5.6 Cumarinas

Son compuestos derivados de la benzo- α -pirona, (lactonas insaturadas) que tienen una estructura C_6C_3 y son sintetizados por las especies vegetales por acción del ácido shikímico como la cumarina, la esculetina, umbeliferona y la escopoletina, son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopiran-2-ona. Se pueden clasificar en cumarinas simples, cumarinas complejas y cumarinas diversas (Martínez, 2020).

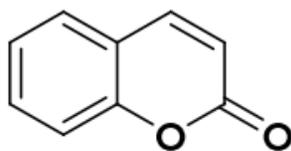


Figura 8. Estructura general de una cumarina

2.1.5.7 Quinonas

Las quinonas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, han sido estudiadas en plantas, hongos, bacterias y organismos

marinos. Son dicetonas cíclicas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles, siendo reversible esta reacción. Derivan su nombre de la *p*-benzoquinona como producto de oxidación del ácido quínico. Se pueden clasificar de acuerdo al sistema aromático en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, fenantraquinonas (Castillo Olvera et al., 2017).

2.1.5.8 Taninos

Este grupo de compuestos son bastante heterogéneos de masa molecular alta, químicamente se pueden definir como metabolitos secundarios derivados de plantas que pueden ser ésteres de ácido gálico o sus derivados unidos a una amplia variedad de poli oles, catequina o núcleos triterpenoides (Olivas-Aguirre et al., 2015). La característica principal de los taninos es su capacidad para formar complejos reversibles con las proteínas (Lara & Londoño, 2008). Se clasifican en taninos hidrosolubles, que son ésteres fácilmente hidrolizables formados por una molécula de azúcar unida a un variable de moléculas de ácidos fenólicos; y los taninos no hidrosolubles que tienen una estructura química similar a la de los flavonoides, algunos son conocidos como pro-antocinidinas porque por hidrólisis ácida producen antocianinas y leucocinidinas (Fitoquímica et al., 2008).

2.1.5.9 Terpenos

Los terpenos representan el grupo más abundante de los aceites vegetales, estos compuestos pueden ser llamados isoprenoides, ya que se derivan del isopreno (2-metilbutadieno), estos metabolitos son los responsables de aromas y sabores propios de una planta, mientras mayor sea la cantidad de oxígeno en la molécula, mayor será su aroma (Espinosa et al., 2016). Los terpenos se clasifican en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos (Bonkanka, 2007).

2.1.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica se puede catalogar como todos los efectos adversos o benéficos que puede causar un compuesto químico extraído de una especie vegetal y/o animal sobre los organismos vivos. La toxicidad es denominada como la principal clase de actividad biológica y es directamente relacionada con la cantidad suministrada de una sustancia.

Un material se considera bioactivo si éste tiene una interacción con efectos a nivel celular de organismos vivos manifestándose positiva o negativamente, teniendo en consideración que el perfil toxicológico es un pilar fundamental para el estudio de sustancias con actividad biológica.

Para realizar el estudio de una actividad biológica en la actualidad se realizan estudios y análisis basados en modelos celulares mediante los cuales se puede determinar en las sustancias de estudio capacidades antitumorales, sensibilidad celular de fármacos, sinergia farmacológica, análisis del ciclo celular e inducción a la muerte celular (apoptosis), genotoxicidad, ensayos clonogénicos, entre otros.

Una de las pruebas por la cual se puede determinar una actividad biológica es el antibiograma de discos o técnica Kirby Bauer.

2.1.6.1 Antibiograma o prueba de Kirby Bauer

El método Kirby-Bauer es útil para determinar la sensibilidad de una sustancia que puede tener propiedades antibacterianas, antimicóticas y/o quioterapéutico. Este método se denomina antibiograma.

Para esta técnica se debe seleccionar microorganismos aislados correctamente y dispersados o sembrados uniformemente sobre una placa agar, una vez que se obtiene un microorganismo desarrollado en la placa agar, se procede a colocar discos de papel filtro impregnados con la sustancia que se asume tiene una actividad biológica. La sustancia difundirá desde el papel filtro al agar de forma

radial. Se incuba la placa de 20 a 24 horas, a temperaturas en las cuales el microorganismo sobre el cual se desea tener un efecto positivo o negativo, se encuentre en condiciones óptimas de desarrollo. Los resultados se pueden expresar como: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R), y dependerá de varios factores como son:

- pH del medio de sembrado.
- concentración de la sustancia suministrada al microorganismo.
- sensibilidad del microorganismo frente a una sustancia.
- condiciones de incubación del agar-microorganismo.
- tamaño del inóculo.
- coeficiente de difusión agar-sustancia a estudio.
- Deterioro o mala aplicación de los discos en el agar.

La elección de los medios de siembra (agar) se debe realizar basados en las características propias de los microorganismos en los cuales se desea efectuar la prueba de actividad biológica, ya que esta técnica es solo cualitativa y depende directamente de las condiciones seleccionadas para la prueba.

2.1.7 HONGOS

Los hongos representan un grupo muy grande dentro de la biodiversidad en todos los ecosistemas presentes, el grupo es tan grande que resulta difícil presentar una clasificación real y concisa, sin embargo, pueden ser descritos como microorganismos filamentosos, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas y con pared celular constituida principalmente de quitina y celulosa. Se los puede dividir en hongos filamentosos y levaduras y su principal diferencia es que los hongos filamentosos crecen formando filamentos alargados, mientras que las levaduras pueden mantenerse en forma unicelular en su mayor parte de vida. Muchos de estos microorganismos tienen aplicaciones en biotecnología, en la medicina y la industria alimentaria, cabe anotar que muchos de ellos tienen su lado negativo, por ejemplo, su impacto en la agricultura debido a que algunos de ellos

son contaminantes en varias especies vegetales afectando directa o indirectamente la producción, entre ellos citaremos a los siguientes.

2.1.7.1 BOTRYTIS CINEREA

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno de mucha importancia, afecta a un sinnúmero de plantas hacienda uso de diferentes mecanismos de infección, es responsable de la denominada “podredumbre gris”(Benito et al., 2000), atacando en fases pro y post cosecha, es por ello que es considerado un patógeno de mucha incidencia en pérdidas de cultivos ya que puede atacar en cualquier estado de desarrollo de la planta. Para su control es necesario un conocimiento de los mecanismos de infección del hongo y de los mecanismos de defensa de la planta (Latorre et al., 2001).

2.1.7.2 CLADOSPORIUM SPP.

Cladosporium spp es un género de hongos aero transportados; es un hongo filamentoso que incluye mohos interiores y exteriores. Producen colonias color verde oliva a marrón o negras, muchas especies de *Cladosporium* se encuentran comúnmente en material vegetal vivo y muerto, pueden actuar como patógeno en plantas y/o sobre otros hongos, incluso puede presentar patologías en humanos y animales si la propagacion a sido óptima en estos organismos (*Cladorporium Spp.Pdf*, n.d.).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Hipotético/deductivo. Debido a que se tomaron en cuenta estudios discutidos en la literatura para formular la hipótesis y justificación. También, es analítico experimental, porque se obtuvieron datos mediante pruebas de laboratorio, los cuales fueron interpretados por comparación con análogos discutidos en la literatura científica para la misma planta o especies del mismo género o familia en otros países.

3.2 LUGAR DE INVESTIGACIÓN.

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA.

La recolección de muestras de la especie vegetal se realizó en la ciudad de Riobamba y la identificación de la planta la realizó el PhD en Biología William Patricio Ponce Yaulema.

3.4 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

Una vez localizada e identificada la planta, se procedió a limpiar la zona en donde se realizaron los cortes para la extracción del látex, esta extracción debió ser inmediata, debido a que el látex una vez que entra en contacto con el medio ambiente se torna de un color negro, por lo que se asume que tiene procesos de pardeamiento o reacciones de óxido/reducción.

3.5 EXTRACCIÓN DEL LÁTEX Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Materiales:

Bisturí estéril N° 3

Jeringuilla de 3ml y 5 ml.

Frascos ámbar 200 ml

Metodología.

Con un bisturí estéril, se procedió a realizar cortes en tallo y partes externas de la planta (hojas y flores), por medio de una jeringuilla se realizó la extracción del látex, sumergiendo el contenido en agua destilada y en etanol de 96° separadamente, se recogió el material vegetal para posteriormente pesar y tener una relación de la cantidad de planta utilizada para la extracción del látex, obteniéndose así los extractos acuoso y alcohólico para posterior análisis.

3.6 DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS

3.6.1 pH.

Se utilizó un pHmetro marca HANNA INSTRUMENTS modelo pH/ORP/ISE·CE y la determinación se la realizó de manera directa según las especificaciones del manual del equipo.

3.6.2 Índice de refracción

Para la determinación del índice de refracción se realizó a temperatura ambiente de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$

en un refractómetro KYOTO ELECTRONICS, el equipo se calibró con agua destilada siendo su índice de refracción en 1,3330.

3.6.3 Densidad

La densidad del extracto de látex se verificó determinando el peso del picnómetro seco en estufa hasta obtener peso constante, posteriormente es colocado 10 ml de cada extracto obtenido evitando la formación de burbujas en el interior, se procede a pesar y mediante calculo con la aplicación de la siguiente ecuación se realiza la determinación:

$$\delta = \frac{M_{ext} - M_v}{V}$$

En donde:

M_{ext} = masa del picnómetro mas el extracto

M_v = masa del picnómetro vacío

V = volúmen del extracto

3.7 DETERMINACIÓN EN ESPECTROFOTÓMETRO INFRARROJO FT-IR

Esta determinación se realiza por medio de un equipo Marca JASCO modelo FT/IR-4100 de la siguiente manera:

- 1.- Conectar el equipo y el ordenador a un tomacorriente de 110V.
- 2.- Proporcionar energía al equipo presionando el switch POWER ubicado en la parte posterior derecha.
- 3.- Encender el equipo presionando el switch POWER ubicado en la parte superior derecha del equipo y esperar cinco minutos hasta que los parámetros de análisis estén listos.
- 4.- Para iniciar el barrido encender el ordenador e ir a: Inicio/Todos los programas/ JASCO/ SpectraManager.
- 5.- Iniciar el programa SpectraManager y seleccionar Quick-Start.
- 6.- Limpiar con algodón y alcohol el área de muestra (Cristal de seleniuro de zinc, soporte y capuchón de tornillo) ubicada en la parte interior central del equipo.
- 7.- Realizar el Background al verificar la ausencia de sustancia en el área de muestra, cerrar la tapa del equipo y presionar el botón "START ubicado en la parte frontal.

- 8.- Realizar el barrido espectral colocando la muestra líquida (2 gotas) o sólida (polvo) sobre el cristal del área de muestra, quitar el seguro ubicado en la parte posterior, jalar hacia adelante el tornillo de ajuste, ajustarlo hasta que muestre fricción, cerrar la tapa y pulsar "START»
- 9.- Procesar el espectro utilizando el programa Spectra Analysis, corregir las escalas seleccionando el icono corregir la línea base seleccionando (ubicar la línea azul cercana a los puntos altos de los picos y seleccionar OK) y eliminar el CO₂ seleccionando el icono (intervalos automáticos, presionar OK)
- 10.- Identificar los picos más relevantes seleccionando el icono. Etiquetar los picos automáticamente asignando límites de lectura y presionar Apply o manualmente moviendo la línea vertical azul y dar click en Add. Eliminar los picos menos relevantes, seleccionando el número de onda de la parte izquierda y la opción Delete y seleccionar OK.
- 11.- Generar las líneas auxiliares seleccionando habilitar todas y pulsar OK.
- 12.- Guardar el archivo seleccionando: File / Save As. Y guardar el espectro como una imagen, seleccionando Edit/ Copy as/ Bitmap y pegar en un procesador de texto.
- 13.- Desajustar el tornillo de ajuste y repetir el paso 6
- 14.- Repetir los pasos 8, 9, 10, 11, 12 y 13 con todas las muestras.

3.8 CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La determinación se lo realizó en el Laboratorio de la CIBE de ESPOL, en un equipo Agilent Modelo 7890A GC System -5975C inert MSD With Triple Axis-Detector, con dimensiones HP -1 (19091Z-115) (50 m length x 0,320 mm Diam x 0,52 µm Film), el gas utilizado fue Helio gas. Los compuestos fueron identificados por comparación de los espectros existentes en la Biblioteca Digital de Espectros de Masas Wiley 9th Edition con 790 mil espectros + Biblioteca NIST 2011 con 243 mil espectros con nombres y estructuras químicas. La metodología pertenece a protocolos establecidos para uso exclusivo del laboratorio.

Condiciones de trabajo

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

Marca: Agilent Technologies

Columna: DB-5MS (30 m longitud × 0.25 mm Diámetro interno) y 0.25 micrómetros de espesor de película.

Gas de arrastre: Helio (He), Flujo: 1.2 ml/min

Temperatura de inyección: 250°C

Modo de inyección: Splitless

Temperatura inicial del horno: 70°C por 2 minutos

Gradiente del horno: 5°C/min

Temperatura final del horno: 300 °C por 6 minutos

Temperatura de transferencia: 300°C

Temperatura de la fuente de iones: 230°C

Temperatura del cuadrupolo: 150°C

Voltaje de electroionización: 70 eV

Rango de screening: 50-550 u.m.a.

Derivatización

Agente derivatizante: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), Sigma-aldrich.

Reacción de derivatización: 100 uL del agente derivatizante se agregaron en 1 mg de muestra seca y se colocaron en baño de agua a 80°C por 2 horas.

3.9 TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

Para la evaluación de la presencia de los tipos de familias de compuestos químicos o metabolitos secundarios se realizaron varias pruebas químicas cualitativas a los extractos elaborados del látex de la especie vegetal *Argemone mexicana*

Materiales

Gradilla.

Tubos de ensayo.

Pipetas 10 ml

Pipetas 1 ml.

Papel filtro.

Reverbero.

Extracto acuoso del látex *Argemone mexicana*.

Extracto etanólico del látex *Argemone mexicana*.

Cuadro 2. Pruebas químicas realizadas al extracto etanólico del látex de A.

	Ensayo	Metabolito secundario
	Ensayo de Catequinas	Catequinas
	Ensayo de Sudan	Compuestos grasos
	Ensayo de Resinas	Resinas
	Ensayo de Fehling	Azúcares reductores
	Ensayo de Baljet	Lactonas
	Ensayo de Libermann-Buchard	Triterpenos-Esteroides
Extracto etanólico	Ensayo de Cl ₃ Fe	Fenoles y Taninos
	Ensayo de Espuma	Saponinas
	Ensayo de Ninhidrina	Aminoácidos
	Ensayo de Bontrager	Quinonas
	Ensayo de Shinoda	Flavonoides
	Ensayo de Antocianidina	Antocianinos
	Ensayo de Dragendorff	Alcaloides
	Ensayo de Mayer	Alcaloides
	Ensayo de Wagner	Alcaloides

mexicana.

Cuadro 3. Pruebas químicas realizadas al extracto acuoso del látex de *A. mexicana*

	Ensayo	Metabolito secundario
Extracto acuoso	Ensayo de Fehling	Azúcares reductores
	Ensayo de Sudan	Compuestos grasos
	Ensayo de Cl_3Fe	Fenoles y Taninos
	Ensayo de Espuma	Saponinas
	Ensayo de Shinoda	Flavonoides
	Ensayo de Dragendorff	Alcaloides
	Ensayo de Mayer	Alcaloides
	Ensayo de Wagner	Alcaloides
	Ensayo de Mucílagos	Mucílagos
	Ensayo de Principios amargos	Principios amargos

3.9.1 Descripción de las pruebas químicas.

3.9.1.1 Ensayo de Sudan

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 ml de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente (Miranda, M. 2006).

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente (Miranda, M. 2006).

3.9.1.2 Ensayo de Dragendorff

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++) (Miranda, M. 2006).

3.9.1.3 Ensayo de Mayer

Se procedió de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, agitar y filtrar. Añadir 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++) (Miranda, M. 2006).

3.9.1.4 Ensayo de Wagner

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma (Miranda, M. 2006).

3.9.1.5 Ensayo de Baljet

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo (Miranda, M. 2006).

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 ml). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo; considerándose un ensayo positivo,

la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente (Miranda, M. 2006).

3.9.1.6 Ensayo de Borntrager

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo se disuelve en 1 ml de cloroformo. Añadir 1 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Agitar mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++), coloración roja (+++) (Miranda, M. 2006).

3.9.1.7 Ensayo de Liebermann-Burchard

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6 (Miranda, M. 2006).

Para tal fin, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo se disuelve en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 1 ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- Rosado-azul muy rápido.
- Verde intenso-visible, aunque rápido.
- Verde oscuro-negro-final de la reacción (Miranda, M. 2006).

3.9.1.8 Ensayo de catequinas

Para realizarlo, se tomó de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplicar la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha se aplicó una solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo (Miranda, M. 2006).

3.9.1.9 Ensayo de resinas

Para detectar este tipo de compuesto, adicionar 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo (Miranda, M. 2006).

3.9.1.10 Ensayo de Fehling

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo se disuelve en 1-2 ml de agua. Se adicionó 2 ml del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo (Miranda, M. 2006).

3.9.1.11 Ensayo de la espuma

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que, si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos (Miranda, M. 2006).

3.9.1.12 Ensayo del cloruro férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se le añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipopirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipopirogalotánicos (Miranda, M. 2006).

3.9.1.13 Ensayo de Shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen (Miranda, M. 2006).

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos (Miranda, M. 2006).

3.9.1.14 Ensayo de antocianidinas

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calentaron 2 ml del extracto etanólico por 10 min con 1 ml de HCl conc. Se dejó enfriar y se adicionó 1 ml de

agua y 2 ml de alcohol amílico. Se agitó y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo (Miranda, M. 2006).

3.9.1.15 Ensayo de mucílagos

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para esta determinación se tomó una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución se torna de una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo (Miranda, M. 2006).

3.9.1.16 Ensayo de principios amargos y astringentes

El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar (Miranda, M. 2006).

3.10 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En el presente trabajo se utilizará dos cepas diferentes de hongos: *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp.* Se trabajará con dos medios de cultivo Agar PDA (potato dextrose agar) y Sabouraud. Las cepas fueron previamente aisladas y colocadas en agar Sabouraud los cuales servirán como fuente directa para el sembrado de las cajas de control y las cajas de prueba de actividad biológica.

3.10.1 Preparación del agar.

Se lava correctamente todos los materiales de vidrio y se prepara los medios de cultivo a utilizar en este caso se va a utilizar 5 cajas Petri con agar PDA y 5 cajas Petri con agar Sabouraud. La información para la preparación del medio de cultivo se encuentra en la etiqueta de los frascos contenedores. Una vez que esta listo los

medios de cultivo y el material a utilizar para la siembra se precede a esterilizar mediante un autoclave TUTTNAUER 2340.

3.10.2 Método de siembra.

Una vez esterilizado el material y los medios de cultivo, en una cámara de flujo laminar, se colocaron de 20 a 25 ml de agar PDA y agar Sabouraud en las cajas Petri, se deja reposar hasta que el medio de cultivo se solidifique con la caja superior abierta para evitar condensación de vapor. En la caja que contiene la primera especie de hongo *Botrytis cinerea* por medio de un isopo, se realiza un estriado y con este isopo que contiene el hongo, se procede a realizar un estriado uniforme en las cajas petri que contiene el Agar PDA y Sabouraud cubriendo homogéneamente toda la caja. Con este método se procede para ambas cepas de hongos.

3.10.3 Método Kirby – Bauer

Una vez realizada la inoculación de cada cepa de hongo, en el medio de cultivo se procede a colocar 3 discos en los cuales se colocan 10 μ l y 20 μ l del extracto, estos discos se deben colocar con cuidado, procurando que la superficie del disco se encontrará asentado completamente en el medio de cultivo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXTRACCIÓN DEL LÁTEX

Para la obtención del extracto acuoso del látex se utilizó material vegetal fresco, se empleó doce partes del tallo y hojas con una masa de 22,8771 g y se extrajo un total de 1,197 g de látex; con este valor se procedió a dar un estimado de porcentaje de rendimiento para la obtención del extracto acuoso. La cantidad de látex contenida en la especie vegetal es limitada, una vez realizado un corte en una parte de la planta no segrega el látex permanentemente, se debe realizar un nuevo corte a otra sección de la planta para la obtención de látex.

Cuadro 4. Masa de material vegetal fresco usado para la extracción del látex-
extracto acuoso.

N° de muestra	Material vegetal fresco (g)	Cantidad de látex extraído para el extracto acuoso(g)
1	1,3568	0,071
2	3,3655	0,176
3	1,6647	0,087
4	0,9507	0,050
5	1,7550	0,092
6	4,9788	0,261
7	0,5492	0,029
8	1,4630	0,077
9	1,0107	0,053
10	3,8176	0,200
11	0,9623	0,050
12	1,0028	0,052
	22,8771	1,197 g
Masa total del material vegetal fresco (g)		24,0741

Para obtener la masa total del material fresco utilizado para la obtención del extracto acuoso, se sumó la masa del material fresco más la masa del látex extraído, esto dio un total de 24,0741g. Para tener un estimado de rendimiento se realizó una

relación entre el material fresco utilizado y el látex obtenido, utilizando la siguiente relación (Benítez-Benítez et al., 2020):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100$$

En donde %R hace referencia al porcentaje de rendimiento, W_i es la masa inicial del material vegetal fresco y W_f es la masa del material fresco extraído el látex.

El porcentaje de rendimiento de la extracción del látex de la especie vegetal es de 4,97 %, cabe recalcar que el rendimiento es referencial, ya que el látex extraído es resultado de las partes de la planta que fueron separadas y de la parte que se encuentra plantada.

Cuadro 5. Masa de material vegetal fresco usado para la extracción del látex-extracto etanólico

N° de muestra	Material vegetal fresco (g)	Cantidad de látex extraído para el extracto etanólico (g)
1	1,5871	0,080
2	2,3568	0,119
3	0,9854	0,050
4	3,1458	0,150
5	0,8754	0,044
6	2,8547	0,144
7	3,7412	0,189
8	2,2145	0,112
9	0,8421	0,042
10	0,8547	0,043
11	1,1549	0,058
12	1,0475	0,053
	21,6601	1,084
Masa total del material fresco (g)		22,7441

Para obtener el extracto etanólico se utilizó 22,7441 g de doce partes aéreas de la planta (tallos y hojas) de donde se obtuvieron 1,084 g de látex; la masa total del material fresco extraído resulta de la suma del material fresco más la masa del látex extraído. Con estos valores se obtuvo un rendimiento de extracción de látex para la obtención del extracto etanólico.

Para poder obtener un porcentaje de rendimiento se aplicó la relación entre la masa material fresco y la masa del material vegetal, luego de extraer el látex y utilizar la siguiente relación (Benítez-Benítez et al., 2020):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100$$

En donde %R hace referencia al porcentaje de rendimiento, W_i es la masa inicial del material vegetal fresco y W_f es la masa del material fresco extraído el látex.

Una vez aplicada esta relación se obtiene un rendimiento de 4,76%, este rendimiento es referencial, debido a que no se tiene la masa de la especie vegetal plantada.

4.1.1 CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS

De acuerdo a la cantidad de látex extraído se puede estimar la concentración de los extractos que se detalla a continuación:

Cuadro 6. Látex vs solvente utilizado

Tipo de Extracto	Masa de látex (g)	Masa del solvente (g)	Volumen de solvente (ml)	Concentración estimada (g/ml)
Acuoso	1.197	29,84	30	0,039

Etanólico	1,084	29,78	30	0,036
-----------	-------	-------	----	-------

La concentración estimada de los extractos se obtiene de la relación entre la masa de látex extraído frente a la masa del solvente utilizado; se procuró mantener valores similares de concentración para las diferentes determinaciones que se realizaron en el estudio.

4.2 PRUEBAS FÍSICO – QUIMICAS Y ORGANOLEPTICAS

Como primer tenemos la determinación de las pruebas organolépticas y nos brindan una información de las características de los extractos acuoso y etanólico, como el color el olor y el sabor.

Cuadro 7. Análisis organoléptico de los extractos del látex de *A. mexicana*.

Parámetros	Descripción	
	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Color	Oscuro	Amarillo Claro
Olor	Resinoso	Resinoso
Sabor	Amargo	Amargo Astringente

En los análisis organolépticos se evidencia una diferencia marcada en lo que respecta al color de los extractos, esto se debe a que una vez que el látex entra en contacto con el medio ambiente se torna de color oscuro, y puede ser debido al contacto del látex con el oxígeno debido a que éste podría estar inmerso de reacciones de oxidación o pardeamiento, no ocurriendo así en el extracto etanólico que mantiene el color propio del látex extraído.

Cuadro 8. Análisis físicos de los extractos del látex de *A. mexicana*.

Parámetro	Resultado		
	Blanco	Extracto alcohólico	Extracto Acuoso
pH	7.03	6.32	6.55
Índice de refracción	1.33299	1.36241	1.33322
Densidad relativa (g/ml)	1.001	0.987	0.991

Para la determinación de los análisis físicos de los extractos se utilizó como blanco agua destilada. Los valores de pH se encuentran en una escala neutra, esta valoración está estrechamente relacionada con la actividad biológica que pueden presentar los extractos, ya que un pH ácido extremo podría estar interactuando e influenciando en los resultados de la actividad antifúngica. El índice de refracción da una referencia de los carbohidratos presentes en la composición química del látex; se puede observar que en el índice de refracción del extracto etanólico el valor es alto en comparación con el extracto acuoso y es debido a que el alcohol etílico interfiere en el valor de esta medición, en datos teóricos se reporta un índice de refracción del alcohol etílico de 1,36. Los valores de la densidad relativa no varían significativamente en relación con el blanco que se utilizó para esta determinación.

4.3 ANÁLISIS Y PERFIL FITOQUÍMICO

Cuadro 9. Familias de metabolitos secundarios detectados en el látex de *A. mexicana* mediante el tamizaje fitoquímico.

Ensayo	Grupos de compuestos	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Sudan	Compuestos grasos	+++	+++
Catequinas	Catequinas	+	-
Resinas	Resinas	-	-
Fehling	Azúcares reductores	+++	+++
Baljet	Lactonas	++	-
Ensayo de Libermann-Buchard	Triterpenos-Esteroides	+	-
Ensayo de Cl ₃ Fe	Fenoles y Taninos	++	+++

Ensayo de Espuma	Saponinas	-	+
Ensayo de Bontrager	Quinonas	-	-
Ensayo de Shinoda	Flavonoides	-	++
Ensayo de Antocianidina	Antocianinas	-	-
Ensayo de Dragendorff	Alcaloides	+++	+++
Ensayo de Mayer	Alcaloides	++	++
Ensayo de Wagner	Alcaloides	++	+++
Ensayo de Mucílagos	Mucílagos	+	+
Ensayo de Principios amargos	Sustancias amargas	+++	+++

* + indica la posible presencia de metabolitos secundarios.

** - indica la posible ausencia de metabolitos secundarios.

Los resultados obtenidos en las pruebas de tamizaje fitoquímico, evidencian un alto contenido o posible presencia de compuestos grasos, azúcares reductores, compuestos fenólicos o taninos, alcaloides y compuestos amargos en ambos extractos (acuoso y etanólico). La presencia de alcaloides es muy común en la familia de las papaveráceas; se puede evidenciar resultados positivos para flavonoides, taninos, fenoles aminoácidos y carbohidratos; en estudios previos realizados se comprobó que el extracto etanólico de las flores de *A. mexicana* contienen alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos, y en el extracto acuoso no se evidenció ninguno de los metabolitos encontrados en el extracto etanólico (Joshi et al., 2013). Los resultados evidencian que los alcaloides predominan en el

látex de la especie investigada (*Argemone mexicana*), seguido de los fenoles y taninos, y los triterpenos y esteroides en menor proporción.

Los estudios fitoquímicos realizados en investigaciones anteriores de distintas partes de la planta *A. mexicana* reportan la presencia de alcaloides como berberina, protopina, bencilisoquinolina y benzofenantridina, además de cuatro alcaloides bencilisoquinolinicos tales como como dehidrocoridalmina, jatrorrhizina, columbamina, y oxiberberina, que se han aislado de la planta entera (*Quaternary Alkaloids of Argemone Mexicana _ Enhanced Reader.Pdf*, n.d.). El alcaloide berberina ha mostrado actividad contra las infecciones por hongos especialmente en *Candida albicans* (Birdsall, 1997); se puede evidenciar una diferencia significativa entre el extracto acuoso y etanólico en la determinación de Baljet (compuestos con agrupamiento lactónico) dando una evidencia de posible presencia en el extracto etanólico y ausencia en el extracto acuoso, esto puede deberse a que ciertos compuestos presentan una cierta solubilidad y pueden extraerse de mejor manera frente a un solvente específico, en este caso etanol.

4.4 ESPECTRO INFRARROJO

La espectroscopia infrarroja permite identificar grupos funcionales, en muestras sólidas, líquidas y gaseosas, la información se efectúa por medio del gráfico de un espectro en donde se puede observar la absorbancia de luz infrarroja en el eje de las ordenadas frente longitud de onda en el eje de las abscisas. En el gráfico se pueden observar los picos característicos de los grupos funcionales presentes en la muestra de látex estudiada.

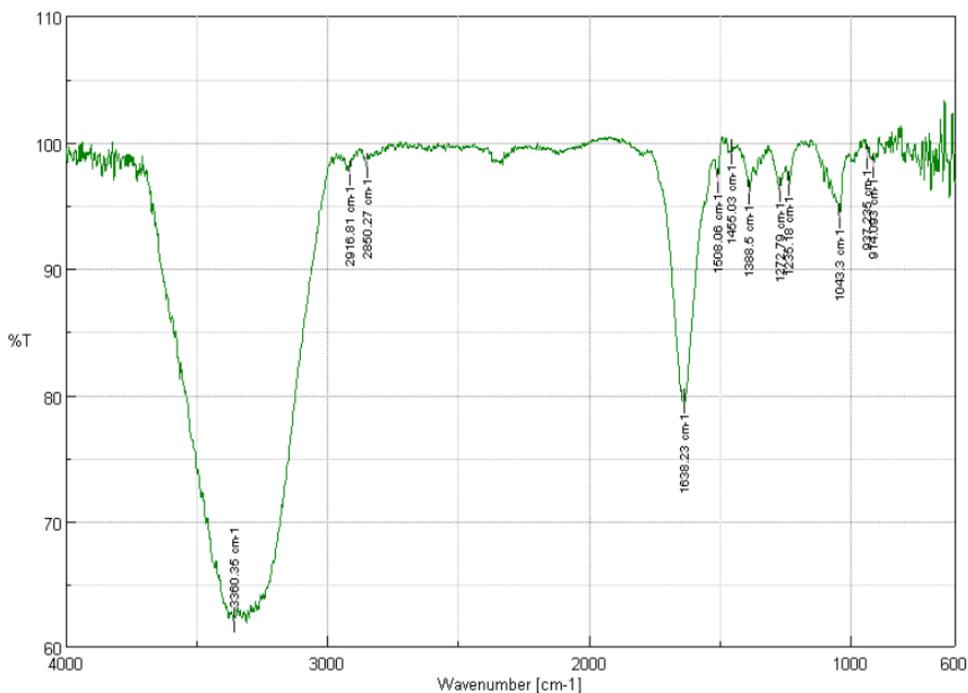


Figura 9. Espectro infrarrojo del látex de *A. mexicana*

El análisis espectroscópico de IR no brinda una información clara y específica en lo que respecta a la composición química del látex; sin embargo, en el espectro se evidencia la banda típica del agua o estiramiento O-H, sin demostrar una diferencia significativa y presencia de otros compuestos que pueden presentar picos característicos para su identificación.

La señal que se presenta en una longitud de onda 3330 cm^{-1} es una banda con un número de onda elevado, además es una señal ancha y bien definida por lo que se puede interpretar como una característica del grupo -OH , los que se suelen presentarse en un rango de 3000 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} , y debido a esta característica se podría descartar que esta señal corresponda a grupos -NH típicos de los alcaloides. Esto es debido a que los estiramientos N-H pueden estar superpuestos o enmascarados con la amplia banda de tensión O-H; además, no se aprecian dos señales, una que indique el estiramiento simétrico y otra de un estiramiento asimétrico para N-H si hay presencia de una amina secundaria. Estas

observaciones sustentan la información obtenida en las pruebas de tamizaje fitoquímico, donde se detectó la presencia de flavonoides y estos compuestos poseen en su estructura grupos –OH; más la posible presencia de compuestos alcaloidales.

Por otro lado, en el espectro a una longitud de onda entre 1600 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} se presentan picos característicos de C=O y C=C, en este caso el espectro brinda una información de un pico de 1638 cm^{-1} , tanto el número de onda como la señal que en este caso es relativamente fuerte y permite inferir que esta vibración es típica de un enlace C=O (carbonilo), grupo funcional presente en aldehídos y cetonas; dichos grupos funcionales pueden estar presentes en carbohidratos, ácidos grasos, entre otros.

Los picos que se presentan en rangos inferiores a 1500 cm^{-1} corresponden a vibraciones de flexión, y debido a que éstas en la mayoría de los casos se superponen, generan una mayor dificultad en la interpretación del espectro.

Cuadro 10. Longitud de onda vs % transmitancia del espectro IR.

Número de onda [cm^{-1}]	%T
3360.35	62.1035
2916.81	97.5725
2850.27	98.0892
1638.23	79.426
1508.06	96.9539
1455.03	99.1753
1388.5	96.0022
1272.79	96.2026
1235.18	96.751
1043.3	94.0992
937.235	98.8322
914.093	98.1007

4.5 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

4.5.1 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS

Para el presente estudio se utilizaron dos cepas de hongos, *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp*, y dos tipos de agar (papa dextrosa o PDA y Sabouraud).

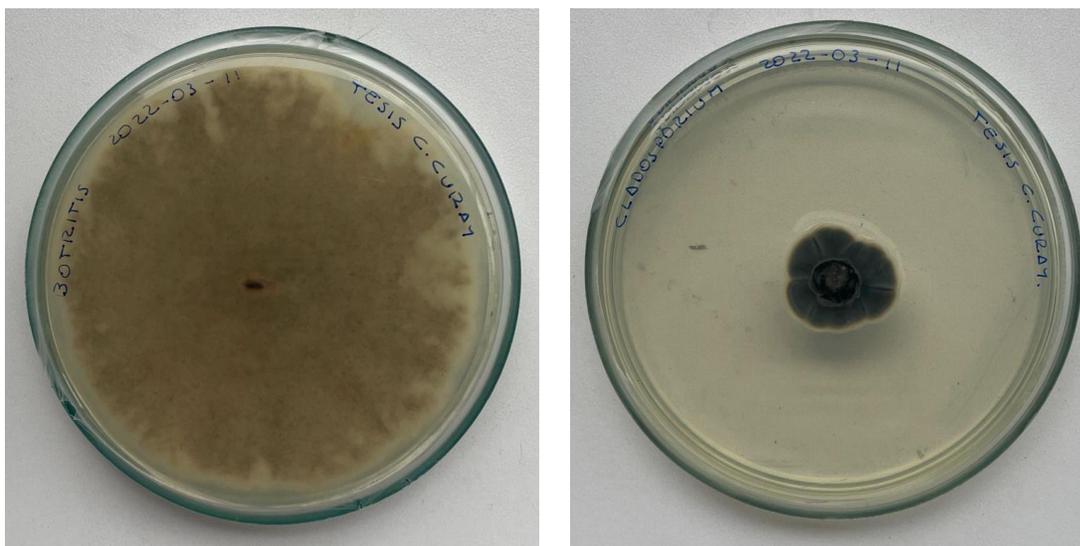


Figura 10. Cepas de *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp* bioensayadas.

La preparación de los medios de cultivo se realizó tomando en cuenta las indicaciones descritas por el fabricante, en este caso para el agar Sabouraud se utilizaron 65,0 g por cada litro de agua, y en el caso del medio PDA, se utilizaron 39g por cada litro de agua.

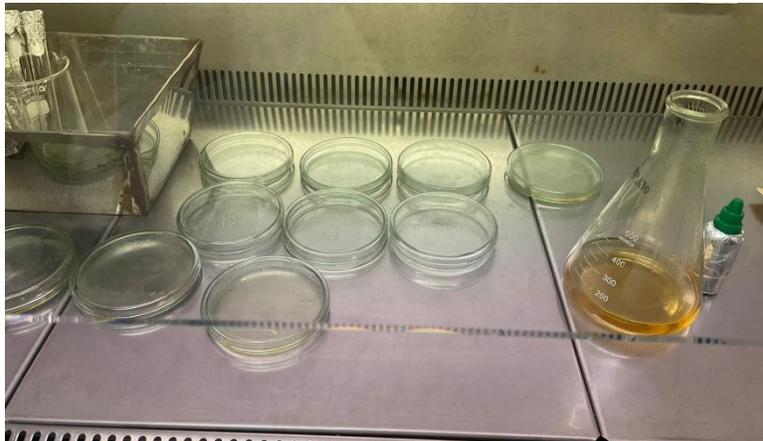


Figura 11. Siembra de microorganismos en agar PDA y Sabouraud.

Se escogieron los medios de cultivo debido a que el medio de cultivo agar Sabouraud provee al hongo de glucosa y peptona que son fuentes de carbono y de nitrógeno fácilmente utilizables (Derita et al., 2015); el medio de cultivo PDA representa una fuente directa de almidones, y por otro lado junto con la dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras (Verde et al., 2012).

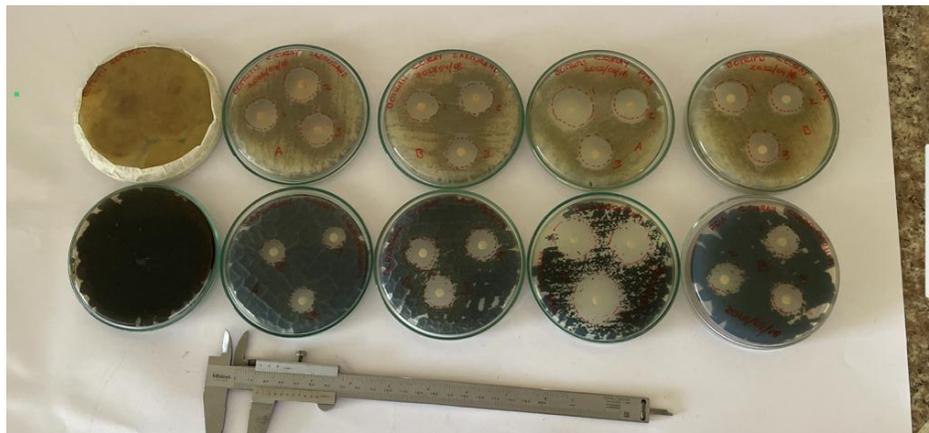


Figura 12. Halos de inhibición obtenidos para la actividad antifúngica de los extractos del látex de *A. mexicana*

En la prueba de Kirby Bauer se puede evidenciar claramente la presencia de halos inhibición bien definidos en los dos medios de cultivo utilizados, no siendo así en las

cajas Petri que contiene los microorganismos de control, es decir la actividad antifúngica de los extractos es alta.

Cuadro 11. Actividad antifúngica del látex de *Argemone mexicana*

		Microorganismo							
		Radio de Halos de inhibición (mm)							
Medio de cultivo	Cepas de hongos	Repetición A (20 µl)				Repetición B (10 µl)			
		1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
PDA	<i>Cladosporium spp</i>	11,2	10,6	10,9	10,9	6,7	6,3	6,4	6,5
	<i>Botritis cinérea</i>	11,1	9,3	8,7	10,2	9,2	8,7	8,3	8,7
Sabouraud	<i>Cladosporium spp</i>	7,4	7,9	8,3	7,7	5,1	5,4	5,7	5,4
	<i>Botritis cinérea</i>	8,9	9,1	9,3	9,1	9,6	9,4	8,3	9,1

Para la valoración de la actividad antifúngica se utilizó el extracto acuoso en una sola concentración, pero en diferentes volúmenes de 10 µl y 20 µl. Se realizó solamente en el extracto acuoso, debido a que el alcohol contenido en el extracto etanólico podría actuar como un potencial inhibidor de crecimiento de los hongos, y esto podría interpretarse como un resultado positivo frente a la valoración antifúngica del látex de la especie vegetal.

En relación a los resultados obtenidos para esta actividad biológica (cuadro 11), se puede indicar que las pruebas realizadas presentan marcados y definidos halos de inhibición para las dos cepas de hongos y en los dos medios de cultivo ensayados. Además, existe una diferencia significativa en las pruebas realizadas, al calcular un promedio de los halos de inhibición en la prueba de 20 µl, el hongo *Cladosporium spp* en el agar PDA exhibe un halo de inhibición de 10,9 mm, mientras que el halo en el agar Sabouraud fue de 7,7 mm, es decir en este último agar el hongo tiene una mejor resistencia a la actividad del extracto. El hongo *Botritis cinérea*, en el

medio de cultivo PDA, muestra un halo de inhibición de 10,2 mm mientras que en el medio de cultivo Sabouraud, tiene un valor de 9,1 mm, este hecho puede indicar que el hongo tiene una mayor resistencia en este medio de cultivo frente a la actividad antifúngica del látex.

Por otro lado, si se analizan las pruebas del volumen de 10 μ l del extracto en el hongo *Cladosporium spp*, se puede obtener un promedio de 6,5 mm para el halo en el agar PDA frente a un valor de 5,4 mm en agar Sabouraud, mientras que el hongo *Botritis cinérea* presenta un halo de inhibición de 8,7 mm en agar PDA frente a 9,1 mm en agar Sabouraud. Estas diferencias pueden deberse a que el crecimiento e inhibición de los hongos están sujetos al tipo de cepa, a la composición del medio y a la asimilación específica de los nutrientes disponibles en relación con su metabolismo, lo cual conduce a que los microorganismos respondan de forma particular frente a una valoración antifúngica (Mansilla et al., 2005). Pese a que el agar PDA es el más eficiente para el desarrollo de hongos (Narrea-Cango & Malpartida-Zevallos, 2006), observamos una mejor actividad antifúngica en el volumen de 20 μ l de extracto en ambas especies de hongos, mientras tanto en el volumen de 10 μ l se observa una mejor actividad antifúngica del extracto acuoso del látex en contra del hongo *Botritis cinérea* en el medio de cultivo Sabouraud.

La concentración mínima inhibitoria CMI, resulta ser la concentración más baja (en μ g/ml) de una sustancia que responde a inhibición de crecimiento en una determinada cepa bacteriana, estos resultados suelen interpretarse en escalas S (Sensible), I (Intermedia) o R (Resistente), seguido de la CMI en μ g/ml (Ruilova-Reyes, 2007). De acuerdo al estudio realizado se observa que en los volúmenes de 20 μ l y 10 μ l del extracto, presenta una respuesta sensible frente a la actividad antifúngica en los dos medios de cultivo y en las dos cepas de microorganismos utilizados.

4.6 CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADO A UN CROMATÓGRAFO DE MASAS (CG-EM).

La cromatografía de gases acoplado a un sistema de espectrometría de masas, permite caracterizar de mejor manera los compuestos que están contenidos en la muestra; en este trabajo de investigación se sometió el látex de la especie vegetal en estudio una separación cromatográfica de los metabolitos secundarios volátiles e identificación por espectrometría de masas, basado en la librería de datos del equipo. A continuación, se presentan los cromatogramas obtenidos para los extractos acuoso y etanólico (Figuras 13 y 14), seguido de la información de los compuestos identificados (Cuadros 12 y 13) mediante la técnica CG-EM.

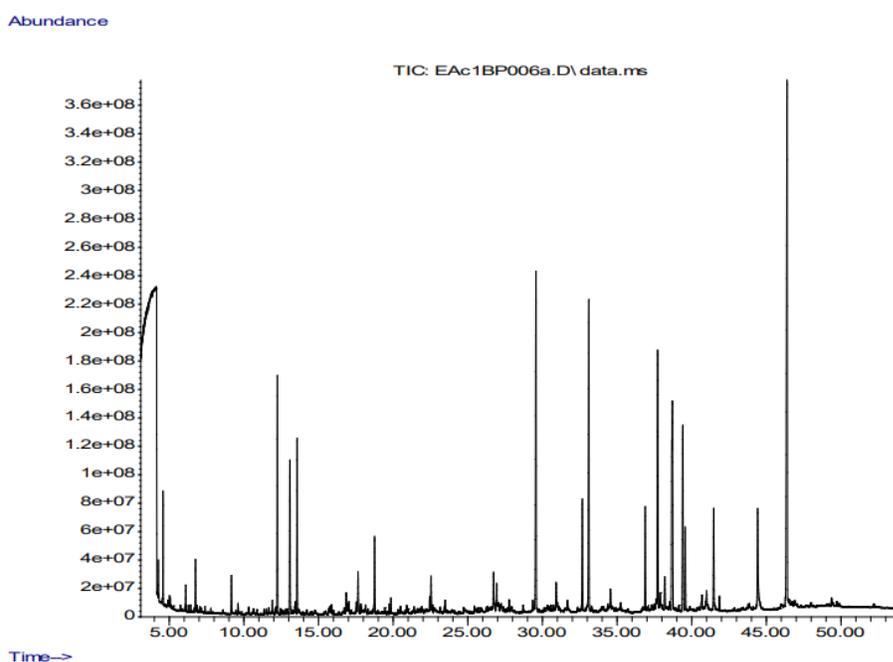


Figura 13. Perfil cromatográfico del extracto acuoso del látex de *A. mexicana*

El cromatograma (Figura 13) muestra la presencia de varios tipos de compuestos químicos identificados en el extracto acuoso; los mismos son detallados a continuación con sus respectivos tiempos de retención y el % de abundancia expresados como porcentajes de área.

Cuadro 12. Compuestos identificados en el extracto acuoso del látex de *A. mexicana*

Tiempo de retención (minutos)	Compuesto	Unidades (% Área ± DE)
7,395	2-Propenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, TMS ester	0,06 ±0,00
13,563	(5-Isopropyl-2-methylphenoxy) TMS	1,26 ± 0,28
19,446	L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, TMS	0,09 ± 0,01
19,737	(+) Spathulenol	0,12 ± 0,01
19,852	(-)-Caryophyllene oxide	0,13 ± 0,04
23,491	Hexadecane, 2,6,11,15-tetramethyl	0,16 ± 0,00
26,730	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	0,56 ± 0,00
27,245	Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester	0,17 ± 0,00
		073887
29,345	Linolenic acid, TMS ester	0,16 ± 0,03
33,110	Octadecanoic acid, TMS ester	4,36 ± 0,06
39,404	Sucrose TMS	2,64 ± 0,15
40,994	2-Monostearin trimethylsilyl ether	0,36 ± 0,03
41,475	Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	1,22 ± 0,02
41,859	Squalene	0,16 ± 0,01

44,416 Protopine

1,82 ±

0,18

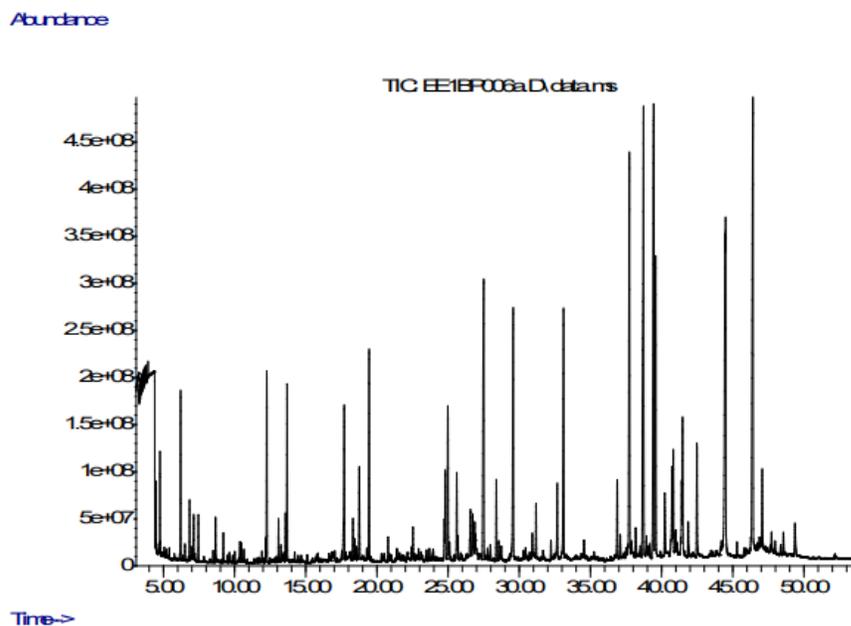


Figura 14. Perfil cromatográfico extracto etanólico del látex de *A. mexicana*.

El cromatograma (Figura 14) muestra la presencia de varios tipos de compuestos químicos identificados en el extracto etanólico; los mismos son detallados a continuación con sus respectivos tiempos de retención y el % de abundancia expresados como porcentajes de área.

Cuadro 13. Compuestos identificados en el extracto etanólico del látex de *A. mexicana*

Tiempo de retención (minutos)	Compuesto	Unidades (% Área ± DE)
6,840	D-lactic acid-di(TMS)	0,33 ± 0,02
8,665	Mono-ethylmalonate, TMS ester	0,33 ± 0,02
10,376	Propanedioic acid, bis (TMS) ester	0,19 ± 0,02
13,260	Succinic acid (2TMS)	0,11 ± 0,02

13,575	(5-Isopropyl-2-methylphenoxy) TMS	0,25 ± 0,08
18,313	L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, TMS ester	0,35 ± 0,02
18,444	L-Aspartic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(TMS) ester	0,23 ± 0,07
19,457	8.beta.-(Methoxyeremophil)-7(11)-en-6.alpha.,15: 8.alpha.,12-diolide	1,28 ± 0,30
20,790	Glutamic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) ester, L	0,25 ± 0,09
22,152	2-Methylresorcinol, bis (TMS) ether	0,18 ± 0,03
22,787	α-D-Mannopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(TMS)-, cyclic butylboronate	0,05 ± 0,02
24,807	D-(-)-Fructofuranose, pentakis(TMS) ether	0,73 ± 0,02
25,099	Citric acid-tetra(TMS)	0,23 ± 0,08
25,688	D-(+)-Talofuranose, pentakis(TMS) ether (isomer 2)	0,23 ± 0,01
26,575	beta.-D-Allopyranose, pentakis(TMS) ether	0,64 ± 0,02
26,730	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	0,46 ± 0,06
26,878	β-D-(+)-Talopyranose, pentakis(TMS) ether	0,32 ± 0,01
28,561	Hexadecanoic acid, ethyl ester	0,14 ± 0,00
30,300	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(TMS)	0,15 ± 0,00
31,181	Trimethylsilyl 3,4-bis(trimethylsiloxy)cinnamate	0,43 ± 0,05
32,228	2-Monopalmitoylglycerol trimethylsilyl ether	0,16 ± 0,01
40,737	6-(Hydroxymethyl)-3-(4'-methoxyphenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one	1,07 ± 0,07
40,823	1,3-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	0,82 ± 0,01

41,47	Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	1,28 ± 0,07
43,546	α-D-Glucopyranosiduronic acid, 3-(5-ethylhexahydro-2,4,6-trioxo-5-pyrimidinyl)-1,1-dimethylpropyl 2,3,4-tris-O-(TMS)-methyl ester	0,05 ± 0,00
44,130	Pregn-5-ene-3,11-dione, 17,20:20,21-bis[methylenebis(oxy)]-, cyclic 3-(1,2-ethanediyl acetal)	0,09 ± 0,00
44,204	Galactinol, nonakis(TMS) ether	0,12 ± 0,02
44,456	Allocryptopine	3,30 ± 0,10
48,370	β-Sitosterol trimethylsilyl ether	0,09 ± 0,00
49,377	Sucrose, octakis(TMS) ether	0,37 ± 0,06

Mediante la CG-EM en el extracto acuoso se han podido identificar 15 compuestos químicos, entre los cuales (5-isopropil-2-metilfenoxi) TMS, (-)-óxido de Cariofileno, 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dieno-2,8-diona y Escualeno poseen propiedades antifúngicas. En el extracto etanólico se pudieron identificar 30 compuestos químicos, de los cuales 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dieno-2,8-diona y Allocriptopina presentan propiedades antifúngicas y antibacterianas. Según reports en la literatura, los alcaloides dehidrocoridalmina y oxiberberina, aislados de *A. mexicana*, presentaron actividades antifúngicas contra algunas cepas de hongos, entre los cuales figuran *Helminthosporium sp.*, *Curvularia sp.*, *Alternaria cajani*, *Bipolaris sp.* y *Fusarium udum* (A. Singh et al., 2009). De igual manera, se pudo comprobar que una mezcla de alcaloides cuaternarios y algunos ácidos fenólicos presentaron propiedades antifúngicas significativas (S. Singh, Singh, Jaiswal, et al., 2010).

Uno de los compuestos encontrados mayoritariamente mediante CG – EM es el 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol denominado Carvacrol, Este compuesto es un fenol monoterpénico, isomérico del timol; investigaciones previas han comprobado que

es efectivo como compuesto bioactivo debido a que interviene en la inhibición de la biosíntesis del ergosterol, erradica los biofilms del género *Candida*, ejerce un efecto anticandidiasis en la candidiasis oral y ejerce un efecto anticandidiasis en la candidiasis vaginal (Suntres et al., 2015). Además, se ha demostrado una actividad antifúngica alta frente a las cepas *C. acutatum* y *B. theobromae*, en ambos casos hongos fitopatógenos (Oviedo Berrocal, 2014).

En un estudio realizado acerca de la aplicación de biopolímeros de Carvacrol sobre la poscosecha de manzanas, se comprobó que el Carvacrol es muy efectivo en el tratamiento y control de *Botrytis cinerea* (Calidad & Seguridad, 2019). Sus efectos antifúngicos posiblemente están ejercidos por mecanismos de estrés de Ca^{2+} y la inhibición del TOR (vía de la rapamicina), lo cual juega un papel crucial en la viabilidad de todos los hongos; es por ello que en la industria alimentaria, en ocasiones reemplaza al uso de sorbatos como conservante.

Por otro lado, la protopina es un alcaloide reportado en varias especies de la familia *Papaveraceae*. Investigaciones realizadas han revelado la bioactividad en el control de larvas de algunos insectos como *Eurysacca melanocampta* Meyrick (Alvarado, 2016), En *A. mexicana* se han encontrado efectos antimicrobianos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* y *Escherichia coli* (Ruiz, 2019).

El octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester, en combinación con otros ácidos grasos han demostrado poseer propiedades antifúngicas útiles para el control de *Candida albicans* y *Candida krusei*, microorganismos presentes en muestras clínicas (Lobo et al., 2021).

En investigaciones anteriores, se ha observado la presencia de diversos metabolitos secundarios presentes en el organismo vegetal en estudio, muchos de los cuales tienen actividad bactericida y fungicida. La presencia de alcaloides bencilisquinolínicos como la berberina que cuenta con capacidades antibióticas; protopina, coptisine y sanguinarina con capacidad de inhibir la formación de la placa

bacteriana; compuestos como alocriptopina, queleritrina y dihidroqueleritrina que cumplen una acción antibiótica. Por otra parte los alcaloides dehydrocordalina y oxiberberina, tienen actividad antifúngica en muchas especies de hongos (Quispe Caray, 2018).

Los resultados obtenidos por CG-EM están de acuerdo con los arrojados por las pruebas químicas del tamizaje, debido a que coinciden con la presencia de ciertos grupos de familias de metabolitos secundarios, teniendo en cuenta que el tamizaje fitoquímico es un análisis referencial, es decir, proporciona la posible presencia o ausencia de compuestos y es una referencia de los tipos de metabolitos que pueden estar presente en una determinada especie vegetal.

Los tiempos de retención de los metabolitos presentes en los extractos del látex de la especie vegetal, pueden variar y esto es debido a varios factores como variaciones en las temperaturas del horno, método de inyección de la muestra, cambio de los parámetros en el análisis, estos pueden influir en la determinación; sin embargo, los coeficientes de variación para los tiempos de retención no exceden en el 2%, lo que demuestra que los análisis cromatográficos y los cromatogramas obtenidos poseen una buena confiabilidad y reproducibilidad.

CAPITULO V

5.1. CONCLUSIONES

La evaluación de la composición química del látex de *Argemone mexicana* (Cardo Santo) se realizó mediante pruebas cualitativas y cuantitativas; además mediante la técnica de CG-EM, comprobándose la presencia de algunos compuestos químicos que pueden ser considerados como responsables de la actividad antifúngica observada.

Las pruebas químicas realizadas al látex de *A. mexicana* mostraron la presencia de varias familias de metabolitos secundarios, siendo los alcaloides predominantes, seguido de los fenoles y taninos, y los triterpenos y esteroides en menor proporción.

Mediante el análisis cromatográfico realizado (CG-EM) a los extractos acuoso y etanólico del látex de la planta investigada, se separaron e identificaron 45 metabolitos secundarios, de los cuales 8 poseen actividades antifúngicas, según lo reportado en la literatura.

La actividad antifúngica de los extractos del látex de la especie vegetal *A. mexicana* se pudo evaluar mediante una prueba Kirby Bauer en dos especies de hongos *Botrytis cinerea* y *Cladosporium spp* y en dos medios de cultivo Sabouraud y PDA, evidenciándose una inhibición de crecimiento muy marcada de dichos microorganismos.

La cantidad del extracto aplicada a los medios de cultivo con las cepas de hongos ensayadas, demostraron que una actividad antifúngica moderada del látex frente los microorganismos estudiados.

Los resultados obtenidos indican que el látex de la especie *A. mexicana* (Cardo Santo) constituye una fuente promisoría de compuestos bioactivos, especialmente con actividad antifúngica.

5.2. RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones del presente estudio se emite las siguientes recomendaciones:

Realizar un estudio detallado para conocer cuál es la incidencia del cambio de color del látex ante la actividad antifúngica.

Preparar los extractos en ausencia de luz, debido a que posiblemente la luz causa el oscurecimiento del extracto acuoso debido a una reacción fotoquímica.

Las pruebas de Kirby Bauer evidencian una actividad antifúngica positiva, sin embargo, se debería evaluar esta propiedad frente a cepas de hongos que causen alguna patología específica en el humano.

Se debe evaluar la actividad biológica, tanto antifúngica como antibacteriana, a diferentes concentraciones del extracto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, V. S. M. (2016). *Control biológico de Eurysacca malanocampta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) con extractos vegetales de Conium maculatum L., Argemone mexicana L. y Euphorbia peplus L. en cultivos de Chenopodium quinoa Willd en Ahuac Perú.* 93. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/5992>
- Araceli Peña-Álvarez & Alejandra Castillo-Alanís. (2015). Identificación cuantitativa de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (mefsc-gc-em). *Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 1(1), 29–42. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revspciequibio/cqb-2015/cqb151c.pdf>
- Arango, G. (2008). *Universidad De Antioquia Alkaloides Y Compuestos Nitrogenados.* 84.
- Arias, E., Diñeiro, Y., García, P., Oliván, C., & Sierra, V. (2020). Aplicaciones de la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) para el control de calidad de la carne. *Serida*, 2–7. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=8057>
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pérez Pacheco, N. O., Álvarez Sandoval, J. H., & Giraldo Aristizabal, C. I. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3597>
- Benito, E. P., Arranz, M., & Eslava, A. P. (2000). Factores de patogenicidad de Botrytis cinerea. In *Revista Iberoamericana de Micología* (Vol. 17, Issue 1, pp. 43–46).
- BIOTED. (2013). *PRINCIPIOS DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA 4 u 8 grupos de estudiantes.* 45(3), 109–112. <http://bioted.es/protocolos/PRINCIPIOS-CROMATOGRAFIA-CAPA-FINA.pdf>
- Birdsall, T. C. (1997). Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Alternative Medicine Review*, 2(2), 94–103.
- Bonkanka, C. X. (2007). *Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal.*
- Calidad, D. E. L. A., & Seguridad, Y. L. A. (2019). *BIOPOLÍMEROS Y CARVACROL.* 2018–2019.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Castillo Olvera, G., Zavala Cuevas, D., & Carrillo Inungaray, M. L. (2017). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Tlatemoani: Revista Académica de Investigación, ISSN-e 1989-9300, Vol. 8, Nº. 24, 2017, Págs. 71-86, 8(24), 71–86.*

cladorporium spp.pdf. (n.d.).

Corzo, A. (2019). Técnicas de análisis en química orgánica: cromatografía. In *Universidad Nacional de Santiago del Estero - UNSE. [Cátedra de Química orgánica y biológica]*.

Derita, M., Castelli, V., & Sortino, M. (2015). *Método de dilución en agar*. September.

Espinosa, H., García, E., & Gastélum, E. (2016). Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. In *Nanobio*.
https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b85320f15.pdf#page=115

Fitoquímica, F. Y., P, G. A. V., U, N. J., & J, E. G. (2008). *Universidad de antioquia facultad de química farmacéutica departamento de farmacia*. 1–96.

Hernández, J. M. (2017). Cromatografía Líquida. *Enfermedades Hepáticas Autoinmunes*, 7(Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada), 44–52.

Jáuregui, A. M. M., Ureta, C. A.-O., & Zelada, C. E. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables. *Horizonte Médico*, 11(2).
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637122007>

Joshi, N., Bhatt, S., Dhyani, D. S., & Nain, J. (2013). Phytochemical screening of secondary metabolites of Argemone mexicana Linn. Flowers. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 5(2), 144–147.
<https://www.researchgate.net/publication/281377061>

Lara, D. M., & Londoño, Á. S. (2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*, 87–109.

Latorre, B. A., Lillo, C., & Rioja, M. E. (2001). Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de Botrytis cinerea de la vid en función de la época de aplicación. *Cien. Inv. Agr*, 28(2), 61–66.
<https://repositorio.uc.cl/bitstream/handle/11534/8617/000356096.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Lobo, Y. Q., Patiño, G. S., & Quirós-Rodríguez, J. A. (2021). Characterization of fatty acids and antimicrobial activity of the methanol extract of holothuria princeps (Holothuriida: Holothuriidae). *Revista de Biología Tropical*, 69(1), 36–44.
<https://doi.org/10.15517/RBT.V69I1.41518>

Majeed, I., Rizwan, K., Ashar, A., Rasheed, T., Amarowicz, R., Kausar, H., Zia-ul-haq, M., & Marceanu, L. G. (2021). A comprehensive review of the ethnotraditional uses and biological and pharmacological potential of the genus mimoso. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14).
<https://doi.org/10.3390/ijms22147463>

Mansilla, H., Alexis, A., Álvarez, R., Preliminar, E., Crecimiento, D. E. L., Esporulación, Y. L. A., Webber, A., Medios, E. N., & Convencionales, D. E. C. (2005). *Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116189012*.

- Martínez, T. (2020). *Máster Universitario en Investigación Química y Química industrial Manuel Tato Martínez Síntesis de cumarinas sustituidas mediante. Iii.*
- Narrea-Cango, M., & Malpartida-Zevallos, J. (2006). Evaluación de medios de cultivos en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas de hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch. *Revista Peruana de Entomología*, 45, 145–147.
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. In *Nutricion Hospitalaria* (Vol. 31, Issue 1, pp. 55–66). <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699>
- Oviedo Berrocal, L. A. (2014). Biotransformación de los sustratos Timol y Carvacrol mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*. *Tesis Para Obtener El Grado de Mestro En Ciencias-Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín*, 111. <http://www.bdigital.unal.edu.co/11772/>
- Parrales, A., Reyes, M., & William, V. (2012). Cromatografía del gas natural. *Escuela Superior Politécnica Del Litoral*, 18–28. <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/91597/D-68860.pdf>
- Puentes, D., & Nelly, L. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 32–55. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179214945004>
- Quaternary alkaloids of Argemone mexicana _ Enhanced Reader.pdf.* (n.d.).
- Quispe Caray, C. R. (2018). Universidad Nacional De San Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa. *Efecto De La Implementación De La Gestión De Logística Inversa En Los Resultados Económicos Y Medioambientales De La Empresa Industrial Reyemsa Período 2017*, 164. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/10883><http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4057><http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/8014><http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/6899>
- Ruilova-Reyes, A. G. (2007). *Determinación de la concentración inhibitoria mínima de aceites esenciales ante bacterias y hongos fitopatógenos.* 1–63.
- Ruiz, M. (2019). *Caracterización fitoquímica y efecto antibacteriano in vitro de Argemone mexicana L. contra bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido.* 95. [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/14465/Aguilar Ramos Cesar Hilton.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/14465/Aguilar_Ramos_Cesar_Hilton.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Singh, A., Singh, S., Singh, S., Singh, T. D., Singh, V. P., Pandey, V. B., & Singh, U. P. (2009). Fungal spore germination inhibition by alkaloids dehydrocorydalmine and oxyberberine. *Journal of Plant Protection Research*, 49(3), 287–289.

<https://doi.org/10.2478/v10045-009-0046-9>

- Singh, S., Singh, A., Jaiswal, J., Singh, T. D., Singh, V. P., Pandey, V. B., Tiwari, A., & Singh, U. P. (2010). Antifungal activity of the mixture of quaternary alkaloids isolated from *Argemone mexicana* against some phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(8), 769–774. <https://doi.org/10.1080/03235400802176159>
- Singh, S., Singh, T. D., Singh, V. P., & Pandey, V. B. (2010). Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*. *Pharmaceutical Biology*, 48(2), 158–160. <https://doi.org/10.3109/13880200903062622>
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304–318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Verde, C., Bilis, B., Medio, U. S. O., La, P., Lactosado, C., Verde, C., Bilis, B., En, F., Por, G., Agua, L. D. E., Rehidratar, P., Cantidad, I., Medio, D. E. L., El, E. N., Del, V., Inoculado, M., Verde, C., Al, B., Para, U., ... Gas, I. (2012). *Bacteriología General*. 3–4. <https://doc/105162815/Caldo-Bilis-Verde-Brillante#download>
- Yagües, G. V. (2008). Cromatografía de gases. *Cromatografía*, 1–19.

ANEXOS

ANEXO 1. CONDICIONES DE TRABAJO

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

Marca: Agilent Technologies

Columna: DB-5MS (30 m longitud × 0.25 mm Diámetro interno) y 0.25 micrómetros de espesor de película.

Gas de arrastre: Helio (He), Flujo: 1.2 mL/min

Temperatura de inyección: 250°C

Modo de inyección: Splitless

Temperatura inicial del horno: 70°C por 2 minutos

Gradiente del horno: 5°C/min

Temperatura final del horno: 300 °C por 6 minutos

Temperatura de transferencia: 300°C

Temperatura de la fuente de iones: 230°C

Temperatura del cuadrupolo: 150°C

Voltaje de electroionización: 70 eV

Rango de screening: 50-550 u.m.a.

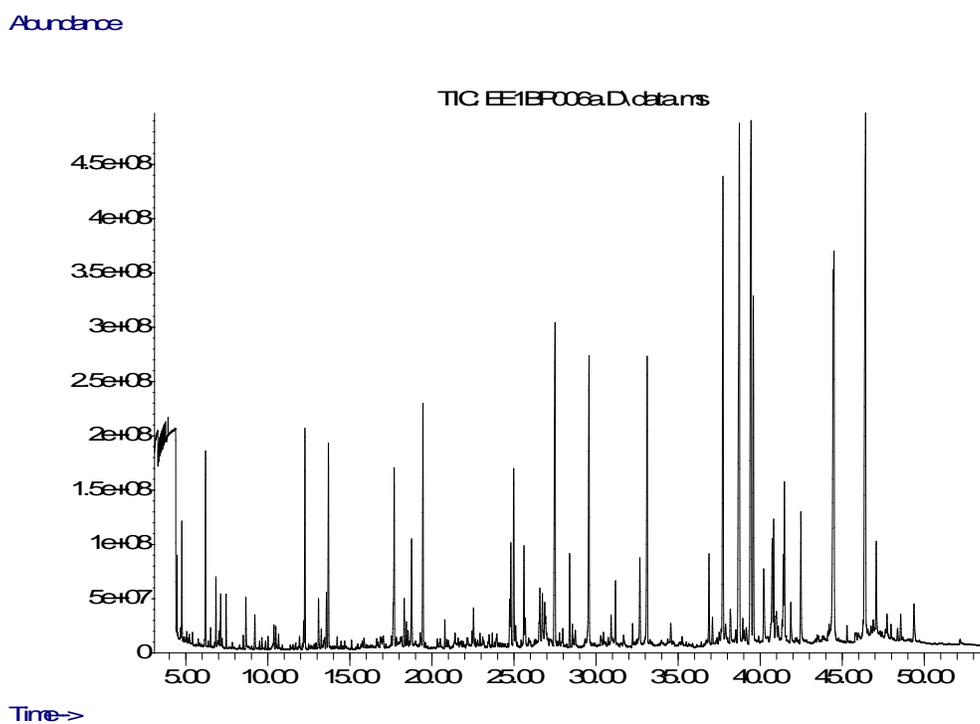
Derivatización

Agente derivatizante: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), Sigma-aldrich.

Reacción de derivatización: 100 uL del agente derivatizante se agregaron en 1 mg de muestra seca y se colocaron en baño de agua a 80°C por 2 horas.

ANEXO 2. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA MUESTRA:

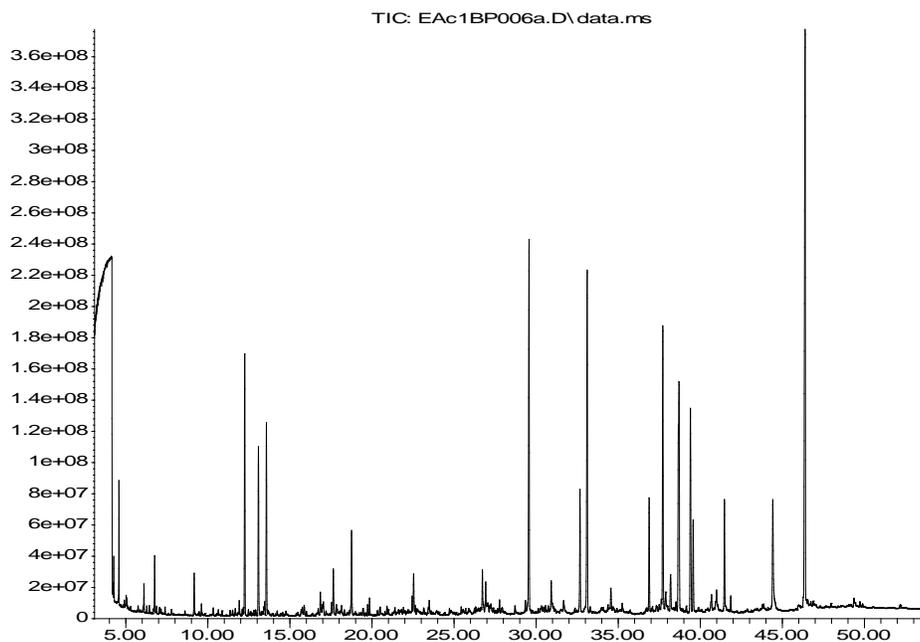
Extracto etanólico (derivatizado)



ANEXO 3. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA MUESTRA:

Extracto acuoso (derivatizado)

Abundance



Time-->

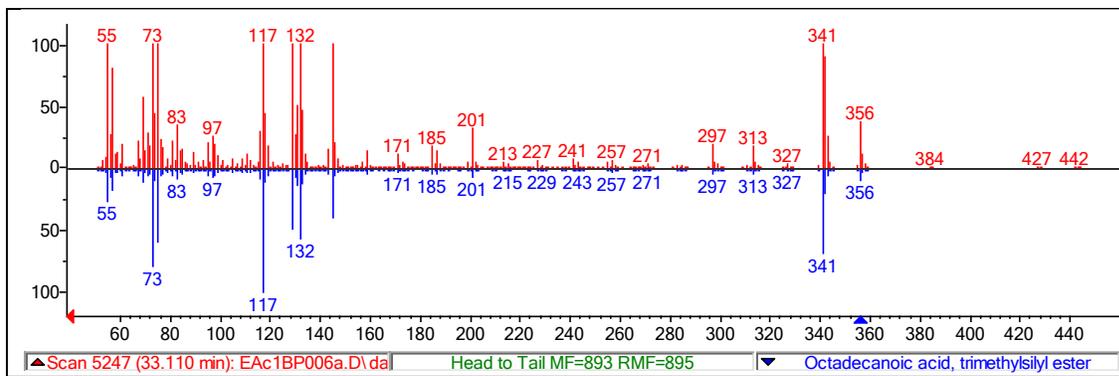
ANEXO 4. ESPECTROS DE MASAS DE COMPUESTOS DETECTADOS EN EL LATEX

EXTRACTO ACUOSO

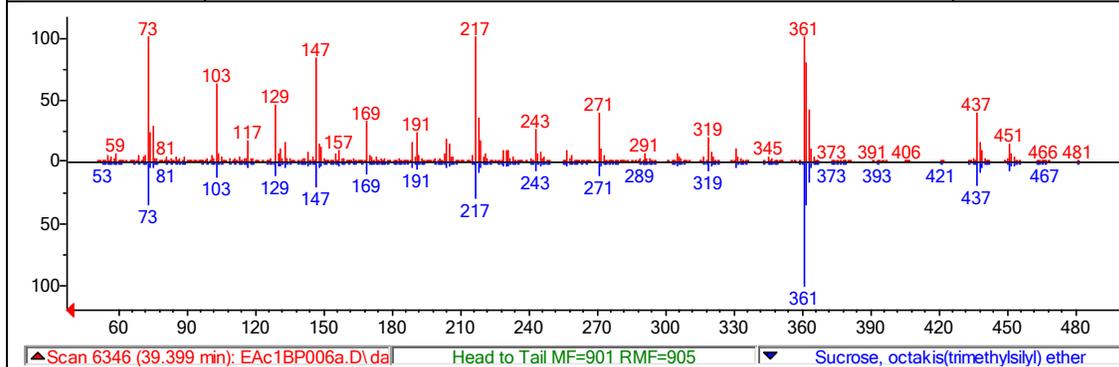
Tiempo de retención (minutos)	Compuesto	Unidades (% Área ± DE)
7,395	2-Propenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, TMS ester	0,06 ± 0,00
<p style="font-size: small;">▲ Scan 753 (7.396 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=822 RMF=941 ▼ Propanoic acid, 2-oxo-3-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ether</p>		
13,563	(5-Isopropyl-2-methylphenoxy) TMS	1,26 ± 0,28
<p style="font-size: small;">▲ Scan 1832 (13.570 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=915 RMF=917 ▼ (5-Isopropyl-2-methylphenoxy)trimethylsilane</p>		
19,446	L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, TMS	0,09 ± 0,01
<p style="font-size: small;">▲ Scan 2858 (19.440 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=806 RMF=847 ▼ L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyl ether</p>		

19,737	(+) Spathulenol	0,12 ± 0,01
<p>▲ Scan 2909 (19.732 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=834 RMF=855 (-)Spathulenol</p>		
19,852	(-)-Caryophyllene oxide	0,13 ± 0,04
<p>▲ Scan 2930 (19.852 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=909 RMF=940 Caryophyllene oxide</p>		
23,491	Hexadecane, 2,6,11,15-tetramethyl	0,16 ± 0,00
<p>▲ Scan 3566 (23.492 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=825 RMF=871 Hexadecane, 2,6,11,15-tetramethyl-</p>		
26,730	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione	0,56 ± 0,00

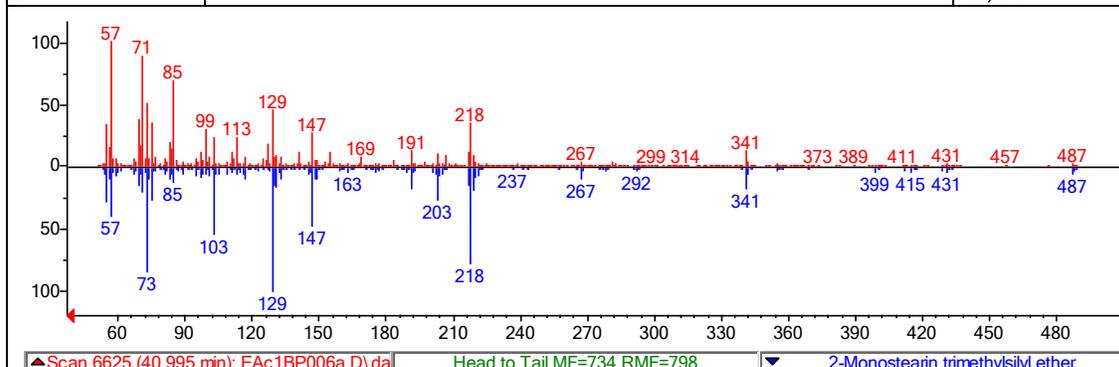
<p>▲ Scan 4131 (26.724 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=912 RMF=953 ▼ 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene</p>		
27,245	Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester	0,17 ± 0,00 073887
<p>▲ Scan 4222 (27.245 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=668 RMF=701 ▼ Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethyl)</p>		
29,345	Linolenic acid, TMS ester	0,16 ± 0,03
<p>▲ Scan 4589 (29.345 min): EAc1BP006a.D\data Head to Tail MF=628 RMF=641 ▼ Linolenic acid, trimethylsilyl ester</p>		
33,110	Octadecanoic acid, TMS ester	4,36 ± 0,06



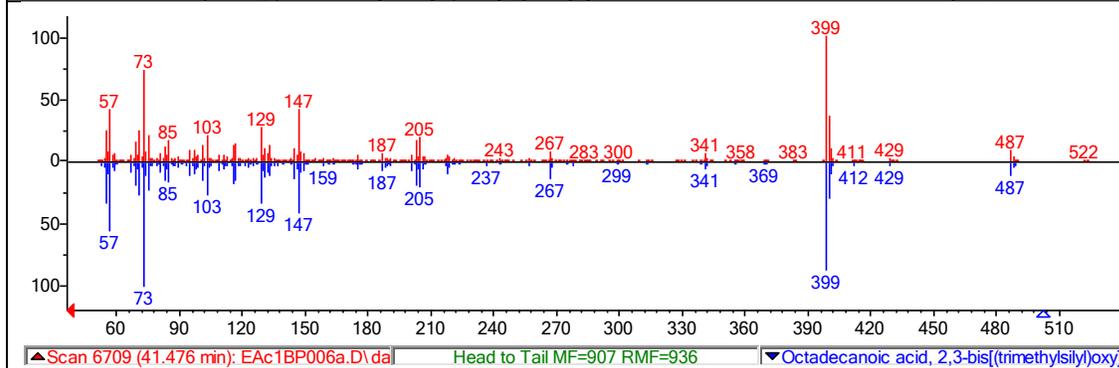
39,404	Sucrose TMS	2,64 ± 0,15
--------	-------------	----------------

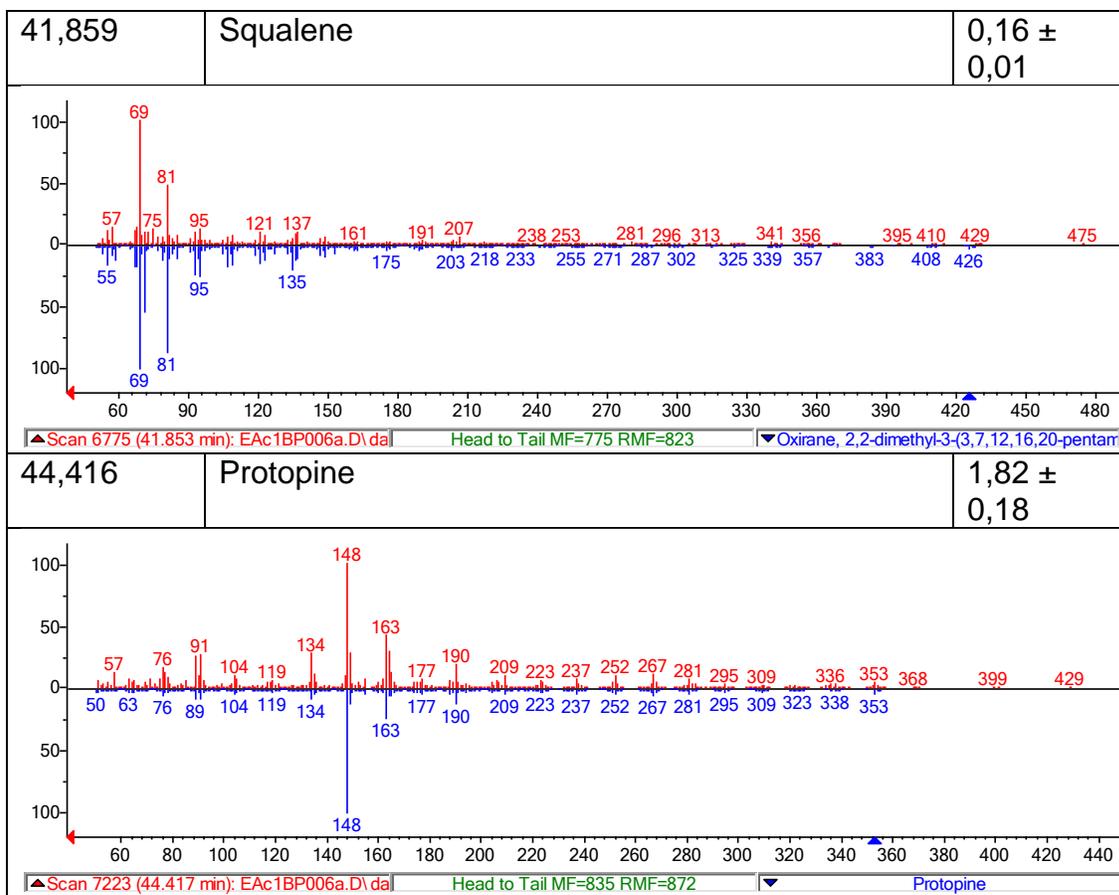


40,994	2-Monostearin trimethylsilyl ether	0,36 ± 0,03
--------	------------------------------------	----------------

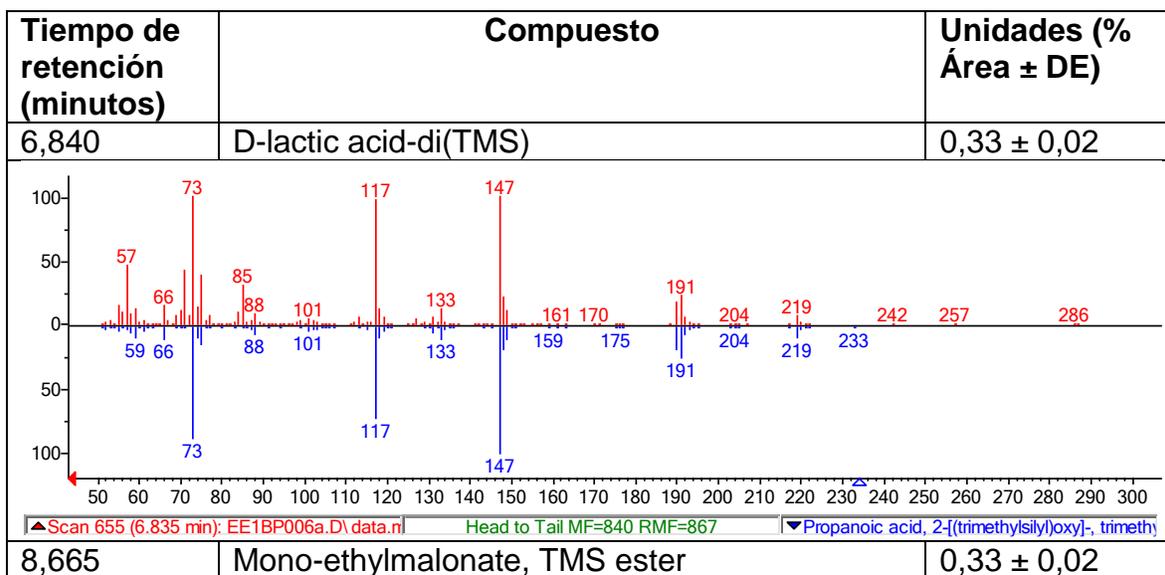


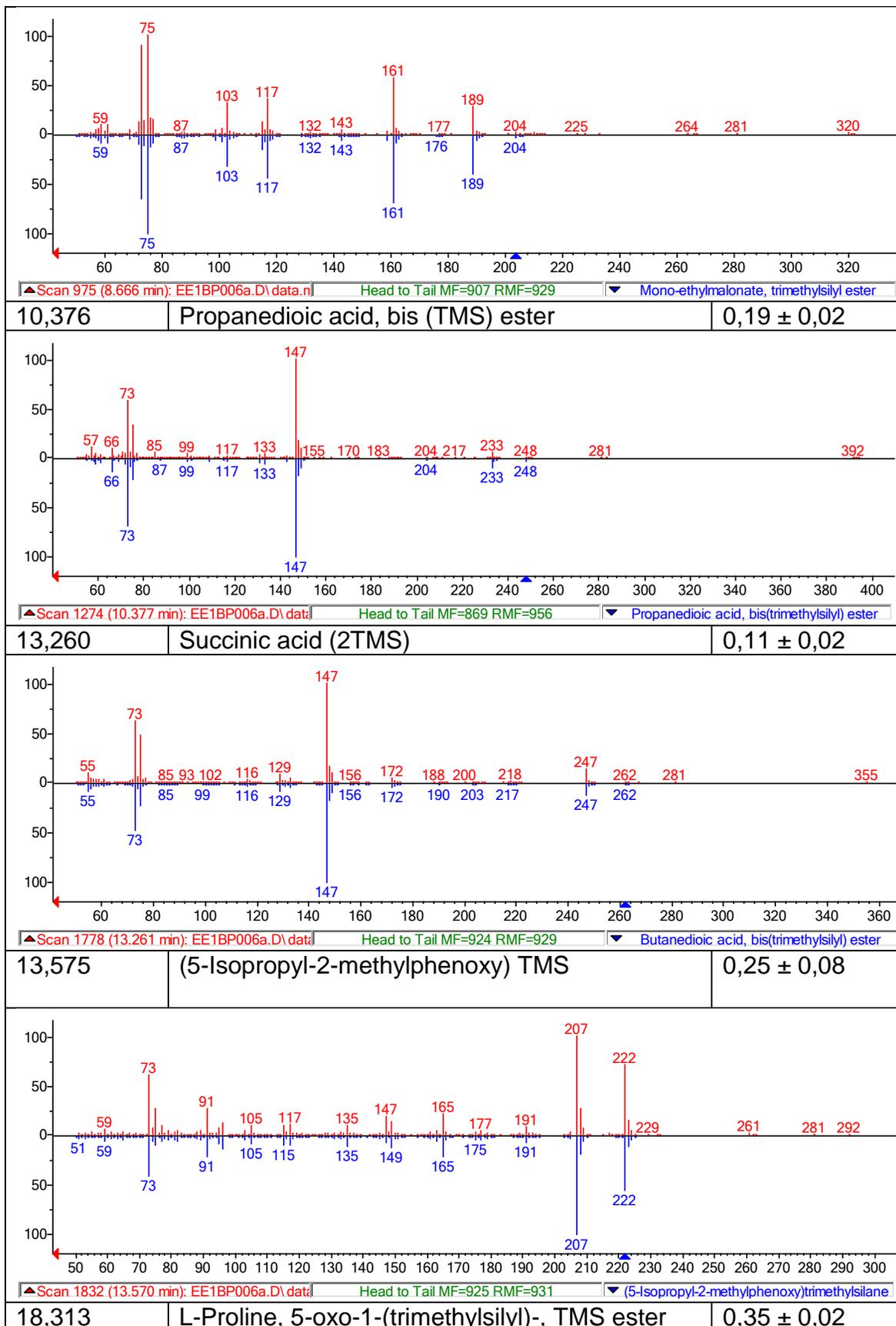
41,475	Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	1,22 ± 0,02
--------	---	----------------



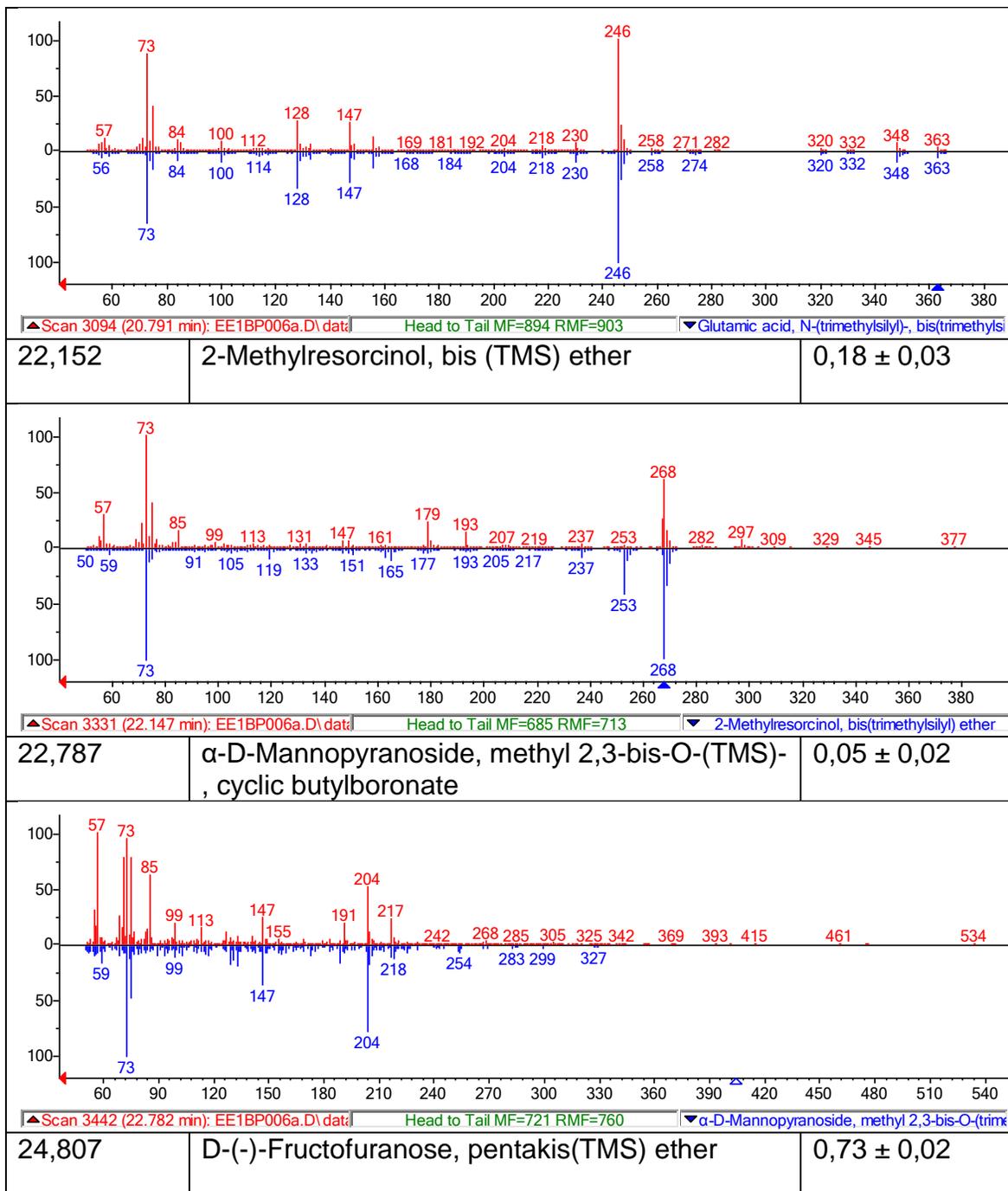


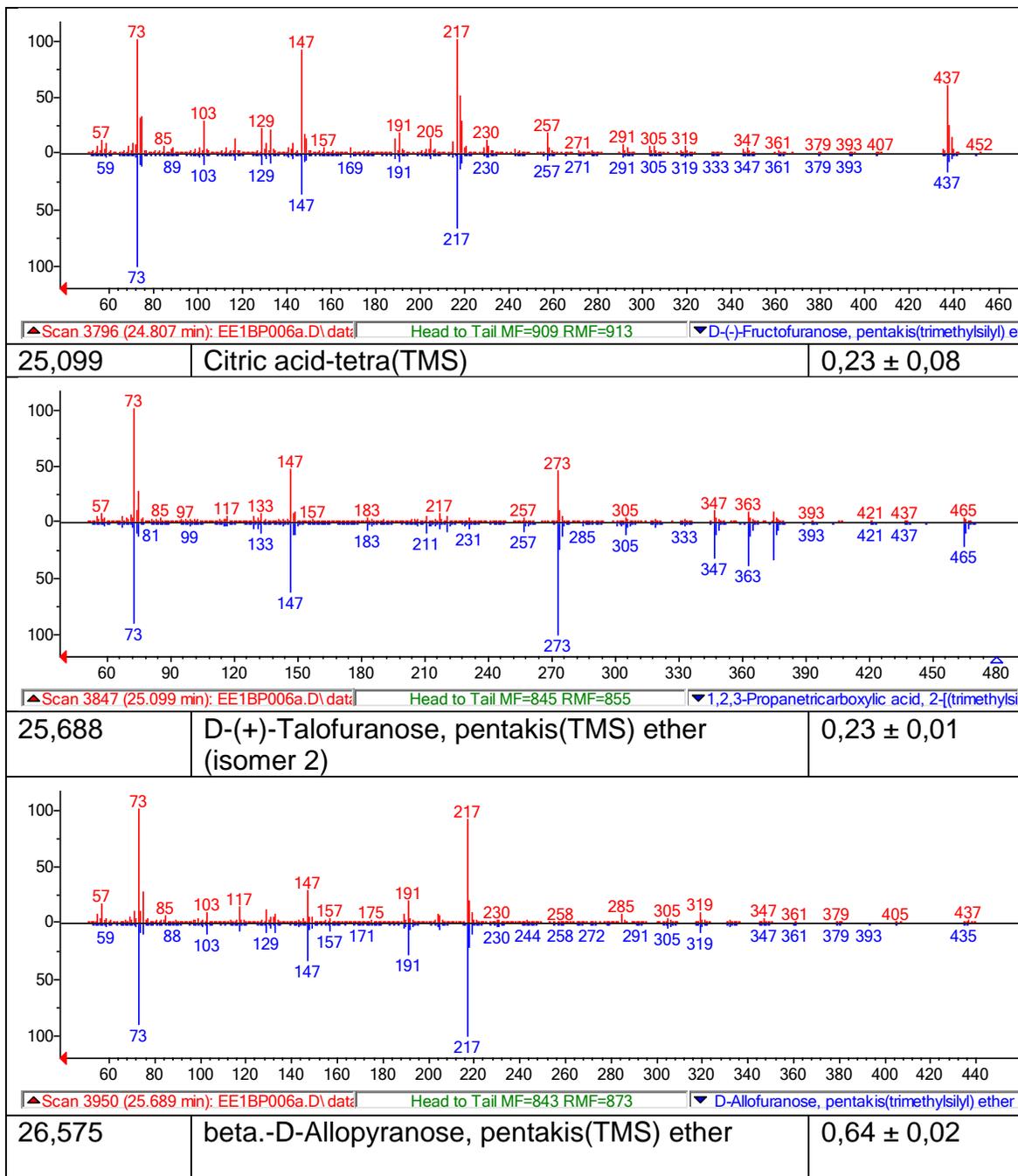
EXTRACTO ETANÓLICO

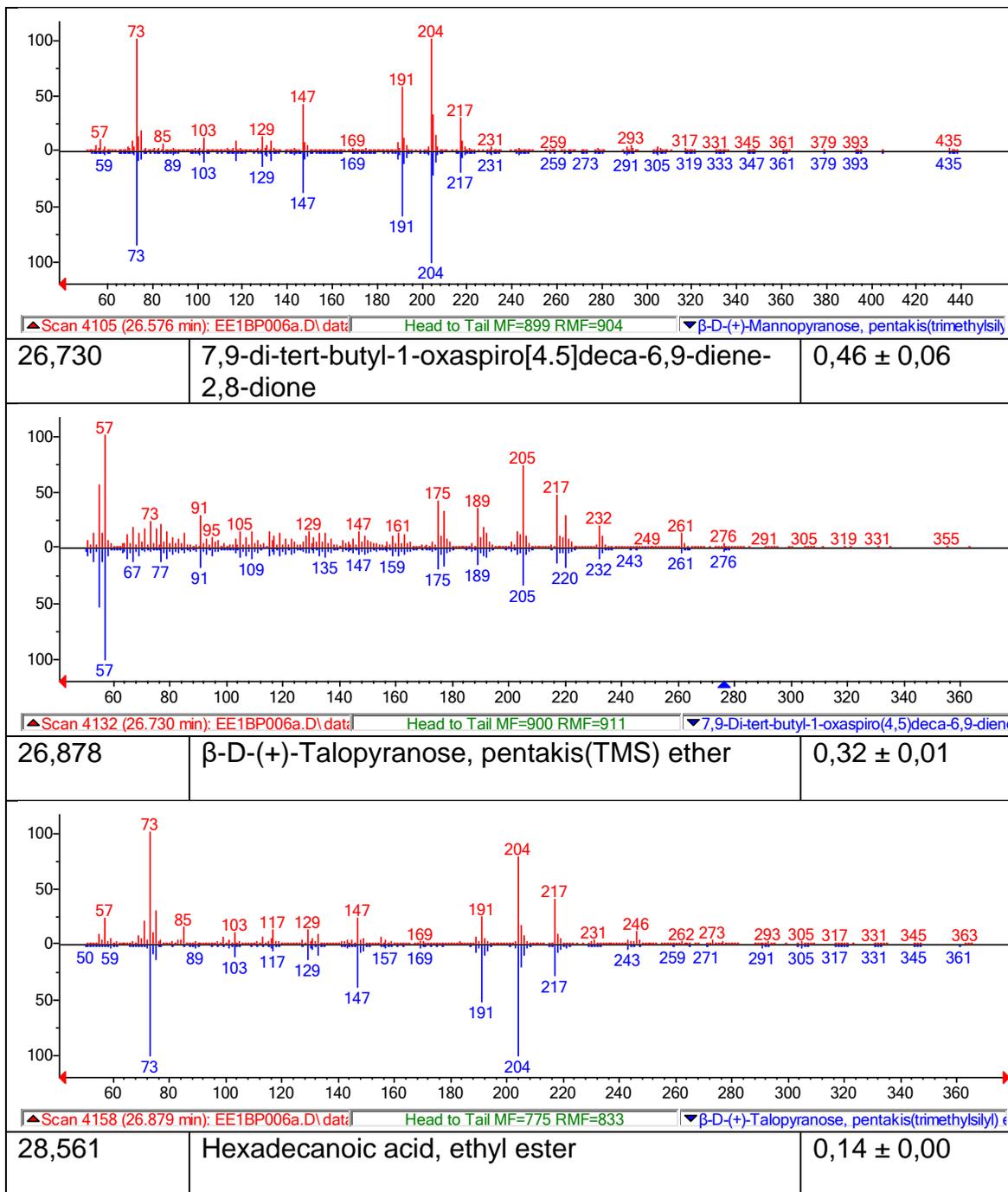


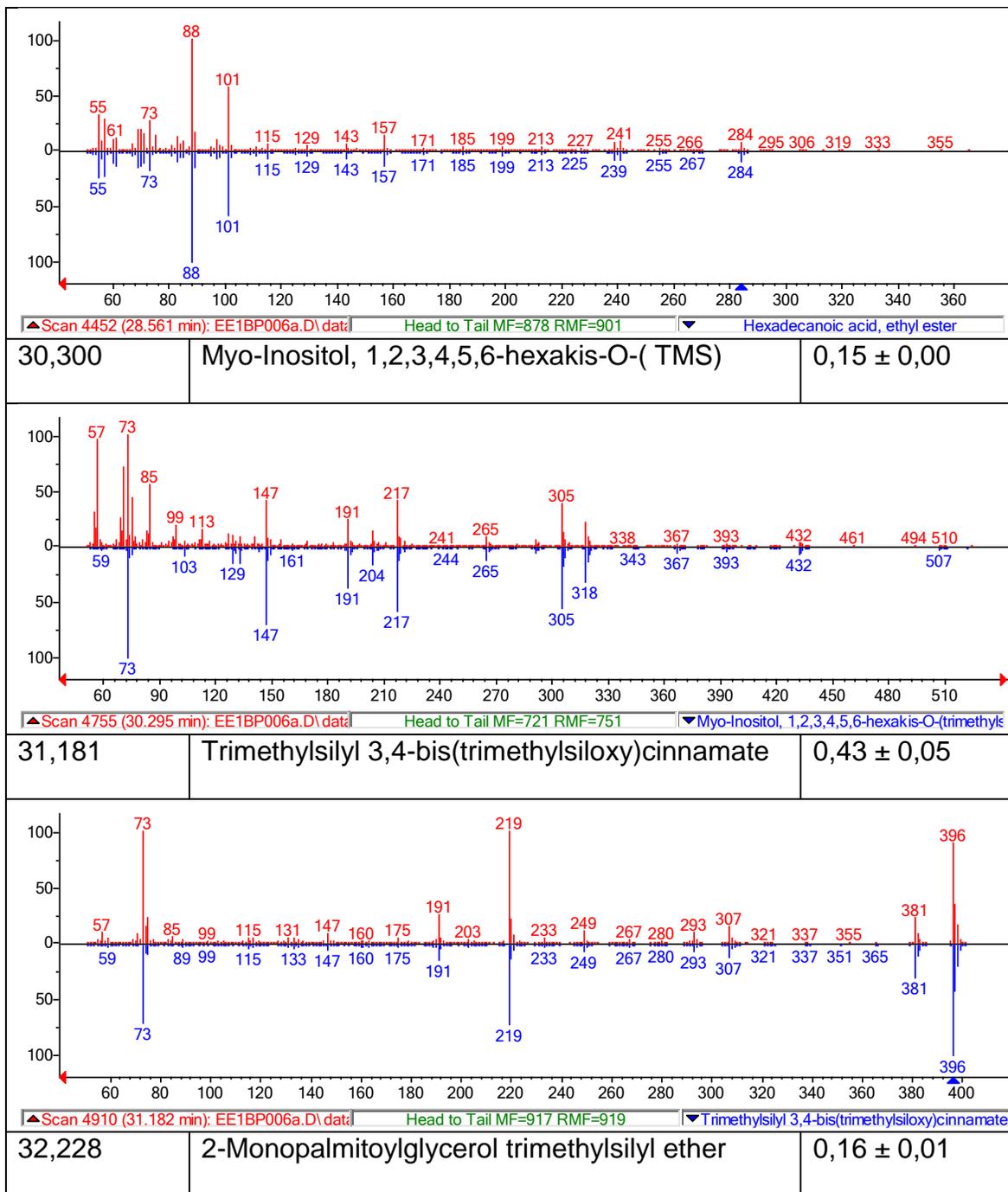


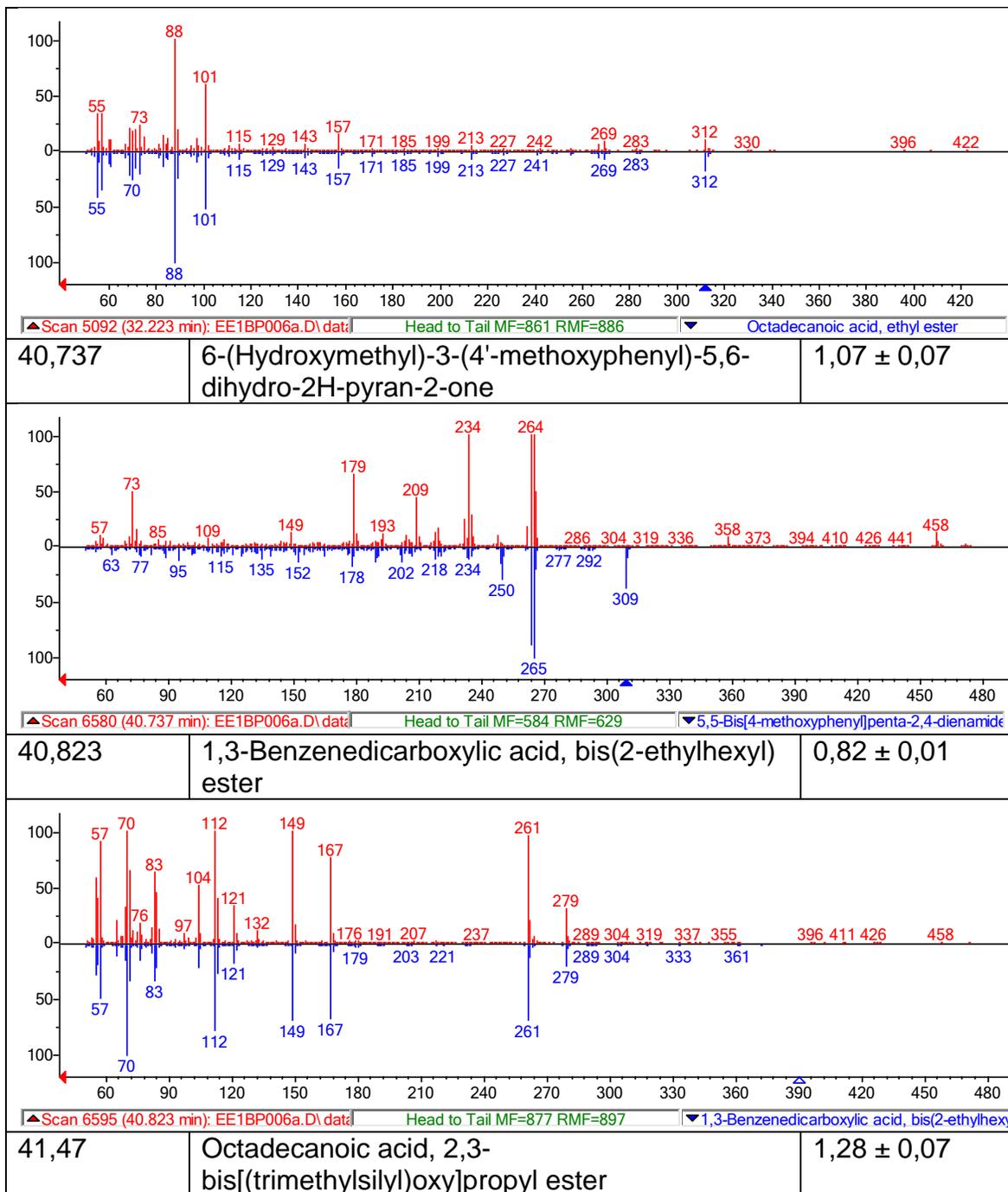
<p>Scan 2661 (18.313 min): EE1BP006a.D\data Head to Tail MF=853 RMF=870 L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl</p>		
18,444	L-Aspartic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(TMS) ester	0,23 ± 0,07
<p>Scan 2684 (18.445 min): EE1BP006a.D\data Head to Tail MF=880 RMF=925 L-Aspartic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) ester</p>		
19,457	8.beta.-(Methoxyeremophil)-7(11)-en-6.alpha.,15: 8.alpha.,12-diolide	1,28 ± 0,30
<p>Scan 2860 (19.452 min): EE1BP006a.D\data Head to Tail MF=875 RMF=879 L-Threonic acid, tris(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyl ester</p>		
20,790	Glutamic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) ester, L	0,25 ± 0,09

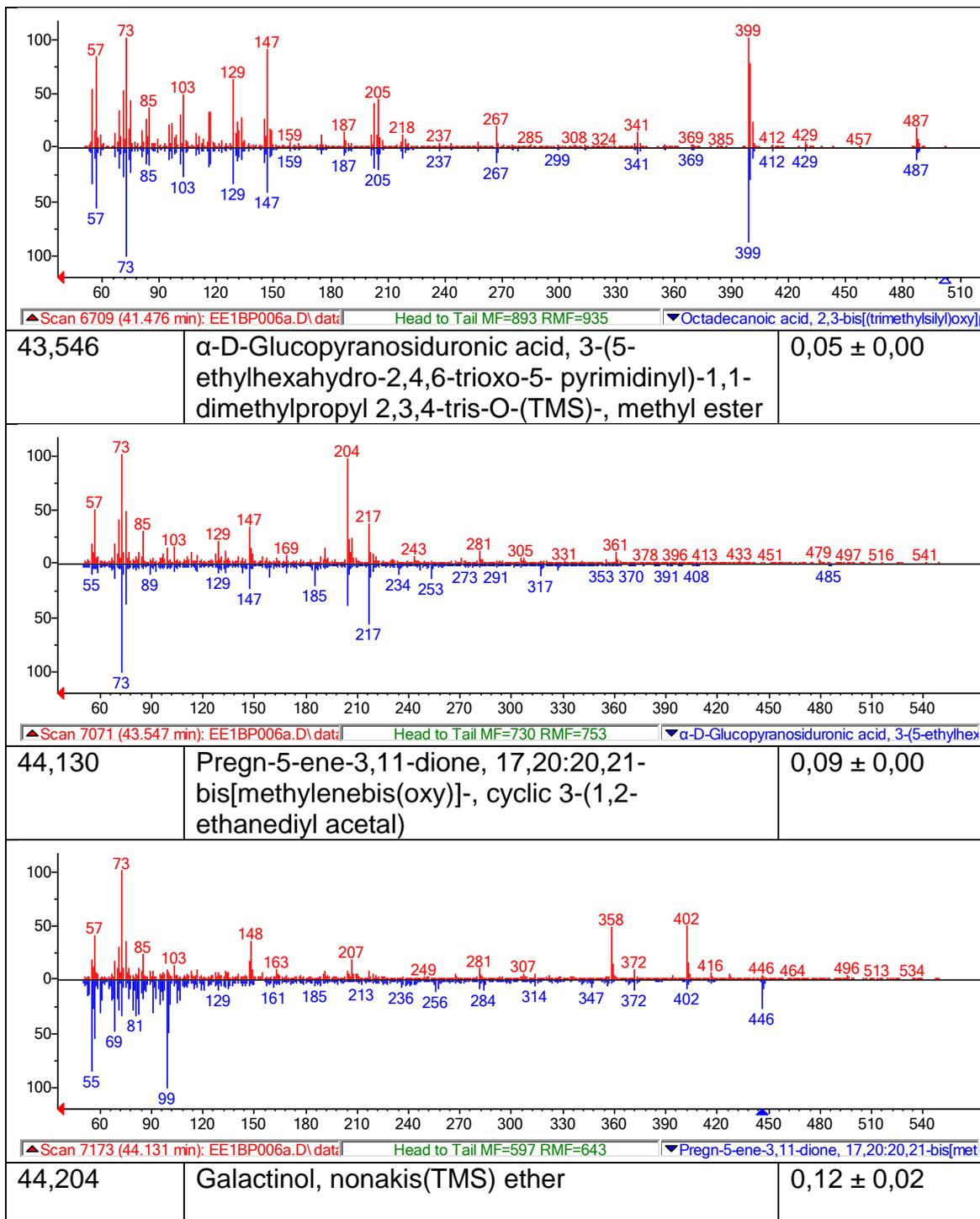


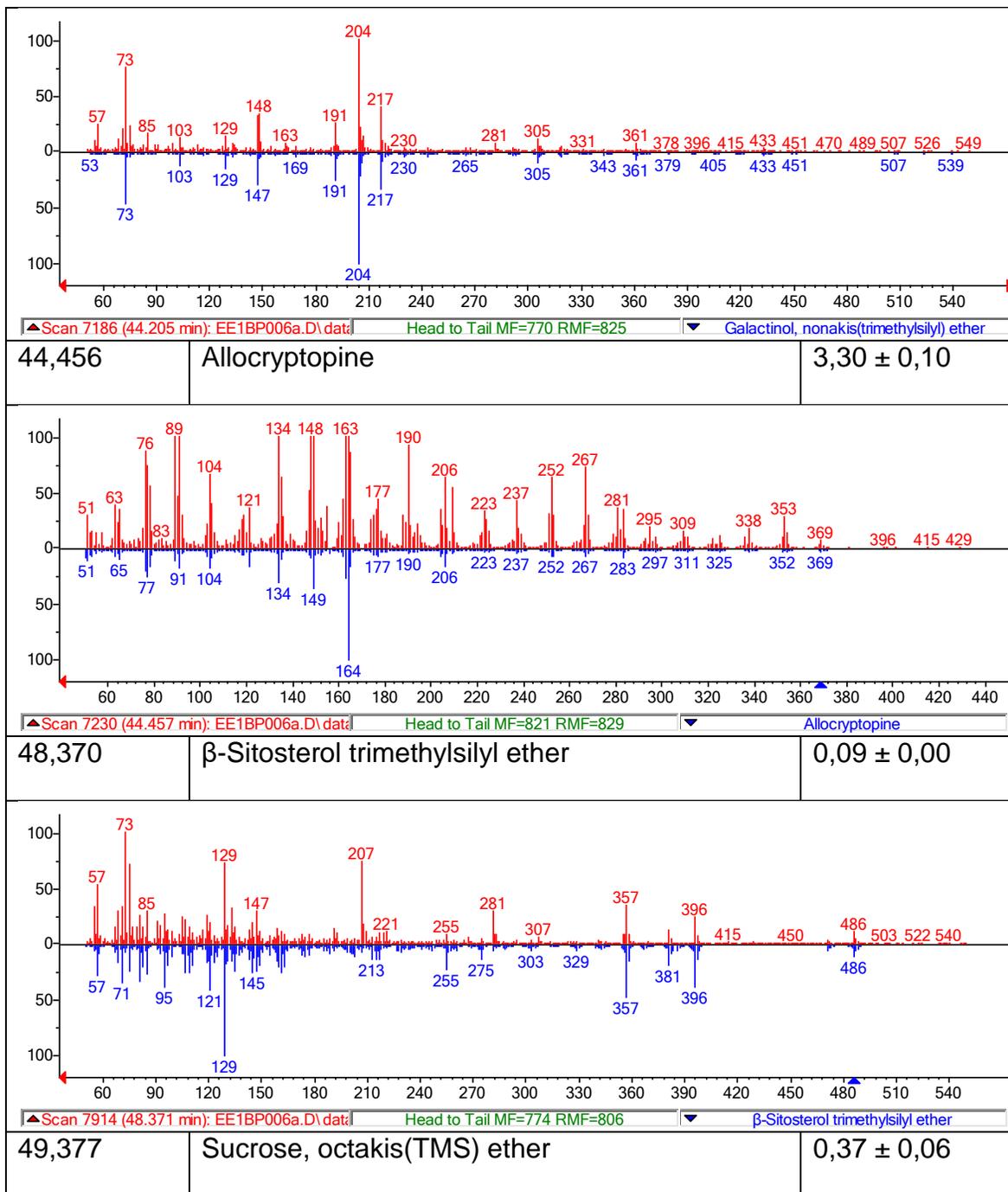


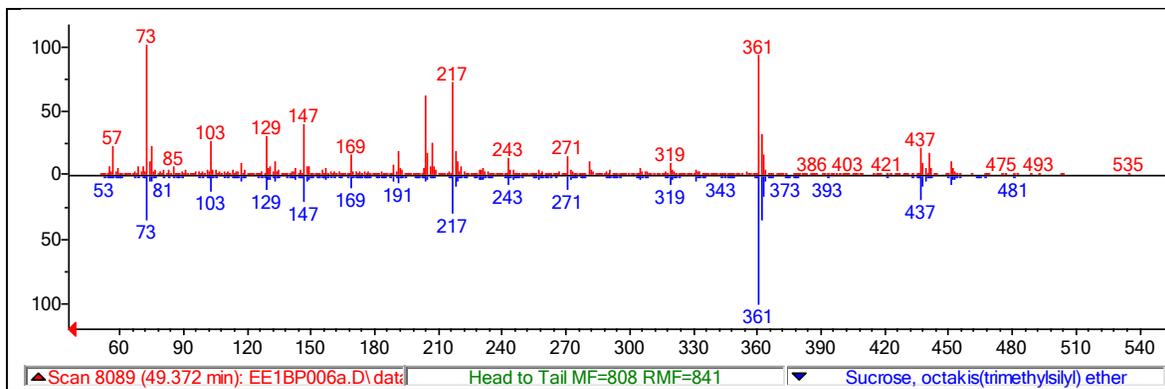












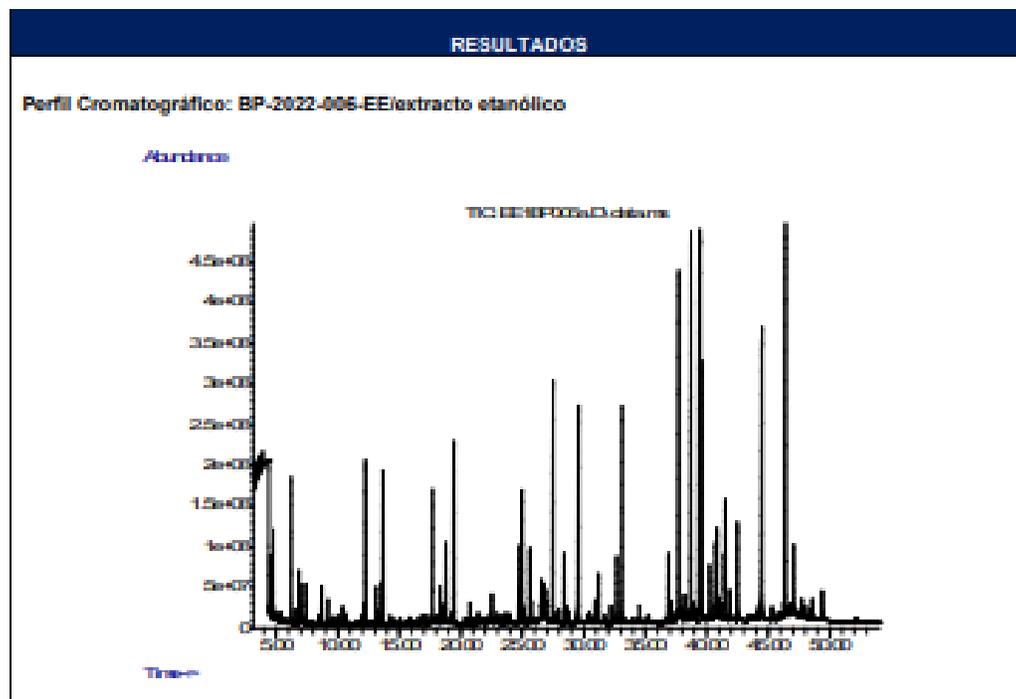
ANEXO 5. INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS CG-EM



INFORME DE RESULTADOS DEL SERVICIO

Identificación del Cliente	
Nombre del cliente: Carlos Curay	
RUC:	Empresa:
Teléfono:	e-mail: carlosscurayy@gmail.com
Dirección:	

Detalles de la muestra analizada	
N° Único del servicio: BP-2022-006	Fecha de informe: 29/04/2022
Nombre de la muestra: Extractos vegetales	Tipo de muestra: Líquida
Número de muestras: 2	Empaque: Envase transparente recubierto con papel aluminio
Fecha de recepción: 08/04/2022	Fecha de pruebas (inicio y fin): 12/04/2022- 26/04/2022
Análisis: Perfil cromatográfico	Método: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

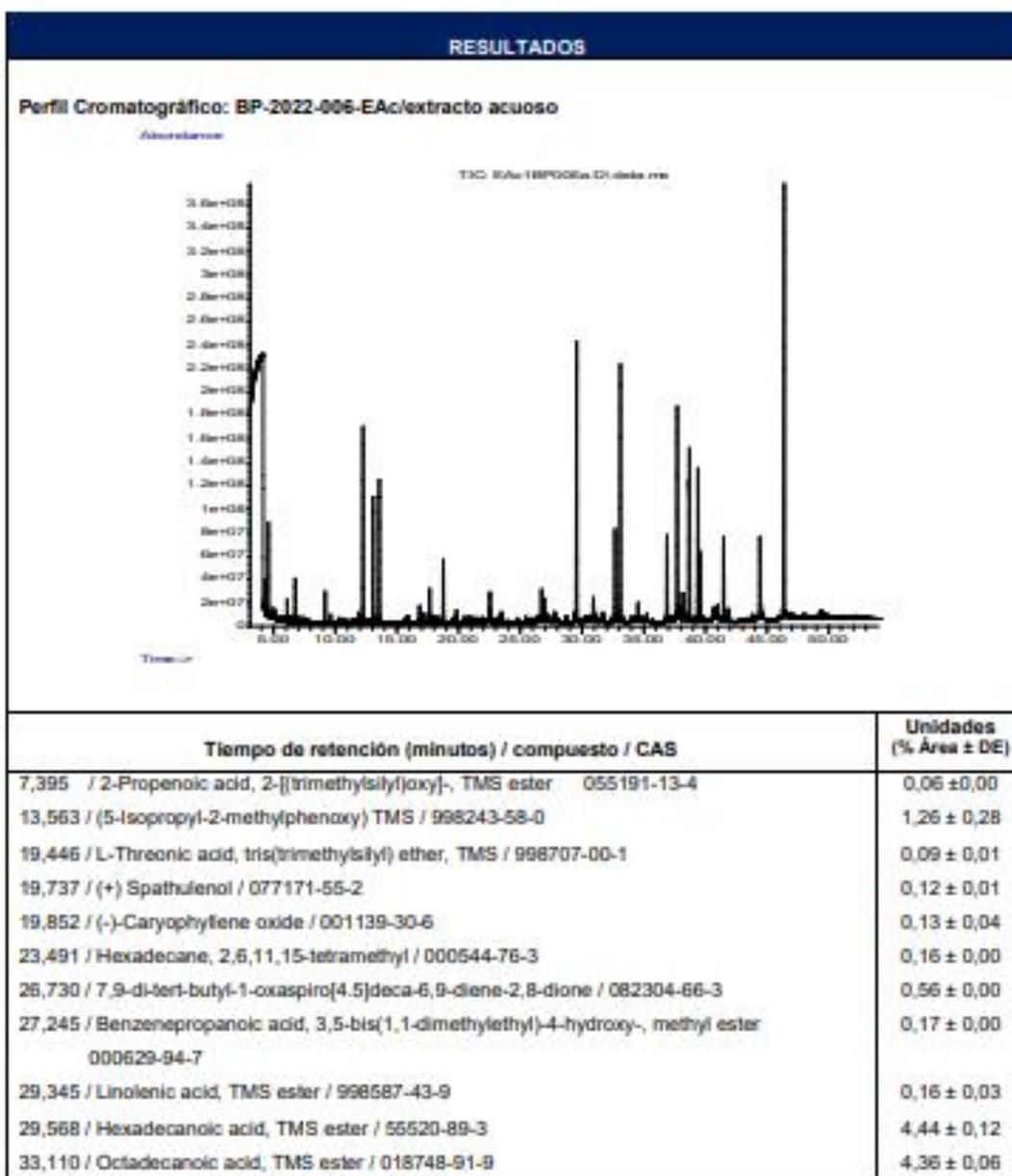




Tiempo de retención (minutos) / compuesto / CAS	Unidades (% Área ± DE)
6,840 / D-lactic acid-di(TMS) / 017596-96-2	0,33 ± 0,02
8,665 / Mono-ethylmalonate, TMS ester / 998190-37-4	0,33 ± 0,02
10,376 / Propanedioic acid, bis (TMS) ester / 018457-04-0	0,19 ± 0,02
13,260 / Succinic acid (2TMS) / 040309-57-7	0,11 ± 0,02
13,575 / (5-Isopropyl-2-methylphenoxy) TMS / 998243-58-0	0,25 ± 0,08
18,313 / L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, TMS ester / 030274-77-2	0,35 ± 0,02
18,444 / L-Aspartic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(TMS) ester / 055288-53-6	0,23 ± 0,07
19,457 / 8.beta.-(Methoxyeremophil)-7(11)-en-6.alpha.,15: 8.alpha.,12-diolide / 998442-91-6	1,28 ± 0,30
20,790 / Glutamic acid, N-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl) ester, L / 015985-07-6	0,25 ± 0,09
22,152 / 2-Methylresorcinol, bis (TMS) ether / 080249-75-8	0,18 ± 0,03
22,767 / α-D-Mannopyranoside, methyl 2,3-bis-O-(TMS)-, cyclic butylboronate / 000629-92-5	0,05 ± 0,02
24,807 / D-(-)-Fructofuranose, pentakis(TMS) ether	0,73 ± 0,02
25,099 / Citric acid-tetra(TMS) / 014330-97-3	0,23 ± 0,08
25,888 / D-(+)-Talofuranose, pentakis(TMS) ether (isomer 2) / 998785-30-3	0,23 ± 0,01
26,575 / beta.-D-Allopyranose, pentakis(TMS) ether / 998785-31-5	0,64 ± 0,02
26,730 / 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione / 082304-86-3	0,46 ± 0,06
26,878 / β-D-(+)-Talopyranose, pentakis(TMS) ether / 019126-99-9	0,32 ± 0,01
28,561 / Hexadecanoic acid, ethyl ester / 000628-97-7	0,14 ± 0,00
30,300 / Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(TMS) / 002582-79-8	0,15 ± 0,00
31,181 / Trimethylsilyl 3,4-bis(trimethylsiloxy)cinnamate / 010586-03-5	0,43 ± 0,05
32,228 / 2-Monopalmitoylglycerol trimethylsilyl ether / 000111-61-5	0,16 ± 0,01
40,737 / 6-(Hydroxymethyl)-3-(4'-methoxyphenyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one / 998277-12-9	1,07 ± 0,07
40,823 / 1,3-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester / 998661-81-5	0,82 ± 0,01
41,47 / Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyloxy)propyl] ester	1,28 ± 0,07
43,546 / α-D-Glucopyranosiduronic acid, 3-(5-ethylhexahydro-2,4,6-trioxo-5-pyrimidinyl)-1,1-dimethylpropyl 2,3,4-tris-O-(TMS)-, methyl ester / 91896808*	0,05 ± 0,00
44,130 / Pregn-5-ene-3,11-dione, 17,20:20,21-bis[methylenebis(oxy)]-, cyclic 3-(1,2-ethanediyl acetal) / 101297-81-8	0,09 ± 0,00
44,204 / Galactinol, nonakis(TMS) ether / 998818-15-2	0,12 ± 0,02



44,456 / Allocryptopine / 000130-86-9	3,30 ± 0,10
48,370 / β-Sitosterol trimethylsilyl ether / 002625-46-9	0,09 ± 0,00
49,377 / Sucrose, octakis(TMS) ether / 025826-85-1	0,37 ± 0,06





39,404 / Sucrose TMS / 91747287*	2,64 ± 0,15
40,994 / 2-Monostearin trimethylsilyl ether / 53336-13-3	0,36 ± 0,03
41,475 / Octadecanoic acid, 2,3-bis((trimethylsilyl)oxy)propyl ester / 001188-75-6	1,22 ± 0,02
41,859 / Squalene / 000111-02-4	0,16 ± 0,01
44,416 / Protopine / 000130-86-9	1,82 ± 0,18
Comentarios: <ul style="list-style-type: none">*: PubChem Library; TMS: trimethylsilyl.Anexo 1 documento Word (Condiciones cromatográficas y preparación de la muestra).Anexo 2 (espectros de masa de compuestos identificados).Los resultados emitidos en este informe corresponden únicamente a las muestras recibidas por el laboratorio.El % área indica la abundancia relativa del compuesto.Las muestras se inyectaron por triplicado. Por lo tanto, los resultados obtenidos se presentan como valores promedios (n=3) ± desviación estándar (DE).La asignación de las estructuras químicas se efectuó por comparación de los espectros de masas de la muestra con los espectros de las bibliotecas del equipo: Wiley, 9na edición / NIST 2011y fueron confirmados por medio del cálculo de los índices de retención lineal.	

Patricia
Manzano
Santana

Firmado digitalmente por
Patricia Manzano Santana
Fecha: 2022.04.29
10:20:10 -05'00'

Patricia Manzano Santana, Ph.D.

Docente - Investigador

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
Escuela Superior Politécnica del Litoral



RAFAEL ANTONIO
VITERI
ESPINOZA

Rafael Viteri E., M.Sc.

Analista de Laboratorio de Investigación 2
Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
Escuela Superior Politécnica del Litoral