



## RESIDENCIA PROFESIONAL

**“Evaluación de compuestos polifenólicos de extractos acuosos y metanólicos de hojas de hierba santa (*Piper auritum Kunth*)”.**

### PRESENTA

Deysi Ermeth Gómez Hernández

### ASESOR

DR. FEDERICO GUTIERREZ MICELI

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Enero de 2014.

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	2
3. OBJETIVO GENERAL.....	2
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ.....	3
4.1 Políticas y normas.....	3
4.2 Objetivos de la institución.....	3
4.3 Servicios que presta la institución.....	3
4.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica .....	4
4.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica .....	4
5. PROBLEMAS A RESOLVER .....	5
6. ALCANCES Y LIMITACIONES .....	5
7. MARCO TEORICO.....	6
7.1 Familia Piperaceae .....	6
7.2 Genero Piper .....	6
7.3 Piper auritum Kunth.....	7
7.3.1 Taxonomía y Descripción .....	7
7.4 Características botánicas.....	7
7.5 Origen y distribución .....	8
7.6 Metabolitos secundarios.....	8
7.6.1 Características generales de los metabolitos secundarios. ....	9
7.6.2 Acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios.....	17
8. METODOLOGÍA.....	18
8.1 Recolección del material vegetal. ....	18
8.2 Obtención de extractos.....	18
8.2.1 Acuosos .....	18
8.2.2 Metanólicos.....	18
8.3 Determinación de la composición fitoquímica de los extractos acuosos y metanólicos.....	19
8.3.1 Análisis cualitativo.....	19
8.3.2 Análisis cuantitativo .....	20
9 RESULTADOS Y DISCUSION.....	24

11	RECOMENDACIONES.....	28
12	BIBLIOGRAFÍA.....	29
13	ANEXOS.....	32

# 1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años hemos observado un gran incremento en la población mundial. Paralelamente al crecimiento poblacional, fueron incrementándose las necesidades alimentarias, por lo cual los sistemas agrícolas se vieron obligados a transformarse para mejorar los rendimientos de su producción. Como resultado de este proceso, existen hoy grandes extensiones de terreno dedicadas a monocultivos, donde se aplica indiscriminadamente insumos químicos que han alterado significativamente el balance entre los elementos de la naturaleza, dañando al ambiente y la salud de los seres vivos (Contreras, 2004).

Una alternativa que se ha estudiado con resultados prometedores, se basa en el hecho que las plantas elaboran metabolitos secundarios, con la finalidad de disminuir el ataque de parásitos y depredadores naturales, muchos de estos compuestos se caracterizan por ser inocuos para el ser humano, y se consideran como “fungicidas naturales” (Hopkins, 1999).

Las especies del género *Piper* tienen importancia comercial, económica y medicinal. Las semillas de *P. nigrum* constituyen la conocida “pimienta negra”, utilizada como condimento en la preparación de alimentos. Otras especies son consideradas remedios para el dolor de estómago, para aliviar dolores de pecho, fiebre y afecciones hemorroides, como antiinflamatorio, en el tratamiento del asma, bronquitis; igualmente se les reconocen actividad insecticida y fungicida (Parmar *et al.*, 1997). Recientemente, extractos de varias especies de *Piper*, colectadas en Antioquia (Colombia), han mostrado una moderada actividad antiplasmodial y baja actividad citotóxica (Mesa *et al.*, 2012)

Este género tiene además una composición química que incluye fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, sesquiterpenos y monoterpenos como borneol, alcanfor, cineol, eugenol, safrol y una amplia variedad de componentes bencénicos (García *et al.*, 2007), también han sido aislados metabolitos secundarios como alcaloides, chalconas, kawapironas, flavonas, aceites esenciales, amidas y alcanmidas entre otros (Soberón *et al.*, 2006; Torres y García, 2001). El aceite esencial de las hojas de *P. auritum* contiene varios terpenoides (mono-, sesqui- y diterpenos), tales como limoneno, linalool, mirceno, canfeno, alcanfor, *p*-cemen-8-ol, *p*-sabineno, entre otros, y algunos flavonoides y fenilpropanoides. Los estudios de tamizaje preliminar muestran la presencia de alcaloides (García, *et al.*, 2007).

La importancia de los compuestos químicos aislados en Piperaceae es notable, por ejemplo, el interés de los lignoides (lignanos, neolignanos y sustancias relacionadas) se debe a su amplia diversidad de actividades biológicas: antitumorales, antifúngica, bactericidas y anti HIV (Ayres y Loike, 1990), así como las amidas, con destacado potencial como agentes insecticidas, moluscicidas y fungicidas (Dyer y Palmer, 2004).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El método de control más empleado para los fitopatógenos es el químico, sin embargo, el uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos ha ocasionado no solo la aparición de poblaciones de insectos cada vez más resistentes a estos productos, sino también un impacto ambiental negativo, afectando a los enemigos naturales, contaminando las capas freáticas y el aire (Albert, 2007).

Por estas razones se han considerado las plantas como un campo apropiado para la búsqueda de nuevas estructuras con menor impacto ambiental y con potencial para el control de plagas agrícolas, dando origen a nuevas e interesantes líneas de investigación en los países de América Latina (Mancebo *et al.* 2000, Rodríguez Hernández *et al.* 1982).

La hierba santa (*Piper auritum* Kunth), es una planta endémica de América Central y América del Sur, y se encuentra distribuida en gran cantidad en el estado de Chiapas. Se han realizado estudios en los cuales se ha demostrado que el aceite esencial de esta especie es efectivo contra diversos hongos fitopatógenos, sin embargo, el rendimiento de este aceite esencial es sólo del 0.27% (Lam, 2011). Por ello, en este estudio se evaluará la composición de los compuestos presentes en los extractos acuosos y metanólicos de esta planta. De obtenerse resultados positivos se espera aumentar el rendimiento de las hojas de hierba santa en comparación con el aceite esencial, además de proporcionar una alternativa natural para el control de plagas, que sea más económica, compatible con el medio ambiente y que no represente riesgos para la salud humana.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar los compuestos polifenólicos presentes en los extractos acuosos y metanólicos obtenidos de las hojas de hierba santa (*Piper auritum*) Kunth.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la composición fitoquímica de los extractos acuosos y metanólicos obtenidos de las hojas de *Piper auritum* Kunth.

Cuantificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos y metanólicos de hojas de *Piper auritum* Kunth.

## **4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ**

El proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal (edificio "J") del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en Carretera Panamericana Km 1080 de esta ciudad.

### **4.1 Políticas y normas**

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

### **4.2 Objetivos de la institución**

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

### **4.3 Servicios que presta la institución**

Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios, en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo regional. Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el postgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.

Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.

Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que cuenta el sistema.

Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.

Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

#### **4.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica**

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico, de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaría de Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecidos.

#### **4.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica**

Las funciones del departamento son múltiples por lo que tiene que coordinarse con otros departamentos:

Coordinar con las divisiones de estudios profesionales y postgrado e investigación, la aplicación de programas de estudios y con el departamento de desarrollo académico, los materiales y apoyos didácticos a las asignaturas de las correspondientes a las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparten en Instituto Tecnológico y controlar el desarrollo.

Coordinar con la división de estudios profesionales y postgrado e investigación, con el departamento de desarrollo académico, la formulación y aplicación de técnicas e instrumento para la evaluación del aprendizaje de las asignaturas correspondientes en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico.

Coordinar los proyectos de investigación educativa, científica y tecnológica en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se llevan a cabo en el Instituto Tecnológico con el sector productivo de bienes y servicios de la región, así como controlar su desarrollo.

Proponer a la Subdirección Académica el desarrollo de recurso y eventos que propicie la superación y actualización profesional del personal docente de las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica, en el Instituto Tecnológico.

Apoyar a la División de Estudios Profesionales en el proceso de titulación de los alumnos del Instituto.

Superar y evaluar el funcionamiento del departamento con las demás áreas y con base a los resultados, proponer las medidas que mejoren su operación.

Coordinar las actividades del departamento con las demás áreas de la Subdirección Académica.

Presentar reportes periódicos de las actividades desarrolladas a la Subdirección Académica.

En el área de Ingeniería Bioquímica se cuenta con laboratorios, los cuales son utilizados para realizar las actividades experimentales correspondientes a las distintas materias impartidas en la institución, así como para la realización de proyectos de investigación que se llevan a cabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología y Química analítica ya que cuentan con el espacio, los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo.

## **5. PROBLEMAS A RESOLVER**

Para la realización de este proyecto se tienen en cuenta diversos factores importantes que intervienen de manera significativa en el avance del proyecto, como ejemplo de ello se tiene el clima ya que por ser la época lluviosa del año la humedad del ambiente ralentiza la velocidad de secado de las hojas que se van a utilizar para obtener los extractos.

Otro factor importante es la falta de reactivos, la cual retarda la ejecución del trabajo planeado, puesto que sin reactivos necesarios no se podría comenzar en los tiempos establecidos y por tanto también nos afecta en la obtención de resultados a tiempo.

## **6. ALCANCES Y LIMITACIONES**

De acuerdo al cronograma de actividades establecido, hasta el momento se ha logrado realizar a tiempo la revisión bibliográfica, la obtención de extractos acuosos y metanólicos, identificación de compuestos presentes en los extractos y la estandarización de técnicas. Lo cual engloba lo contemplado en el cronograma de actividades.

## 7. MARCO TEORICO.

### 7.1 Familia Piperaceae

La familia Piperaceae es considerada una de las más complejas y diversas entre las angiospermas basales, razón por la cual la definición del número de géneros y especies que la componen, su filogenia y modelo de diversidad floral es, en la actualidad, motivo de grandes controversias (Jaramillo y Manos, 2001).

Las Piperáceas crecen en climas tropicales, subtropicales y templados; son hierbas ó arbustos. Esta familia comprende 10 géneros, siendo los principales: *Piper* y *Peperomia*. Estas plantas pueden ser erectas o postradas, tienen hojas alternadas, opuestas o verticiladas pueden o no tener glándulas aromáticas; de hojas enteras con nervadura pinnada. Los tallos tienen nodos, pueden ser articulados aéreos y subterráneos, presentan el tejido vascular primario en dos o más anillos, o en anillos pequeños esparcidos; el xilema sin fibras traqueidas pero con fibras libriformes. El tipo de reproducción es por polinización (son plantas hermafroditas); y por esquejes de los tallos, las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias tipo espada o espádices, son flores diminutas con brácteas suculentas sin perianto. El fruto es una baya y consta de una semilla (Navarro, 2004).

La importancia de los compuestos químicos aislados en Piperaceae es notable, por ejemplo, el interés de los lignoides (lignanos, neolignanos y sustancias relacionadas) se debe a su amplia diversidad de actividades biológicas: antitumorales, antifúngicas, bactericidas y anti HIV (Ayres y Loike, 1990), así como las amidas, con destacado potencial como agentes insecticidas, moluscicidas y fungicidas (Dyer y Palmer, 2004).

### 7.2 Genero Piper

La familia Piperaceae comprende diez géneros y unas 3,000 especies de distribución tropical. Entre los cuales, el género *Piper* está conformado por más de 1200 especies (Flores, 2006).

Las especies del género *Piper* tienen importancia comercial, económica y medicinal. Las semillas de *P.nigrum* constituyen la conocida “pimienta negra”, utilizada como condimento en la preparación de alimentos. Otras especies son consideradas remedios para el dolor de estómago, para aliviar dolores de pecho, fiebre y afecciones hemorroides, como antiinflamatorio, en el tratamiento del asma, bronquitis; igualmente se les reconocen actividad insecticida y fungicida (Parmar *et al.*, 1997). Recientemente, extractos de varias especies de *Piper*, colectadas en Colombia, han mostrado una moderada actividad antiplasmodial y baja actividad citotóxica (Mesa *et al.*, 2012).

Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios (Virinder *et al.*, 1997) a los que se atribuyen sus propiedades.

## 7.3 Piper auritum Kunth

### 7.3.1 Taxonomía y Descripción

*Piper Auritum* Kunth

Nombre científico: *Piper Auritum*

Reino: Plantea

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: Piper

Especie: Auritum

Nombre binominal: Kunth

### 7.4 Características botánicas.

*Piper Auritum* Kunth, acuyo, hierba santa u hoja santa, es un arbusto de hoja frondosa de 2 m de altura. Las hojas son acorazonadas y grandes, de color verdoso. Las flores están colocadas en espigas parecidas a cordoncillos de color verde pálido. Al estrujarse las hojas despiden un olor agradable. Ésta planta se encuentra en la lista de la agencia del gobierno de los Estados Unidos Food and Drug Administration (FDA), (Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés) para su uso como saborizante de alimentos. (Diego, 2011).



Figura 1. Hojas y flores de *Piper auritum* Kunth.

## **7.5 Origen y distribución**

Es una especie originaria de México, distribuida en la parte sur del continente Americano, habita en climas cálido, semicálido y semiseco desde el nivel del mar hasta los 2000 m. Crece a orillas de caminos en vegetación de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, perennifolio y bosque mixto de pino-encino de terreno semiseco (Diego, 2011). Es cultivada también, ya que crece fácilmente y puede ser sembrada en cualquier época del año.

## **7.6 Metabolitos secundarios.**

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, aunque si se verá afectada por ella, a veces gravemente.

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque de insectos y microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que destruyen la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda et al., 2013).

La composición y estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Esas respuestas de defensa a su vez, se combina con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las resinas, las espinas, los tricomas y los pelos glandulares. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Croteau et al., 2000).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda et al., 2013).

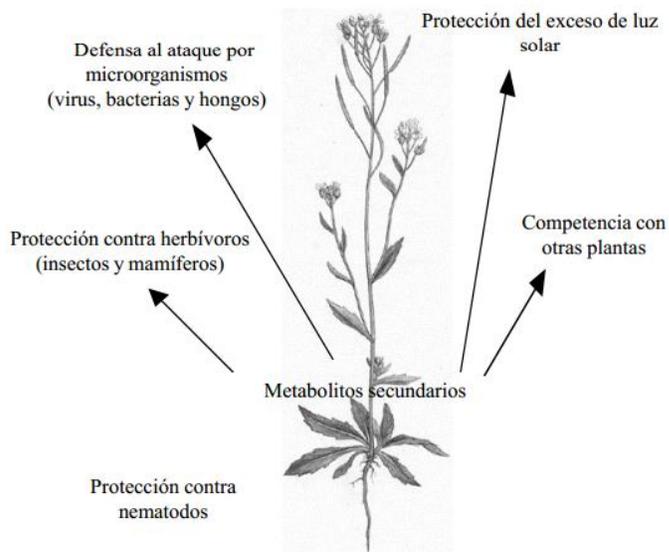


Figura 2. Eventos en los que los metabolitos secundarios de las plantas se inducen durante la respuesta de defensa.

### 7.6.1 Características generales de los metabolitos secundarios.

En la actualidad, se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos; los no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999). Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato.

Existen tres grupos principales de metabolitos secundarios: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Madiz et al., 2011).

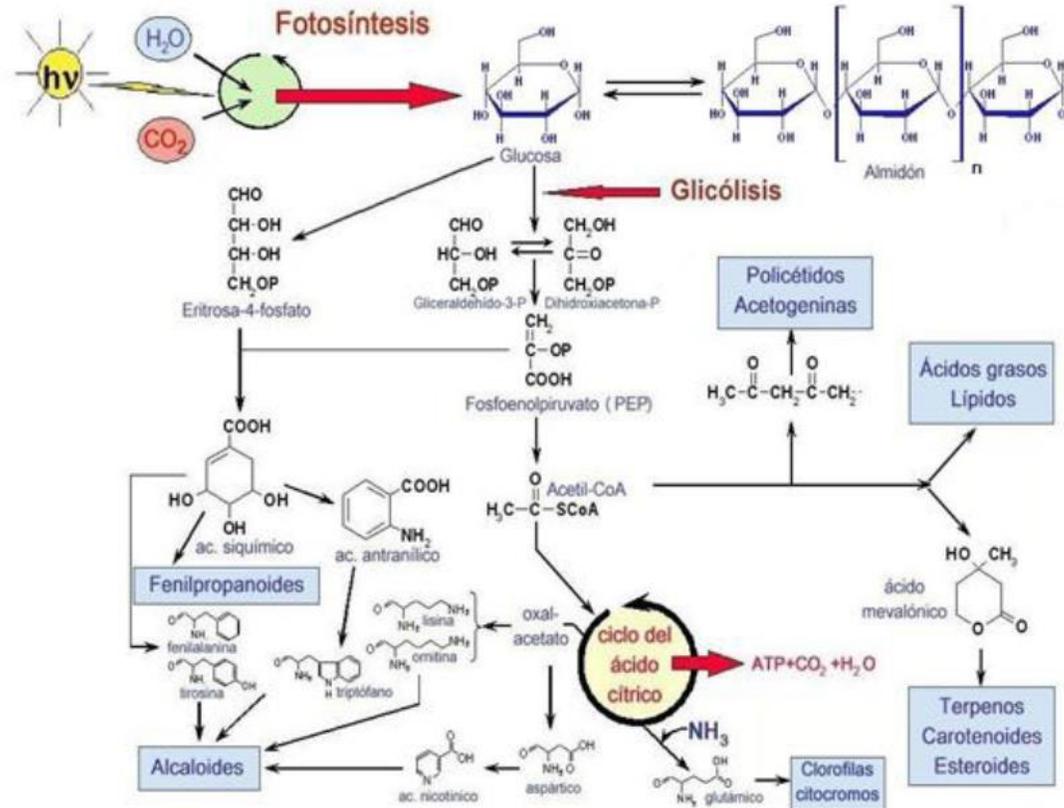


Fig. 3 Origen de algunos metabolitos secundarios (fenilpropanoides, alcaloides, terpenos) en el metabolismo primario.

### 7.6.1.1 Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el mayor grupo de compuestos secundarios. Los diferentes compuestos de esta clase son generalmente insolubles en agua. Son sintetizados a partir de acetil CoA o de intermediarios glucolíticos. Los elementos estructurales básicos de los terpenos se conocen como unidades de isopreno por que los terpenos pueden descomponerse a elevadas temperaturas dando isopreno. En ocasiones a los terpenos también se les conoce como terpenoides (Taiz y Zeiger, 2006).

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen. Los terpenos de diez carbonos, que contienen dos unidades de C<sub>5</sub>, se denominan monoterpenos, los terpenos de quince carbonos (3 unidades de C<sub>5</sub>) son sesquiterpenos; y los terpenos que tienen veinte carbonos (4 unidades de C<sub>5</sub>) son diterpenos. Los terpenos más grandes incluyen triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) y politerpenoides ([C<sub>5</sub>]<sub>n</sub>, cuando n>8) (Taiz y Zeiger, 2006).

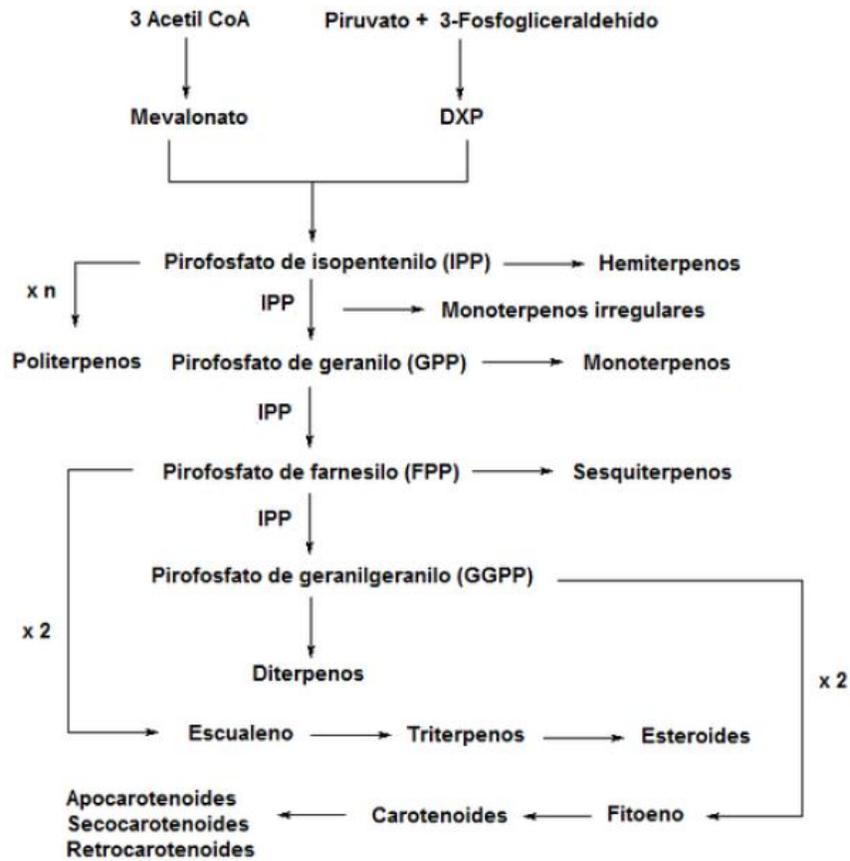


Fig.4 Ruta de síntesis de terpenos.

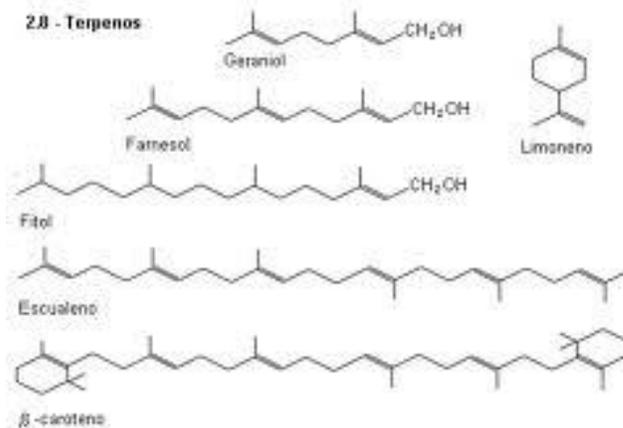


Fig.5 Estructuras de algunos terpenos.

Se presume que una vasta cantidad de terpenos se encuentran envueltos en mecanismos de defensa de las plantas, como toxinas y elementos de disuasión a la alimentación de un gran número de insectos y mamíferos que se alimentan de plantas (Madiz et al., 2011).

#### **7.6.1.2 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos están formados por un grupo hidroxilo funcional unido a un anillo aromático llamado fenol (Figura) (Madiz et al., 2011).

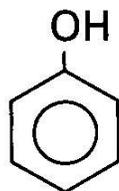


Fig.6 Estructura del fenol.

Los compuestos fenólicos de las plantas forma un grupo químicamente heterogéneo de unos 10, 000 compuestos: algunos son solubles sólo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glucósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles. Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas, y por ello, constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista metabólico. Existen dos rutas básicas implicadas: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido mevalónico. La ruta del ácido shiquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles en las plantas. La vía del ácido mevalónico, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, es poco empleada en plantas superiores. La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico (Taiz y Zeiger, 2006).

Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en los sistemas de defensa de las plantas contra plagas y enfermedades, incluyendo nemátodos que parasitan la raíz (Wuyts et al., 2006). Una concentración elevada de ozono incrementa el contenido de fenoles totales en las hojas (Savirnata et al., 2010). Estos compuestos comprenden: cumarinas, flavonoides, lignina, antocianinas, antocianidinas y taninos.

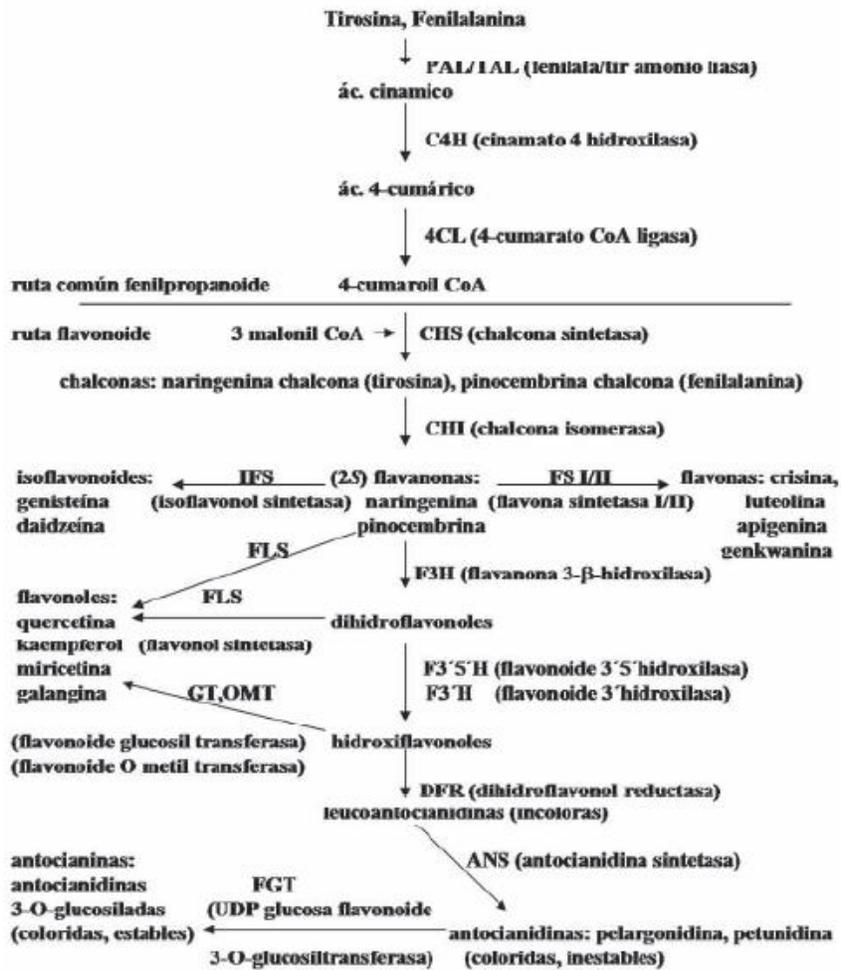


Fig.7 Ruta de biosíntesis de los compuestos fenólicos.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides (Fig. 8). Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación.

En la ruta de biosíntesis de flavonoides (Fig. 8), la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por chalcona sintasa y da lugar a naringenina chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación de estilbenos implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (Taiz y Zeiger, 2006).

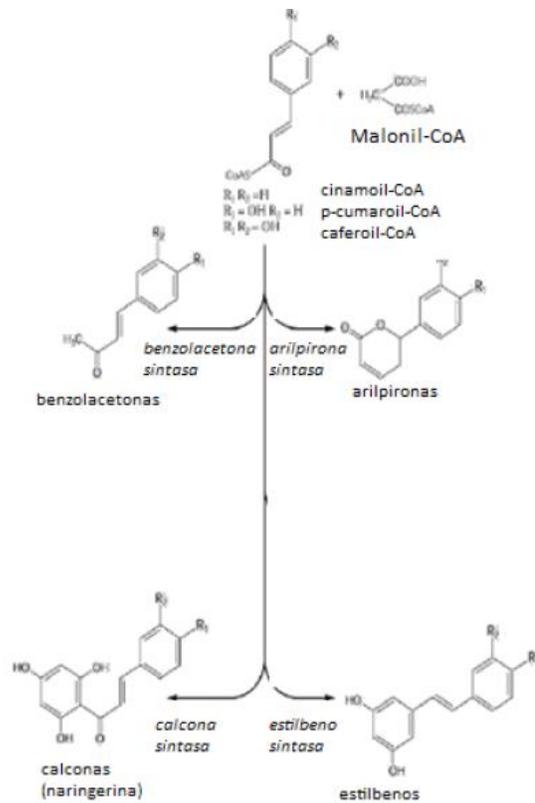


Fig. 8 Síntesis de flavonoides.

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos. Por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3. Cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas (Fig.9).

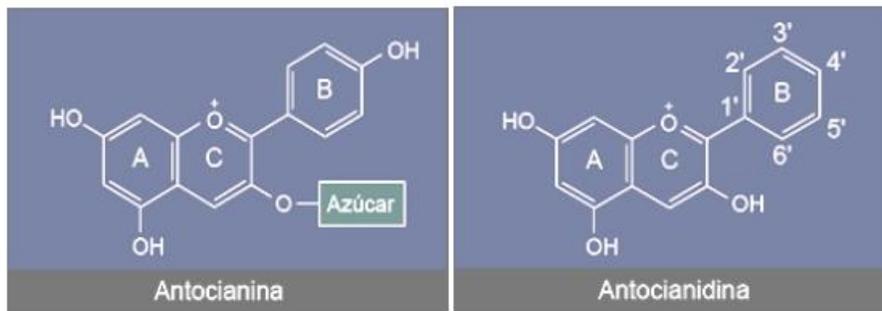


Fig.9 Estructura química de la antocianina y la antocianidina.

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos). Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables (Fig.10).

Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para dar antocianidinas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente.

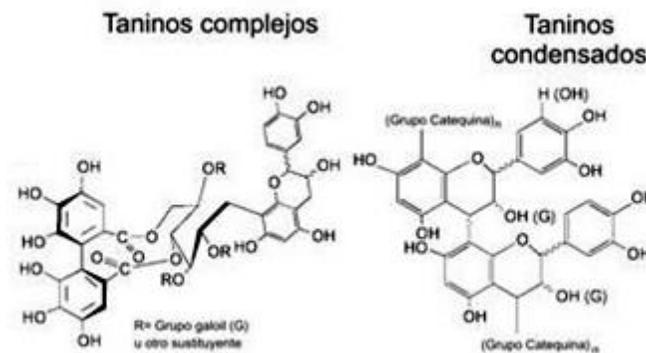


Fig.10 Taninos condensados y taninos hidrolizables

Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. También actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que evitan, en el caso de los mamíferos, plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Esto ocurre en los frutos inmaduros en los que se concentran los taninos en la piel. Sin embargo, los taninos del vino tinto tienen efecto beneficioso en la salud humana al bloquear la formación de endotelina-1, una molécula señal que provoca vasoconstricción.

### 7.6.1.3 Compuestos que contienen nitrógeno y azufre

#### 7.6.1.3.1 Compuestos que contienen sulfuros.

Estos compuestos incluyen al glutatión (GSH), glucofosfolípidos (GSL), fitoalexinas, defensinas, tioninas y lectinas, los cuales han sido relacionados directa o indirectamente en la defensa de las plantas contra patógenos microbianos (Madiz et al., 2011) también se encuentran en este grupo las saponinas, glicósidos cardíacos y glucosinolatos.

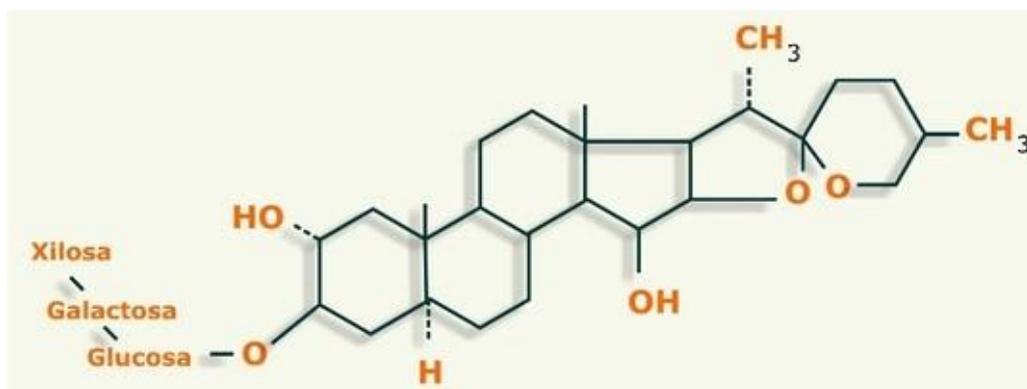


Fig.11 Estructura química de saponina.

#### 7.6.1.3.2 Compuestos con nitrógeno.

Este tipo de compuestos incluye a los alcaloides, glucósidos cianogénicos y aminoácidos no proteicos. La mayoría de ellos son sintetizados a partir de aminoácidos comunes. Se consideran interesantes debido a su papel en la defensa contra herbívoros y su toxicidad en los seres humanos (Madiz et al., 2011).

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos.

Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina.

El opio es quizá uno de los primeros alcaloides conocidos, el exudado (látex) de la cápsula inmadura de *Papaver somniferon*. Este exudado contiene una mezcla de más de 20 alcaloides diferentes entre los que se encuentran la morfina y la codeína. Ambos alcaloides pertenecen a un grupo denominado alcaloides isoquinolínicos que sintetizan a partir de la reticulina (Fig.12).

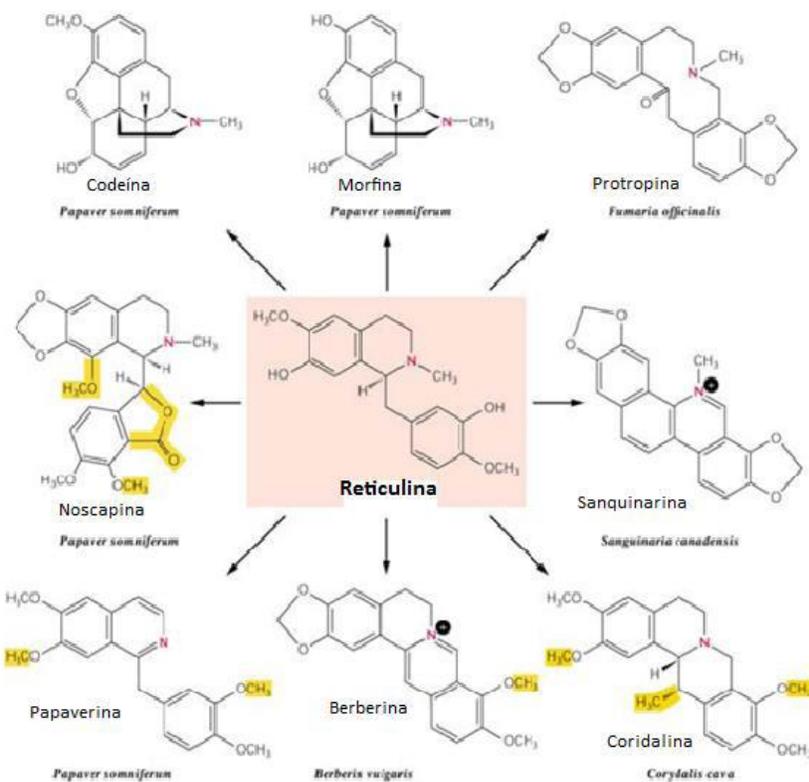


Fig.12 Estructura química de alcaloides derivados de la reticulina.

### 7.6.2 Acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999). Sus mecanismos de acción son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el DNA, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999).

## **8. METODOLOGÍA.**

### **8.1 Recolección del material vegetal.**

La recolección de las hojas de *Piper auritum* Kunth se realizaron manualmente en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (16°45'11''N 93°06'56''O); durante el mes de Julio de 2013, de una planta de 3 metros de altura y aproximadamente 15 años de edad, se selecciono el material vegetal de buen color y que no presentaba daños. El material vegetal fue transportado a las instalaciones del laboratorio de biotecnología del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez en bolsas de papel estraza, protegiéndolo de la luz solar y el contacto con el agua.

Las hojas se lavaron con agua potable, se secaron con servitoallas, se cortaron en trozos y fueron colocadas en bolsas de papel estraza luego se secaron al aire libre durante tres semanas hasta peso constante; posteriormente fueron molidas hasta obtener un polvo fino, el cual se almaceno en bolsas de papel estraza hasta su uso.

### **8.2 Obtención de extractos.**

#### **8.2.1 Acuosos**

Para la preparación de los extractos acuosos, se pesaron 50 g de material vegetal pulverizado, se deposito en un vaso de precipitado de 1 Lt y se le agregaron 500 mL de agua hirviendo. La mezcla se dejo en reposo durante 20 min, se filtro con una gasa luego fue sonicada durante dos horas, posteriormente se coloco el extracto en tubos falcon de 50 ml, se centrifugo a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se filtro al vacio con papel Whatman No. 1, finalmente se almaceno en frasco ámbar a -20°C hasta su uso.

#### **8.2.2 Metanólicos**

Se pesaron 20 g hojas pulverizadas, los cuales se colocaron envaso de precipitados de 1 Lt, al cual se le adicionaron 450 mL de metanol al 100%, fue sometido a sonicación durante 2 h a temperatura ambiente, se filtro con papel Whatman No. 1 y posteriormente se coloco el extracto en tubos falcon de 50 ml, se centrifugo a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se evaporo a vacío en un rotavapor, a una temperatura de 45 °C. El residuo se resuspendió en 15 mL de metanol y se almaceno a -20°C hasta su uso en un frasco ámbar.

## 8.3 Determinación de la composición fitoquímica de los extractos acuosos y metanólicos.

### 8.3.1 Análisis cualitativo.

Las pruebas cualitativas para determinar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos y metanólicos de *Piper auritum* Kunth, se realizaron por cromatografía en capa fina (CCF); empleando como fase estacionaria, placas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (marca Merck) de 10 x 20 cm y como fase móvil el sistema de solventes cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) para el extracto metanólico y butanol: ácido acético: agua (60:25:15) para el extracto acuoso.

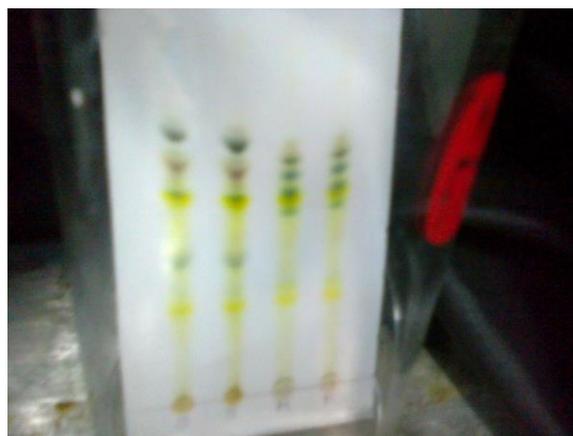


Fig. 13 Placa cromatográfica en el tanque de saturación.

#### 8.3.1.1 Flavonoides.

Para la identificación de flavonoides se aplicó 5 µL de cada extracto en la placa de gel de sílice, posteriormente la placa se colocó en una cámara para cromatografía en capa fina (CCF) previamente saturada durante 45 minutos con 10 ml de el sistema de solventes cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) para el extracto metanólico y butanol: ácido acético: agua (60:25:15) para el extracto acuoso. Debido a que todos los flavonoides tienen la capacidad de causar fluorescencia amarilla, azul o verde dependiendo de la estructura que posean, la placa desarrollada fue revelada con el reactivo citrobórico, se calentó a 100°C en estufa durante 5 minutos y se visualizó en una lámpara fluorescente de luz ultravioleta de onda corta.

#### 8.3.1.2 Taninos

Para esta determinación se colocaron 5 µL de cada extracto sobre la placa de gel de sílice, las fases móviles utilizadas para el desarrollo de la cromatografía fueron cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) y butanol: ácido acético: agua (60:25:15). Una vez desarrolladas las placas se asperjó con reactivo Vainillina al 5% en HCl. Las zonas que muestran una coloración roja o roja púrpura revelarán la presencia de taninos y/o flavanonas.

### **8.3.1.3 Cumarinas.**

Para este análisis se colocaron 5 µL de cada uno de los extractos sobre la placa de gel de sílice y se desarrolló la CCF en una cámara vertical previamente saturada con los sistemas de solventes cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) y butanol: ácido acético: agua (60:25:15). La placa desarrollada fue revelada con una solución de KOH al 5% en etanol. La aparición de zonas con fluorescencia azul reveló la presencia de cumarinas.

### **8.3.1.4 Saponinas**

Para la identificación de saponinas, las placas se desarrollaron en una cámara vertical previamente saturada con los sistemas de solventes compuestos por cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) y butanol: ácido acético: agua (60:25:15). Las placas fueron reveladas con el reactivo de vainillina-ácido sulfúrico: primero se rociaron los cromatófolios con una solución de ácido sulfúrico al 5% en etanol y luego con una solución de vainillina al 1% en etanol, posteriormente se calentó a 110°C por 10 min. La presencia de saponinas en las muestras es positiva si se observan zonas azules o verdes (saponinas esteroidales) y violetas (triterpenoides).

### **8.3.1.5 Alcaloides**

Para las pruebas en CCF, los sistemas de solventes utilizados fueron cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:14:1) y butanol: ácido acético: agua (60:25:15) y las placas se revelaron con el reactivo de Dragendorff. La presencia de alcaloides es positiva si se observan manchas de color naranja en las placas.

## **8.3.2 Análisis cuantitativo**

### **8.3.2.1 Fenoles totales (método colorimétrico de Folin- Ciocalteau)**

La concentración de fenoles totales fue determinada por el reactivo Folin-Ciocalteau, para ello se realizó una curva patrón con las siguientes concentraciones de ácido gálico: 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 ppm.

En tubos de ensayo se agregaron 0.05 ml (5µl ) de cada concentración de ácido gálico, luego se agregaron 2.1 ml de agua destilada, se agregaron 0.25 ml (250 µl) de reactivo de Folin – Ciocalteau, se agitaron los tubos durante 1 minuto en un vórtex, posteriormente se añadió 0.5 ml (500 µl) de solución de carbonato de sodio al 20%, nuevamente se agregan 2.1 ml de agua destilada y se dejaron reposar por dos horas en la oscuridad, transcurrido el tiempo se midieron absorbancias a 765 nm. Para realizar el blanco se añadieron 50 µl de agua destilada en lugar de la solución de ácido gálico. Se realizaron pruebas por triplicado. Para cuantificar el extracto únicamente se agregaron 50 µl de los extractos con una disolución 1:50, en lugar del ácido gálico lo demás se realizó de la misma manera. Las pruebas se realizaron por triplicado.

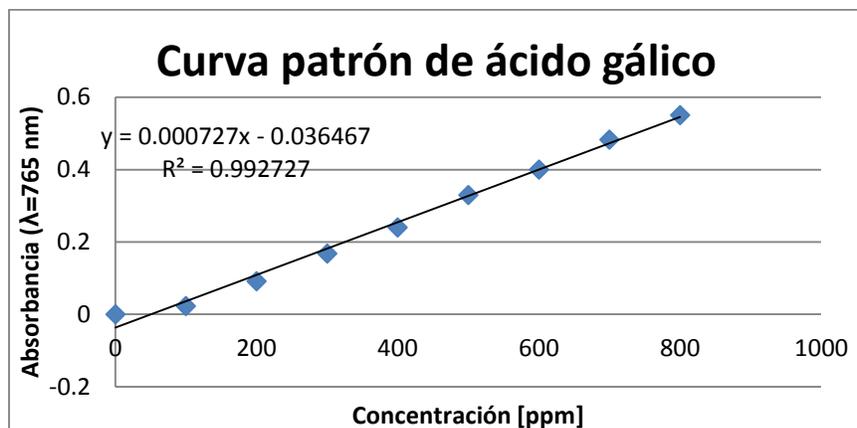


Fig. 14 Curva patrón de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales.

### 8.3.2.2 Flavonoides (método colorimétrico cloruro de aluminio).

Se realizó una solución patrón de quercetina, la cual se realizó de la siguiente manera: se disolvieron 10 mg de quercetina al 80% en agua destilada y se obtuvieron las concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a partir de esta solución y etanol al 80%.

Se agregaron en un tubo de ensayo 0.5 mL de solución de quercetina, se le adicionó 1.5 mL de etanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se midió la absorbancia de la mezcla reaccionante a 415 nm. Para el blanco, la cantidad de solución de quercetina se sustituyó por la misma cantidad de agua destilada y se añadieron 0.5 mL de etanol al 80%. Las pruebas se realizaron por triplicado. Para realizar la cuantificación de los extractos se sustituyó la solución de quercetina por 0.5 mL de extracto (500  $\mu\text{L}$ ) en dilución 1:100. Se realizaron las pruebas por triplicado.

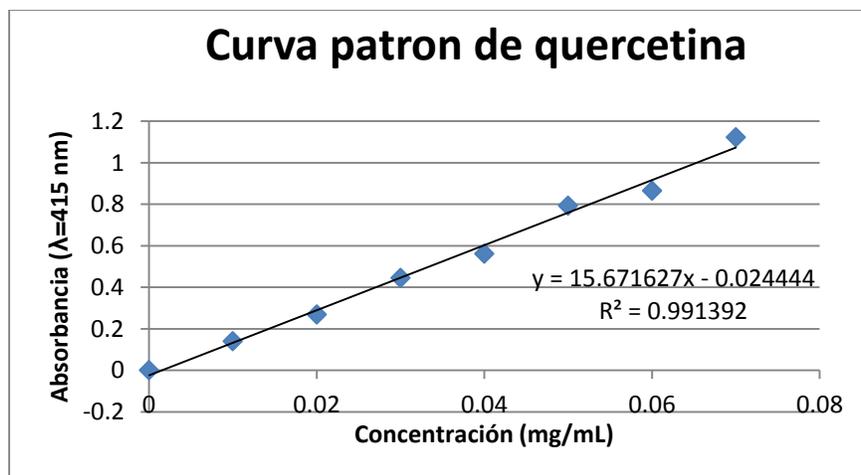


Fig.15 Curva patrón de quercetina para cuantificación de flavonoides.

### 8.3.2.3 saponinas totales.

Se preparo una solución patrón de diosgenina a una concentración de 1 mg/ml en cloroformo. De la solución patrón se colocaron en tubos de ensayo concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mg/ml, de estos tubos se tomaron 20 µl de solución de diosgenina de cada concentración, posteriormente se evaporo el cloroformo a 70°C, se adicionaron 200 µl de vainillina al 5% y 800 µl de acido perclórico, se mantuvo a 70°C por 15 para el desarrollo de color y se enfrió a 0°C por 2 minutos, se llevo a 2.5 ml con acido acético glacial, luego se estabilizo por 30 minutos y se midió la absorbancia a 454 nm. El blanco lleva acido acético glacial en lugar de solución estándar. Para cuantificar los extractos se agregaron 250 µl de cada extracto en disolución 1:50 en lugar de la solución de diosgenina. Se realizaron las pruebas por triplicado.

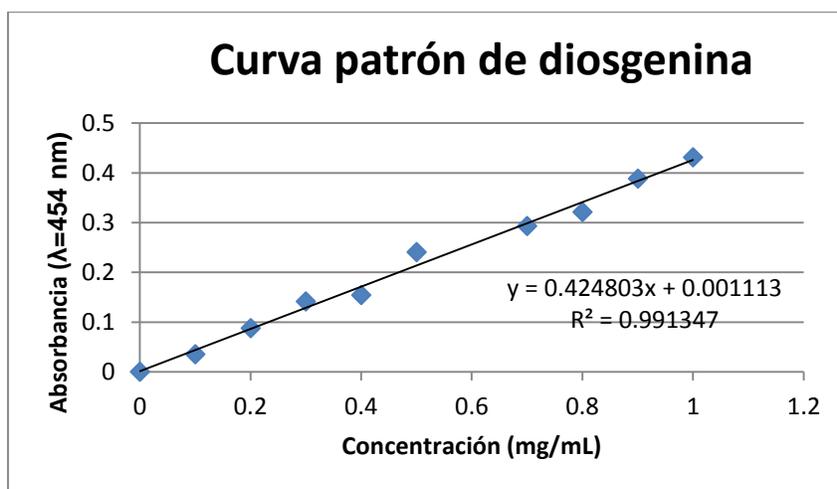


Fig. 16 Curva patrón de diosgenina para la cuantificación de saponinas.

### 8.3.2.4 proantocianidinas (taninos condensados).

Se realizo una solución patrón de catequina de 0.12mg/ml en metanol y a partir de esta se llevaron a concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.11 y 0.12 mg/ml, se tomo 1 ml de cada una de estas concentraciones de solución estándar y se adiciono 2.5 ml de vainillina al 1% en metanol, 2.5 ml de HCl en metanol y se dejo reposar a 35°C por 15 minutos, se tomo la lectura a 500 nm. Para el blanco se adicionó 1 ml de metanol en lugar de solución estándar; para cuantificar los extractos se adicionó 1 ml de cada extracto con una dilución de 1:50 en lugar de la solución estándar. Se realizaron las pruebas por triplicado.

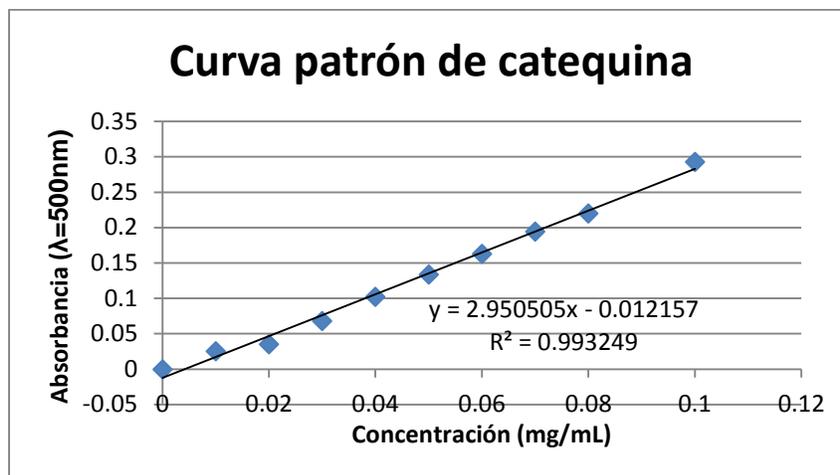


Fig.17 Curva patrón de catequina para cuantificación de taninos condensados.

### 8.3.2.5 cumarinas.

Se utilizó una solución patrón de umbeliferona con una concentración de 0.2 mg/ml en etanol y agua, en concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.1 mg/ml, posteriormente se añadió 500  $\mu\text{l}$  de acetato de plomo al 5%, se aforo a 10 ml con agua destilada posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, luego se transfirió 1 ml de sobrenadante a un tubo de ensayo y se añadió 4ml de de solución de HCl 0.1 M, se leyó en el espectro a 320 nm, usando un blanco de solución de HCl 0.1 M. para cuantificar los extractos se cambia la solución estándar de umbeliferona por 1 ml de los extractos en dilución 1:50. Se realizaron las pruebas por triplicado.

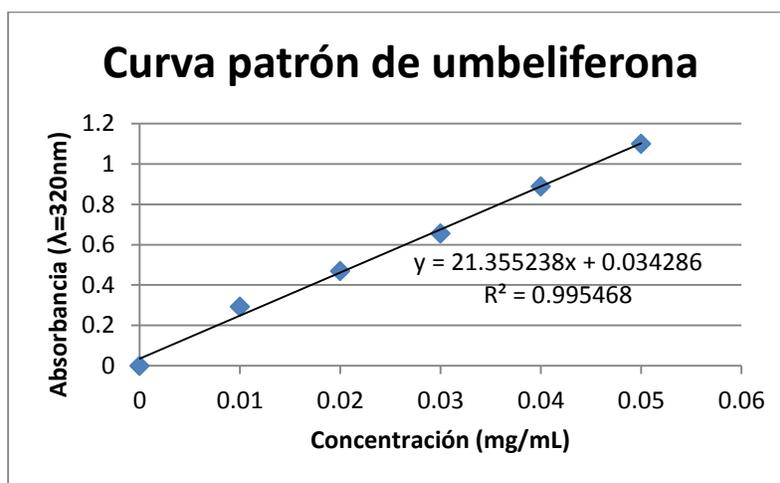


Fig.18 Curva patrón de umbeliferona para la cuantificación de cumarinas.

## 9 RESULTADOS Y DISCUSION.

Cuadro 1. Composición fitoquímica de hojas de *Piper auritum* Kunth obtenida por cromatografía en placa fina (CCF).

Componente	Color	Extracto metanólico	Extracto acuoso
<b>Flavonoides</b>	Amarillo, azul o verde	Presentes	Presentes
<b>Taninos</b>	Rojo	Presentes	Presentes
<b>Cumarinas</b>	Azul o verde	Presentes	Presentes
<b>Saponinas</b>	Azules, verdes, violetas	Presentes	Presentes
<b>Alcaloides</b>	Naranja	Probablemente presentes*	Probablemente presentes*

\*se sospecha debido a las leves manchas de color naranja que se aprecian en la placa.

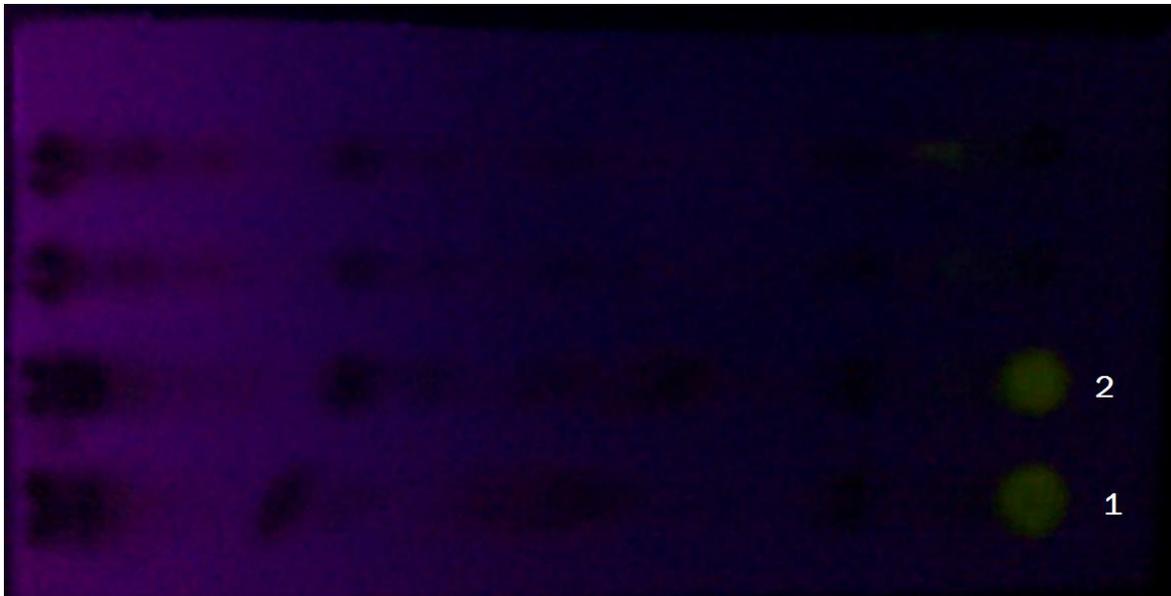


Fig. 19 Todos los flavonoides tienen la capacidad de causar fluorescencia amarilla, azul o verde dependiendo de la estructura que posean. (1 y 2 se refieren a extracto metanólico 1 y extracto metanólico 2 respectivamente)



Fig. 20 Las zonas que muestran una coloración roja o roja púrpura revelarán la presencia de taninos y/o flavanonas. (1 y 2 se refieren a extracto metanólico 1 y extracto metanólico 2 respectivamente)

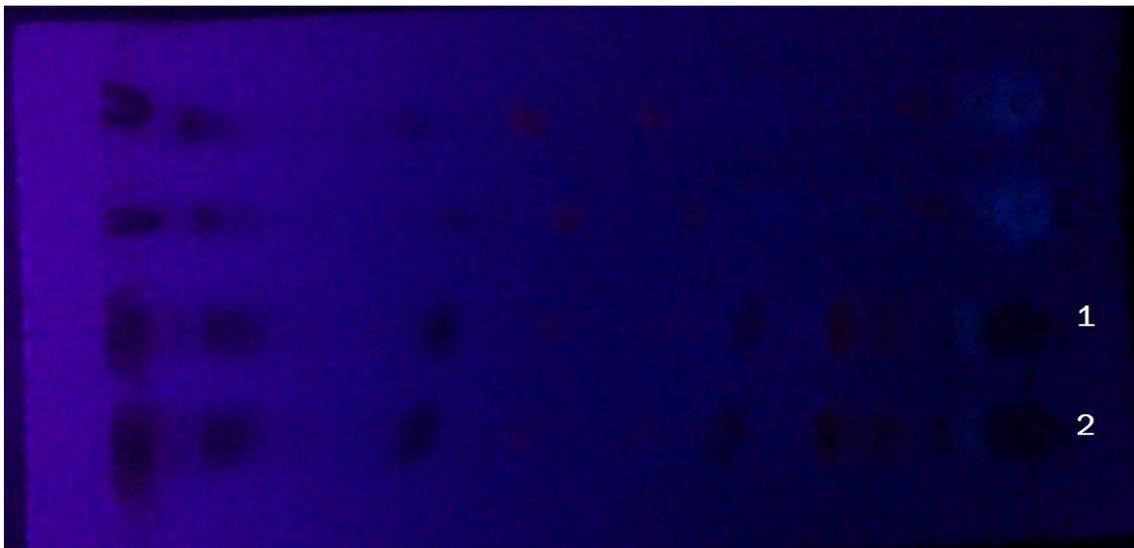


Fig. 21 La aparición de zonas con fluorescencia azul revelará la presencia de cumarinas. (1 y 2 se refieren a extracto metanólico 1 y extracto metanólico 2 respectivamente)

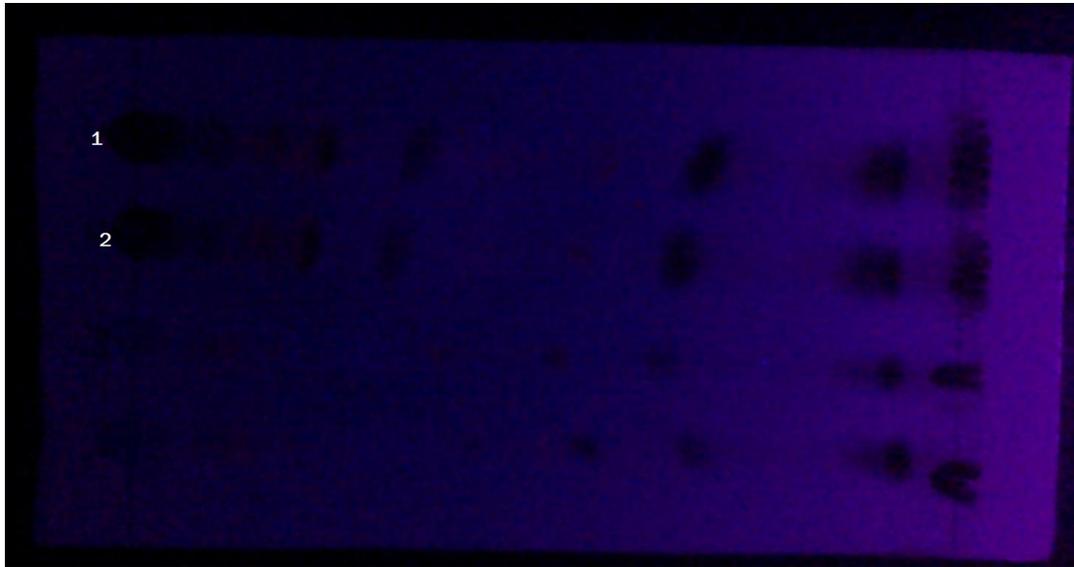


Fig.

22 La presencia de alcaloides es positiva si se observan manchas de color naranja en las placas. (1 y 2 se refieren a extracto metanólico 1 y extracto metanólico 2 respectivamente)



Fig. 23 Flavonoides observados para el extracto acuoso de hierba santa.

Cuadro 2. Cuantificación de los compuestos fitoquímicos de hojas de *Piper auritum* Kunth.

Componente	Extracto metanólico	Extracto acuoso
<b>Fenoles totales</b> (mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja seca)	12.99 <sup>a</sup>	5.28
<b>Flavonoides</b> (mg equivalentes de quercetina/g de hoja seca)	1.80	0.54
<b>Taninos condensados</b> (mg equivalentes de catequina/g de hoja seca)	7.45	4.73
<b>Cumarinas</b> (mg equivalentes de umbeliferona/g de hoja seca)	2.87	0.88
<b>Saponinas</b> (mg equivalentes de diosgenina/g de hoja seca)	25.70	4.41

<sup>a</sup> Los valores son el promedio de tres réplicas

En el cuadro 2 se muestra la composición fitoquímica de las hojas de *Piper auritum* Kunth, la concentración de fenoles totales fue de 12.99 y 5.28 mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja seca, para el extracto metanólico y acuoso respectivamente, lo cual coincidió con el resultado de Conde y Guerrero (2013), quienes reportaron concentraciones de fenoles totales en el rango de 6.79 a 20.58 mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja seca en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Piper auritum* Kunth. Mientras que Ovalle *et al.* (2012) reportaron concentraciones para un extracto etanólico de 23.47 mg equivalente de ácido gálico/g de hoja seca. Además, Díaz *et al.* (2012) reportaron concentraciones de fenoles totales en el extracto etanólico de hojas de *Piper imperiale* de 6.94 mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja seca, las cuales son más bajas que la encontrada en el extracto metanólico de este estudio y ligeramente más alta que las encontradas en el extracto acuoso.

En cuanto a las concentraciones de flavonoides, no se encuentran reportadas en la bibliografía para *Piper auritum* Kunth, Díaz *et al.* (2012) realizaron la cuantificación de quercetina por HPLC en el extracto etanólico de hojas de *Piper imperiale*, reportando una concentración de 0.02 mg de quercetina/g de hoja seca, la cual es mucho más baja que la concentración determinada en ambos extractos de hojas de *Piper auritum* Kunth. Por otro lado, Sundang *et al.* (2012) y Ugusman *et al.* (2012) reportaron valores de 31.08 y 91.02 mg equivalentes de quercetina/g de hoja seca en el extracto metanólico de hojas de *Piper betle* y extracto acuoso de hojas de *Piper sarmentosum* respectivamente, siendo estas concentraciones mayores que la encontrada en los extractos de *Piper auritum* Kunth.

De igual manera, para taninos condensados no se encuentran registradas concentraciones presentes en *Piper auritum* Kunth, Sundang *et al.* (2012) cuantificaron taninos condensados en el extracto metanólico de hojas de *Piper betle* encontrando una

concentración de 18.67 mg equivalentes de catequina/g de hoja seca, siendo una concentración más alta que los valores encontrados en los extractos de *Piper auritum* Kunth.

Para las concentraciones de cumarinas y saponinas presentes en los extractos de *Piper auritum* Kunth, la cantidad de saponinas encontradas parece muy alta, se necesita conseguir referencias para establecer una comparación, al igual para las cumarinas.

## 10 CONCLUSIONES.

- El extracto metanólico posee mayores cantidades de cada uno de los metabolitos secundarios cuantificados que el extracto acuoso.
- El componente encontrado en mayor cantidad fueron las saponinas en el extracto metanólico, con 26.47 mg equivalentes de diosgenina por gramo de hoja seca.
- El compuesto hallado en menor cantidad en el extracto metanólico son los flavonoides con 1.64 mg equivalentes de quercetina por gramo de hoja seca.
- Para el extracto acuoso el compuesto presente en mayor cantidad fueron los fenoles totales con 5.09 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de hoja seca.
- En extracto acuoso el compuesto hallado en menor cantidad son los flavonoides con 0.54 mg equivalentes de quercetina por gramo de hoja seca, coincidiendo con el extracto metanólico en compuesto con menor presencia en el extracto.

## 11 RECOMENDACIONES

Realizar una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para obtener cantidades más exactas de los compuestos presentes en ambos extractos.

Cuantificar alcaloides ya que según la bibliografía están presentes en las hojas de *Piper auritum* Kunth.

Realizar las pruebas con hojas recolectadas en diferentes lugares y en diferente estación del año para observar si hay diferencia significativa en la cantidad de metabolitos secundarios presentes en diferentes condiciones.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Albert L. A., 2007, "Panorama de los plaguicidas en México", 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica, pág. 359-378.
- Ayres, D.C. Loike, J.D. 1990. Lignans - chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press. 424 p.
- Blum E (2002). Molecular targets for prevention of hepatocellular carcinoma. *Digestive Diseases*, 20(1): 81-90.
- Conde L, Guerrero J. 2013. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla 72810, Mexico. Food Chemistry 142 (2014) 455–460.*
- Contreras, J. 2004. *Utilización de insectos en el control de plagas hortícolas. Feria de Calidad Ambiental y Ecoeficiencia 2004. Departamento de Producción Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena, España. 131-139 pp.*
- Cowan M (1999) *Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol.*
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Gruissem., and R. Jones R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367 p.*
- De León, C. 1984. *Enfermedades del maíz, guía para su identificación en campo. 3 ed. CIMMYT. México. 114 p.*
- Diaz L, Muñoz D, Prieto R, Cuervo S, Gonzalez D, Guzman J & Bhakta S. 2012. Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of *Piper imperial*. *Journal Molecules* 2012, 17, 4142-4157; doi:10.3390/molecules17044142.
- Diego, S. 2011. *Evaluación del rendimiento en la obtención del aceite "Piper auritum Kunth" mediante la hidrodestilación asistida por microondas (pp. 12-15). Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.*
- Dyer, L.A., Palmer A.D.N. 2004. *Piper. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 214 pp.*
- Flores, E. 2006. Metabolitos secundarios bioactivos del género *Piper* de la flora boliviana (pp.30-36). Tesis doctoral no publicada, Universidad la Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España.

- García, A., Leyva, M.A., Martínez, J.R., & Stashenko, E.E. 2007. Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (*Piperaceae*) difundida en la costa colombiana. *Scientia et Technica*, 13, 439-442.
- Hopkins, William G. 1999. Introduction to the plant physiology. (2nd. ed.). New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc. 512 p.
- Lam, A. 2011. Efecto antimicótico de aceites esenciales y extracto metanólicos de plantas de uso tradicional (pp. 1-26). Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Llanos, M. 1994. El maíz: su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa.
- Madiz M, Khan T & Mohammad F (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3: 232-249. Madrid, España. 127-142 pp.
- Mancebo, F; Hilje, L; Mora, GA; Salazar, R. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre larvas de *Hypsipyla grandella*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 55 (1):1-5
- Mesa A.M., Toro J.F., Cardona F., Blair S. 2012. Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de *Piper*. *BLACPMA*. 11: 154-162.
- Munkvold, G.P.; Desjardins, A.E. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence?. *Plant Disease* 81:556-563.
- Parmar V.S., Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E., Boll P.M. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. 46: 597-673.
- Rodríguez Hernández, C; Lagunes T, A; Domínguez R,R.1982. Búsqueda de plantas nativas del estado de México con propiedades tóxicas contra gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, y mosquito casero *Culex quinquefasciatus* Say. *Revista Chapingo (México)* 7 (37-38): 35-39.
- Savirrata N, Jukunen-Titto R, Oksanen E & Karjalainen R .2010. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium Pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental Pollution*, 158(2):440-446.
- Singh, D.; Singh, T. 1977. Location of *Fusarium moniliforme* in kernels of maize and disease transmission. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 7:32-38.
- Soberón, G.V., Rojas, C., Saavedra, J., Kato, M.J., & Delgado, E. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *Revista Peruana de Biología*, 13, 21-32.
- Sundang M, Nasir S, Sipaut C & Othman H. 2011. Antioxidant Activity, Phenolic, Flavonoid and Tannin Content of *Piper Betle* and *Leucosyke Capitella*. *Malaysian Journal of Fundamental & Applied Sciences* Vol.8, No.1 (2012) 1-6.
- Taiz L & Zeiger E 2006. Metabolitos secundarios y defensa en las plantas. En *Fisiología vegetal* (pp. 529-576). Castellón de la Plana: Universitat Jaume I.

- Thomas, M.D.; Buddenhagen, I.W. 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia* 72:882-887.
- Torres, J., & García, A. 2001. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*, 20, 377-387.
- Ugusman A, Zakaria Z, Hui C, Nordin N & Mahdy Z. 2012. Flavonoids of *Piper Sarmentosum* and its cytoprotective effects against oxidative stress. *Universiti Kebangsaan Malaysia. EXCLI Journal* 2012;11:705-714 – ISSN 1611-2156.
- Van Vleet TR, Klein PJ & Coulombe RA 2002. Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin bl in cytochrome p-450-expressing human lung cells. *Journal of Toxicology Environmental Health*, 62(12): 853-867.
- Virinder S, Subhash C, Kirpal S, Rajni J, Poonam T, Amitabh J, Om, D, Ashok K, Jesper W, Carl E & Per M 1997. *Phytochemistry* of genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46: 597-673.
- Wink M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M. Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic.
- Wuyts N, De waele D & Swennen R 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata grandr naine*) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:308-314.
- Zain M. 2010. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Fusarium*. *Research Journal of Agriculture* Ovalle A, Palacios E, Abdala K, Juárez L. 2012. Fraccionamiento bioguiado de cuatro especies nativas de *Piper* con actividad demostrada en modelos *in vitro*. Seminario de investigación. (p.48) Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 13 ANEXOS

### Anexo 1. Curvas patrón.

#### Fenoles Totales

Se partió de una solución patrón de Ácido gálico de una concentración de 1mg/ml. Para preparar la solución se pesaron 0.05 g o 50 mg de ácido gálico y se aforo a 50 ml con agua destilada, se realizaron diluciones de la siguiente forma para obtener las siguientes concentraciones.

<b>Concentraciones</b>			
<b>Mg/ml</b>	<b>(ppm)</b>	<b>Vol. De Solución patrón(μl)</b>	<b>Vol. De Agua (μl)</b>
<b>0.1</b>	100	200	1800
<b>0.2</b>	200	400	1600
<b>0.3</b>	300	600	1400
<b>0.4</b>	400	800	1200
<b>0.5</b>	500	1000	1000
<b>0.6</b>	600	1200	800
<b>0.7</b>	700	1400	600
<b>0.8</b>	800	1600	400
<b>0.9</b>	900	1800	200
<b>1</b>	1000	2000	0

#### Flavonoides

Se empleó una solución patrón de quercetina a una concentración de 0.1 mg/ml de la cual de tomaron alícuotas para obtener soluciones a diferentes concentraciones de acuerdo a la siguiente tabla.

<b>Mg/ml</b>	<b>Concentración (μg/ml)</b>	<b>Vol. De Solución patrón (μl)</b>	<b>Vol. Metanol 80%(μl)</b>
<b>0.01</b>	10	200	1800
<b>0.02</b>	20	400	1600
<b>0.03</b>	30	600	1400
<b>0.04</b>	40	800	1200
<b>0.05</b>	50	1000	1000
<b>0.06</b>	60	1200	800
<b>0.07</b>	70	1400	600
<b>0.08</b>	80	1600	400
<b>0.09</b>	90	1800	200
<b>0.1</b>	100	2000	0

### Saponinas

Se partió de una solución patrón de diosgenina de una concentración de 1mg/ml. A 0.1 g de diosgenina, aforar a 10 ml de cloroformo.

$$(200 \text{ ml})(1\text{mg}/1000 \text{ ml})= 0.2 \text{ mg}/ 2 \text{ ml} = 0.1 \text{ mg/ml}$$

<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>Vol. De solución (ml)</b>	<b>Vol. Cloroformo (ml)</b>
0.1	200	1800
0.2	400	1600
0.3	600	1400
0.4	800	1200
0.5	1000	1000
0.6	1200	800
0.7	1400	600
0.8	1600	400
0.9	1800	200
1	2000	0

M= 0.1 g de diosgenina aforar a 10 ml de cloroformo

### Taninos

Se partió de una solución patrón de catequina de una concentración de 0.02 mg/ml, de la cual se tomaron alícuotas para realizar soluciones de acuerdo a la siguiente tabla.

Solución estándar de 120 mg/l = 0.12 mg/ml en metanol

$$1000 \text{ ml} ( 0.12 \text{ mg}/1000 \text{ ml})= 0.12 \text{ mg}/ 6 \text{ ml} = 0.02 \text{ mg/ml}$$

<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>Vol. De solución (µl)</b>	<b>Volumen de Metanol (µl)</b>
0.01	500	5500
0.02	1000	5000
0.03	1500	4500
0.04	2000	4000
0.05	2500	3500
0.06	3000	3000
0.07	3500	2500
0.08	4000	2000
0.09	4500	1500
0.1	5000	1000
0.11	5500	500
0.12	6000	0

## Cumarinas.

Se partió de una solución patrón de una concentración de 0.01 mg/ml de umbeliferona, se tomaron alícuotas de acuerdo a la siguiente tabla para llegar a las concentraciones buscadas.

$$(500 \text{ ml}) (0.2 \text{ mg} / 1000 \text{ ml}) = 0.01 \text{ mg} / 1 \text{ ml} = 0.01 \text{ mg/ml}$$

Concentración (mg/ml)	Vol. Solución patrón (ml)	Etanol (ml)
0.01	50	950
0.02	100	900
0.03	150	850
0.04	200	800
0.05	250	750
0.06	300	700
0.07	350	650
0.08	400	600
0.09	450	550
0.1	500	500

### Anexo 2. Calculo de resultados a partir de las observancias obtenidas para cada grupo de compuestos determinados.

#### Extracto metanólico de hierba santa1.

Absorbancias: 0.176, 0.170, 0.126

Dilución: 1:50

Formula

$$\frac{(RE)(FD)}{1000} \left( \frac{\text{vol. extracto}}{\text{Muestra seca}} \right)$$

Donde: RE= resultado de la ecuación de la curva patrón.

FD= factor de dilución

#### Fenoles totales

$$X_1 = 1428.5714 (0.176) + 52.1428 = 303.5714 \text{ ppm}$$

$$X_2 = 1428.5714 (0.170) + 52.1428 = 294.999 \text{ ppm}$$

$$X_3 = 1428.5714 (0.126) + 52.1428 = 232.1428 \text{ ppm}$$

$$303.5714 \frac{mg}{l} \left( \frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.3035 mg/ml$$

$$294.999 \frac{mg}{l} \left( \frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.2949 mg/ml$$

$$232.1428 \frac{mg}{l} \left( \frac{1 l}{1000ml} \right) = 0.2321 mg/ml$$

$$0.3035 \frac{mg}{ml} \times 50 = 15.18 \frac{mg}{ml}$$

$$0.2949 \frac{mg}{ml} \times 50 = 14.75 \frac{mg}{ml}$$

$$0.2321 \frac{mg}{ml} \times 50 = 11.60 \frac{mg}{ml}$$

$$15.18 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 11.385 \frac{mg}{g}$$

$$14.75 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 11.062 \frac{mg}{g}$$

$$11.60 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 8.703 \frac{mg}{g}$$

Promedio:  $10.3837 \frac{mg}{g}$  eq. de ácido gálico/g de hoja seca.

### Flavonoides

Absorbancias: 0.356, 0.396, 0.405 dilucion: 1:100

$$X_1 = 0.0638 (0.356) + 0.001557 = 0.0243 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.0638 (0.396) + 0.001557 = 0.0268 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.0638 (0.405) + 0.001557 = 0.0274 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0243 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.43 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0268 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.68 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0274 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.74 \frac{mg}{ml}$$

$$2.43 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{120g} \right) = 1.8225 \frac{mg}{g}$$

$$2.68 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{120g} \right) = 2.01 \frac{mg}{g}$$

$$2.74 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{120g} \right) = 2.055 \frac{mg}{g}$$

Promedio:  $1.9625 \frac{mg}{g}$  eq. de quercetina/g de hoja seca.

### Saponinas

Absorbancias: 0.295, 0.298, 0.257. Dilución: 1:50

$$X_1 = 2.354 (0.295) - 0.002589 = 0.6918 \text{ mg/ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.298) - 0.002589 = 0.6989 \text{ mg/ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.257) - 0.002589 = 0.6024 \text{ mg/ml}$$

$$0.6918 \frac{mg}{ml} \times 50 = 34.59 \frac{mg}{ml}$$

$$0.6989 \frac{mg}{ml} \times 50 = 34.945 \frac{mg}{ml}$$

$$0.6024 \frac{mg}{ml} \times 50 = 30.12 \frac{mg}{ml}$$

$$34.59 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 25.9425 \frac{mg}{g}$$

$$34.945 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 26.2088 \frac{mg}{g}$$

$$30.12 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 22.59 \frac{mg}{g}$$

Promedio:  $24.9138 \frac{mg}{g}$  eq. de diosgenina/g. de hoja seca.

### Proantocianidinas (Taninos condensados)

Absorbancia: 0.450, 0.451, 0.403 dilución: 1:50

$$X_1 = 0.3389 (0.450) + 0.004135 = 0.1566 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.3389 (0.451) + 0.004135 = 0.157 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.3389 (0.403) + 0.004135 = 0.1407 \frac{mg}{ml}$$

$$0.1566 \frac{mg}{ml} \times 50 = 7.83 \frac{mg}{ml}$$

$$0.157 \frac{mg}{ml} \times 50 = 7.85 \frac{mg}{ml}$$

$$0.1407 \frac{mg}{ml} \times 50 = 7.035 \frac{mg}{ml}$$

$$7.83 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 5.8725 \frac{mg}{g}$$

$$7.85 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 5.8875 \frac{mg}{g}$$

$$7.035 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 5.2763 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 5.6788 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Taninos condensados} = \text{Fenoles totales} - \text{proantocianidinas} = 10.3837 \frac{mg}{g} - 5.6788 \frac{mg}{g} = 4.7049 \text{ mg}$$

eq. de catequina/g de hoja seca.

### Cumarinas

Absorbancia: 0.536, 0.463, 0.424      dilución: 1:200

$$X_1 = 0.0468 (0.536) - 0.001606 = 0.0235 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.463) - 0.001606 = 0.0201 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.424) - 0.001606 = 0.0182 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0235 \frac{mg}{ml} \times 200 = 4.7 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0201 \frac{mg}{ml} \times 200 = 4.02 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0182 \frac{mg}{ml} \times 200 = 3.64 \frac{mg}{ml}$$

$$4.7 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 3.525 \frac{mg}{g}$$

$$4.02 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 3.015 \frac{mg}{g}$$

$$3.64 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 2.73 \frac{mg}{g}$$

Promedio: 3.09 mg eq. de umbeliferona/ g de hoja seca.

### Extracto metanólico de hierba santa 2.

Absorbancias: 0.2, 0.177, 0.169.

Dilución: 1:50

### Fenoles totales

$$X_1 = 1428.5714 (0.2) + 52.1428 = 337.8571 \text{ ppm}$$

$$X_2 = 1428.5714 (0.177) + 52.1428 = 304.9999 \text{ ppm}$$

$$X_3 = 1428.5714 (0.169) + 52.1428 = 293.5714 \text{ ppm}$$

$$337.8571 \frac{mg}{l} \left( \frac{1l}{1000ml} \right) = 0.3378 \text{ mg/ml}$$

$$304.9999 \frac{mg}{l} \left( \frac{1l}{1000ml} \right) = 0.3049 \text{ mg/ml}$$

$$293.5714 \frac{mg}{l} \left( \frac{1l}{1000ml} \right) = 0.2936 \text{ mg/ml}$$

$$0.3378 \frac{mg}{ml} \times 50 = 16.89 \frac{mg}{ml}$$

$$0.3049 \frac{mg}{ml} \times 50 = 15.245 \frac{mg}{ml}$$

$$0.2936 \frac{mg}{ml} \times 50 = 14.68 \frac{mg}{ml}$$

$$16.89 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 12.6675 \frac{mg}{g}$$

$$15.245 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 11.4337 \frac{mg}{g}$$

$$14.68 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 11.01 \frac{mg}{g}$$

Promedio:  $11.7037 \frac{mg}{g}$  eq. de ácido gálico/g de hoja seca.

### Flavonoides

Absorbancias: 0.295, 0.329, 0.328 dilución: 1:100

$$X_1 = 0.0638 (0.295) + 0.001557 = 0.0204 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.0638 (0.329) + 0.001557 = 0.0225 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.0638 (0.328) + 0.001557 = 0.0225 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0204 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.04 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0225 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.25 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0225 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.25 \frac{mg}{ml}$$

$$2.04 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 1.53 \frac{mg}{g}$$

$$2.25 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 1.6875 \frac{mg}{g}$$

$$2.25 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 1.6875 \frac{mg}{g}$$

Promedio:  $1.635 \frac{mg}{g}$  eq. de quercetina/g de hoja seca.

## Saponinas

Absorbancias: 0.282, 0.308, 0.313. Dilución: 1:50

$$X_1 = 2.354 (0.282) - 0.002589 = 0.6612 \text{ mg/ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.308) - 0.002589 = 0.7224 \text{ mg/ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.313) - 0.002589 = 0.7342 \text{ mg/ml}$$

$$0.6612 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 50 = 33.06 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$0.7224 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 50 = 36.12 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$0.7342 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 50 = 36.71 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$33.06 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \left( \frac{15\text{ml}}{20\text{g}} \right) = 27.5325 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

$$36.12 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \left( \frac{15\text{ml}}{20\text{g}} \right) = 27.09 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

$$36.71 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \left( \frac{15\text{ml}}{20\text{g}} \right) = 27.5325 \frac{\text{mg}}{\text{g}}$$

Promedio: 26.4725 mg eq. de diosgenina/g. de hoja seca.

## Proantocianidinas (Taninos condensados)

Absorbancia: 0.402, 0.384, 0.405 dilución: 1:50

$$X_1 = 0.3389 (0.402) + 0.004135 = 0.1404 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$X_2 = 0.3389 (0.384) + 0.004135 = 0.1343 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$X_3 = 0.3389 (0.405) + 0.004135 = 0.1414 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$0.1404 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 50 = 7.02 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$0.1343 \frac{mg}{ml} \times 50 = 6.715 \frac{mg}{ml}$$

$$0.1414 \frac{mg}{ml} \times 50 = 7.07 \frac{mg}{ml}$$

$$7.02 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 5.265 \frac{mg}{g}$$

$$6.715 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 5.0363 \frac{mg}{g}$$

$$7.07 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 5.3025 \frac{mg}{g}$$

$$\text{Promedio: } 5.2013 \frac{mg}{g}$$

Taninos condensados = Fenoles totales – proantocianidinas =  $11.7037 \frac{mg}{g} - 5.2013 \frac{mg}{g} = 6.5024 \text{ mg eq. de catequina/g de hoja seca.}$

### Cumarinas

Absorbancia: 0.436, 0.376, 0.429 dilución: 1:200

$$X_1 = 0.0468 (0.436) - 0.001606 = 0.0188 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.376) - 0.001606 = 0.0160 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.429) - 0.001606 = 0.0185 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0188 \frac{mg}{ml} \times 200 = 3.76 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0160 \frac{mg}{ml} \times 200 = 3.2 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0185 \frac{mg}{ml} \times 200 = 3.7 \frac{mg}{ml}$$

$$3.76 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 2.82 \frac{mg}{g}$$

$$3.2 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 2.4 \frac{mg}{g}$$

$$3.7 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{20g} \right) = 2.775 \frac{mg}{g}$$

Promedio: 2.665 mg eq. de umbeliferona/ g de hoja seca.

#### Extracto acuoso de hierba santa.

Absorbancias: 0.203, 0.204, 0.223

Dilución: 1:50

#### Fenoles totales

$$X_1 = 1428.5714 (0.203) + 52.1428 = 342.1428 \text{ ppm}$$

$$X_2 = 1428.5714 (0.204) + 52.1428 = 343.5714 \text{ ppm}$$

$$X_3 = 1428.5714 (0.223) + 52.1428 = 370.7142 \text{ ppm}$$

$$342.1428 \frac{mg}{l} \left( \frac{1l}{1000ml} \right) = 0.3421 \text{ mg/ml}$$

$$343.5714 \frac{mg}{l} \left( \frac{1l}{1000ml} \right) = 0.3436 \text{ mg/ml}$$

$$370.7142 \frac{mg}{l} \left( \frac{1l}{1000ml} \right) = 0.3707 \text{ mg/ml}$$

$$0.3421 \frac{mg}{ml} \times 50 = 17.105 \frac{mg}{ml}$$

$$0.3436 \frac{mg}{ml} \times 50 = 17.18 \frac{mg}{ml}$$

$$0.3707 \frac{mg}{ml} \times 50 = 18.535 \frac{mg}{ml}$$

$$17.105 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 5.1315 \frac{mg}{g}$$

$$17.18 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 5.154 \frac{mg}{g}$$

$$18.535 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 5.5605 \frac{mg}{g}$$

Promedio: 5.282 mg eq. de ácido gálico/g de hoja seca.

## Flavonoides

Absorbancias: 0.271, 0.248, 0.251 dilución: 1:100

$$X_1 = 0.0638 (0.271) + 0.001557 = 0.0188 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.0638 (0.248) + 0.001557 = 0.0174 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.0638 (0.251) + 0.001557 = 0.0176 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0188 \frac{mg}{ml} \times 100 = 1.88 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0174 \frac{mg}{ml} \times 100 = 1.74 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0176 \frac{mg}{ml} \times 100 = 1.76 \frac{mg}{ml}$$

$$1.88 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.564 \frac{mg}{g}$$

$$1.74 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.522 \frac{mg}{g}$$

$$1.76 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.528 \frac{mg}{g}$$

Promedio:  $0.538 \frac{mg}{g}$  eq. de quercetina/g de hoja seca.

## Saponinas

Absorbancias: 0.120, 0.148, 0.110. Dilución: 1:50

$$X_1 = 2.354 (0.120) - 0.002589 = 0.2799 \text{ mg/ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.148) - 0.002589 = 0.3458 \text{ mg/ml}$$

$$X_1 = 2.354 (0.110) - 0.002589 = 0.2563 \text{ mg/ml}$$

$$0.2799 \frac{mg}{ml} \times 50 = 13.995 \frac{mg}{ml}$$

$$0.3458 \frac{mg}{ml} \times 50 = 17.29 \frac{mg}{ml}$$

$$0.2563 \frac{mg}{ml} \times 50 = 12.815 \frac{mg}{ml}$$

$$13.995 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 4.1985 \frac{mg}{g}$$

$$17.29 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 5.187 \frac{mg}{g}$$

$$12.815 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 3.8445 \frac{mg}{g}$$

Promedio: 4.41 mg eq. de diosgenina/g. de hoja seca.

### Proantocianidinas (Taninos condensados)

Absorbancia: 0.097, 0.093, 0.097 dilución: 1:50

$$X_1 = 0.3389 (0.097) + 0.004135 = 0.037 \frac{mg}{ml}$$

$$X_2 = 0.3389 (0.093) + 0.004135 = 0.0557 \frac{mg}{ml}$$

$$X_3 = 0.3389 (0.097) + 0.004135 = 0.037 \frac{mg}{ml}$$

$$0.037 \frac{mg}{ml} \times 50 = 1.85 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0557 \frac{mg}{ml} \times 50 = 1.785 \frac{mg}{ml}$$

$$0.037 \frac{mg}{ml} \times 50 = 1.85 \frac{mg}{ml}$$

$$1.85 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.555 \frac{mg}{g}$$

$$1.785 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.5355 \frac{mg}{g}$$

$$1.85 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.555 \frac{mg}{g}$$

Promedio: 0.5485  $\frac{mg}{g}$

Taninos condensados = Fenoles totales – proantocianidinas =  $5.282 \frac{mg}{g} - 0.5485 \frac{mg}{g} = 4.7335 \text{ mg}$   
eq. de catequina/g de hoja seca.

## Cumarinas

Absorbancia: 0.654, 0.664, 0.668      dilución: 1:100

$$X_1 = 0.0468 (0.654) - 0.001606 = 0.029 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.664) - 0.001606 = 0.0295 \frac{mg}{ml}$$

$$X_1 = 0.0468 (0.668) - 0.001606 = 0.0297 \frac{mg}{ml}$$

$$0.029 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.9 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0295 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.95 \frac{mg}{ml}$$

$$0.0297 \frac{mg}{ml} \times 100 = 2.97 \frac{mg}{ml}$$

$$2.9 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.87 \frac{mg}{g}$$

$$2.95 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.885 \frac{mg}{g}$$

$$2.97 \frac{mg}{ml} \left( \frac{15ml}{50g} \right) = 0.891 \frac{mg}{g}$$

Promedio: 0.882 mg eq. de umbeliferona/ g de hoja seca.