

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Estudio del Aceite Esencial y Metabolitos Secundarios de
Diferentes Poblaciones de *Lippia chiapasensis* Loes.
(Verbenaceae). Fase II

Christian Daniel Farfán Barrera

QUÍMICO

Guatemala, noviembre de 2008

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Estudio del Aceite Esencial y Metabolitos Secundarios de
Diferentes Poblaciones de *Lippia chiapasensis* Loes.

(Verbenaceae). Fase II

Informe Proyecto de Investigación

Presentado por

Christian Daniel Farfán Barrera

Para optar al título de

QUÍMICO

Guatemala, noviembre de 2008

Miembros de Junta Directiva
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Ph.D. Óscar Cobar Pinto	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
M.A. Lillian Raquel Irving Antillón	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Anibal Rodrigo Sevillanos Camboreno	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por brindarme su apoyo, seguridad y tranquilidad.

A mis hermanos Jason, Juan Carlos, María Eugenia, Willfredo, Astrid, Rainer, Francisco, Lorena y Elena por motivarme y servirme de ejemplo.

A mi abuelo Juan, abuelita Clara, tíos, primos y sobrinos por mantener a mi familia unida.

A mis amigos de toda la vida, Jorge Luis, Carlos, Juan Fernando, José, Gabriela y Ana Judith por siempre estar presentes en los momentos más importantes.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT- y a mis compañeros de investigación, Max, Odra, Edwin, Guillermo, Aura, Ana, Emilio, Roxana, Ana Carolina, Ana Lucía, Claudia, Vinicio, Bárbara, Elvira, Darwin, Cristie y Dina por hacer la investigación no sólo útil sino también entretenida.

A mis compañeros del Colegio San Agustín, Colegio Viena, Colegio Americano y Red Cross Nordic U.W.C. y a mis compañeros de la carrera de Química y de otras carreras, en especial a Tamara, Lety, Elisandra, Jorge Arturo, Oliver, Javier, Isabel, Aníval, Willy, Josué, Herbert, Regina, Paty, Diana, Luisana y Dora por animarme a siempre ser mejor estudiante y persona.

A los estudiantes de la carrera de Química y a los alumnos de Química Orgánica por toda su amabilidad y alegría.

A mis compañeros de organizaciones y asociaciones estudiantiles, en especial a César, Rita, Andrea, Jacobo, Victoria, Francisco, María Esmeralda, José Juan y Claudia por ayudarme a trabajar en grupo en beneficio de la facultad.

A los auxiliares y catedráticos de los departamentos de Química Orgánica, Fisicoquímica, Análisis Inorgánico, Química General y a la Unidad de Análisis Instrumental de la Escuela de Química y de los departamentos de Microbiología y Citohistología de la Escuela de Química Biológica por compartir sus experiencias conmigo.

A todos los licenciados de la Escuela de Química y de otras escuelas, en especial a Diana Pinagel, Nora Guzmán, Bessie Oliva, Francisco Pérez, Hugo Sandoval, Pablo Oliva, Sully Cruz, Aylin Santizo, Armando Cáceres, Liuba Cabrera y Julieta de Pezzarossi por todas sus instrucciones y consejos.

A todo el personal administrativo y técnico de la facultad, en especial a Yolanda, Francisco, Giovanni, Miriam, Vilma, Thelmita, Maribel, Carlos, Ovideo, Sergio y Zoily por ayudarme siempre en todos los problemas que afronté.

A mis compañeras de maestría, Nathalia, Ligia, Keila, Jenny e Isabel por inspirarme a seguir mejorando como estudiante y como persona.

A mi asesor y revisor, Lic. Pedro Jayes por darme tantas oportunidades para superarme.

Al director de Escuela de Química, Lic. Jhoni Álvarez y al señor decano, Ph.D. Óscar Cobar por siempre tratar de manera atenta a los estudiantes de la carrera y de la facultad.

ÍNDICE

<u>1</u>	<u>ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>ANTECEDENTES</u>	<u>2</u>
2.1	Género <i>Lippia</i> (Verbenaceae)	2
2.2	<i>Lippia chiapasensis</i> Loes	3
2.3	Aceites Esenciales	4
2.4	Extracción de Aceites Esenciales	5
2.5	Polimorfismo Químico	7
2.6	Metabolitos Secundarios	7
2.7	Alcaloides	8
2.8	Antraquinonas	8
2.9	Cumarinas	9
2.10	Flavonoides	9
2.11	Saponinas	10
2.12	Taninos	11
2.13	Índice de Refracción	11
<u>3</u>	<u>JUSTIFICACIÓN</u>	<u>12</u>
<u>4</u>	<u>OBJETIVOS</u>	<u>13</u>
4.1	Objetivo General	13

4.2 Objetivos Específicos	13
5 HIPÓTESIS	14
6 MATERIALES	15
6.1 Equipo	15
6.2 Cristalería	15
6.3 Otros Materiales	16
6.4 Disolventes	17
6.5 Reactivos	17
7 MÉTODOS	18
7.1 Planta a estudiar	18
7.2 Muestreo	18
7.3 Preparación de la muestra	18
7.4 Extracción de aceites esenciales utilizando neoClevenger	18
7.6 Tamizaje Fitoquímico	19
7.7 Índice de refracción de aceites esenciales	19
7.8 Preparación de aceites para actividad biocida	21
8 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	20
9 RESULTADOS	21
9.1 Hidrodestilación de aceites esenciales	21

9.2 Tamizaje fitoquímico	27
9.3 Actividad biocida e índice de refracción	30
10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
10.1 Hidrodestilación de aceites esenciales	34
10.2 Tamizaje fitoquímico	38
10.3 Actividad biocida e índice de refracción	40
11 CONCLUSIONES	42
12 RECOMENDACIONES	44
13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	47
AVAL	76

1 ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN

Investigación bibliográfica sobre *Lippia chiapasensis* Loes.

Colecta de material vegetal de *L. chiapasensis* en los departamentos de Quetzaltenango, Totonicapán y Sololá.

Extracción de aceites esenciales de diferentes quimiotipos de *L. chiapasensis* por hidrodestilación.

Análisis fitoquímicos de los diferentes quimiotipos de *L. chiapasensis* recolectada.

Clasificación de aceites esenciales de diferentes quimiotipos de *L. chiapasensis* de acuerdo al índice de refracción.

2 ANTECEDENTES

2.1 Género *Lippia* (Verbenaceae)

El género *Lippia* se encuentra ampliamente distribuido en las regiones de Centro América, Sur América y África Tropical. Cuenta con más de 200 especies entre las que se incluyen hierbas, arbustos y árboles pequeños. La mayoría de estas especies se han utilizado en la medicina tradicional de las regiones ya mencionadas como remedios gastrointestinales y respiratorios, aunque también se han encontrado usos a las mismas como antimaláricos, antivirales y citostáticos. De igual manera, se utilizan frecuentemente como condimentos en los alimentos. (Pascual *et al.*, 2001)

En la mayoría de los casos, se hace uso de las partes aéreas de las plantas (hojas, flores y tallos). Se preparan infusiones o decocciones de las mismas y son administradas oralmente. A pesar de la homogeneidad de sus composiciones, a veces sucede que diferentes autores reportan actividades contradictorias, probablemente debido a una mala identificación botánica. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en los aceites esenciales de las especies de este género. Aunque se considera que los flavonoides también presentan principios activos. (Pascual *et al.*, 2001)

Tanto en Guatemala como en Brasil y Venezuela se utilizan diferentes especies de *Lippia* para tratamientos de resfriado, gripe, tos y asma. Algunas de las especies utilizadas para este fin son: *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *L. chevalieri* Moldenke, *L. graveolens* H.B.K., *L. micromera* Schauer., *L. microphylla* Cham., *L. multiflora* Moldenke, *L. nodiflora* (L.) Michx. y *L. origanoides* H.B.K. Se utiliza frecuentemente como remedio pectoral a *L. alba* en la región Mesoamericana. (Pascual *et al.*, 2001)

En el caso de *Lippia javanica* N.L. Burm., se utiliza en infusiones de agua o leche para catarros y sus hojas y raíces se utilizan para falta de aliento y dolores de pecho en África. De igual manera, *L. alba*, *L. graveolens*, *L. micromera* y *L. origanoides* se utilizan como condimentos de alimentos. (Pascual *et al.*, 2001)

2.2 *Lippia chiapasensis* Loes.

Comúnmente conocido en Guatemala como Salviasanta o Salviyá, *L. chiapasensis* es una planta ampliamente distribuida en el altiplano Guatemalteco. Normalmente se localiza en bosques húmedos o secos, frecuentemente rocosos o en prados a una altitud entre los 1,500 y los 3,000 msnm, aunque es más abundante en las regiones altas (ver Imagen I, Anexo I). Se han observado diferentes individuos en los departamentos de Totonicapán, Sololá, Quetzaltenango, Huehuetenango, San Marcos y Baja Verapaz. De igual manera, se han reportado individuos en México. Es un arbusto o árbol débil que alcanza una altura de 4 m, con hojas entre 2 y 6 cm de longitud y 1.5 y 4.5 cm de ancho y agudas (Standley *et al.*, 1970).

Al igual que a un gran número de especies pertenecientes al género *Lippia*, se utiliza de manera tradicional en el altiplano guatemalteco como un remedio casero para malestares estomacales y respiratorios (Jayes *et al.*, 2007). Sin embargo, y probablemente debido a su poca distribución a nivel mundial, no se encuentra información en la literatura acerca de estos usos fuera de Guatemala. De igual manera, existe poca información relacionada con los metabolitos secundarios que contiene y su composición de aceite esencial.

Aragão realizó un estudio muy extenso en Brasil donde llegó a la conclusión que un porcentaje de rendimiento superior a 0.5% significa que la planta en cuestión tiene mayores posibilidades de ser introducida al mercado de presentar una composición química de utilidad. (Aragão, 1981). En uno de los primeros estudios realizados al aceite esencial de *L. chiapasensis* colectado en Totonicapán en la etapa de floración indicó un porcentaje de rendimiento de 0.9%, el cual es superior al sugerido por Aragón. En ese mismo estudio se determinó una alta concentración de monoterpenos (78.9%) y una concentración menor de sesquiterpenos (12.6%). Los monoterpenos más abundantes fueron los oxigenados con el 62.3%, destacándose la presencia de trans-dihidrocarvanona, geranial, neral, y 1-8-cineol (Hernández-Aresteros *et al.*, 2006).

En estudios más recientes se ha obtenido información del porcentaje de rendimiento y composición química de hojas de diferentes individuos, colectadas principalmente en

Totonicapán, Sololá y Quetzaltenango. Los porcentajes de rendimiento obtenido han sido altos, hasta del 1.2 %. De igual manera, al someter a otras especies nativas de Guatemala del género *Lippia* a extracciones en las mismas condiciones, se han obtenido porcentajes más altos que por ejemplo: *Lippia controversa* Moldenke, *L. substrigosa* Turcz., *L. cardiostegia* Benth. y *L. myriocephalla* Schltdl. & Cham. (Jayes *et al.*, 2007).

Un estudio enfocado en *L. chiapasensis* indicó porcentajes de rendimiento mayores a los reportados por Hernández-Aresteros. En dicho estudio se colectaron hojas de individuos de 14 poblaciones diferentes en los departamentos de Totonicapán, Sololá y Quetzaltenango. El 90% de los aceites esenciales extraídos dieron un porcentaje de rendimiento superior al 0.50%. Un espécimen colectado en Chacayá, Totonicapán presentó un rendimiento del 3.21% (Jayes *et al.*, 2008).

De igual manera, se llevaron a cabo varios análisis de estos aceites utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados de dichas cromatografías indican la existencia de más de un quimiotipo dentro de la misma especie. En especímenes provenientes de diferentes individuos se obtuvieron diferentes componentes mayoritarios. En algunos casos, el componente mayoritario de un espécimen de cierto individuo se encontraba en pequeñas cantidades en un espécimen tomado de otro individuo o incluso ausente. Entre los componentes mayoritarios encontrados en diferentes especímenes se encontraron: alcanfor, elemol, 1-8 cineol, citral (geranial y neral), acetato de bornilo (borneol) y citronelal (Jayes *et al.*, 2008).

2.3 Aceites Esenciales

El aceite esencial es una muestra compleja principalmente de terpenos de bajo peso molecular. Los monoterpenos y sesquiterpenos (10 y 15 átomos de carbono respectivamente) son los compuestos más comunes en dicha muestra; y se caracterizan por ser insolubles en agua, ligeramente solubles en alcoholes y muy solubles en compuestos apolares tales como el n-pentano, n-hexano, benceno, éter de petróleo, entre otros. Sin embargo son susceptibles a oxidaciones provocadas por el oxígeno atmosférico o por luz *uv-vis*. (Bruneton, 1993)

Los terpenos y por ende pertenecen al grupo de compuestos denominados como “metabolitos secundarios”, los cuales se caracterizan por no ser producidos en el metabolismo primario, no ser vitales al ser vivo que los produce y de tener una utilidad a veces desconocida. De igual manera los terpenos o terpenoides presentan en sus estructuras múltiplos de 2-metil-1,3-butadieno ya que son el resultado del metabolismo del ácido mevalónico. Sin embargo, también existen otros compuestos que no son derivados del metabolismo del ácido mevalónico y que también se encuentran dentro de los aceites esenciales que se extraen. Estos compuestos comparten propiedades físicas con los terpenos tales como volatilidad y bajo punto de ebullición. (Bruneton, 1993)

En el reino vegetal, los aceites esenciales se encuentran frecuentemente en las hojas, flores y semillas. Las familias que se caracterizan por presentar aceites esenciales entre sus especies son: Apiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Rutaceae y Verbenaceae. En el caso particular de *L. chiapasensis*, esta especie pertenece a la familia Verbenaceae (género *Lippia*). Las industrias químicas y farmacéuticas han investigado extensivamente estas familias debido a su utilidad como antibacterianos, estimulantes, estomáquicos, analgésicos, aromatizantes y sedantes. (Trease-Evans, 1991)

Los aceites esenciales son de amplio uso en la industria debido principalmente a los aromas agradables que poseen. Se utilizan tanto en la producción de perfumes, cosméticos y jabones como de condimentos y dulces. Otras industrias que también utilizan los aceites esenciales son las de aromatizantes, plásticos, cauchos e insecticidas. Debido a su complejidad estructural también se utilizan como sustratos para la síntesis de compuestos de interés y los que son biológicamente activos se utilizan en la industria farmacéutica como analgésicos, antibacterianos, expectorantes, estimulantes, estomáquicos y anti cancerígenos. (Jayes *et al*, 2008)

2.4 Extracción de Aceites Esenciales

Existen varias técnicas para llevar a cabo la extracción de aceites esenciales. Estas incluyen la maceración, arrastre con vapor de agua e hidrodestilación. En el caso de la maceración se presenta el inconveniente que el aceite esencial es extraído a la par de los otros metabolitos

secundarios presentes en el material vegetal tales como flavonoides, alcaloides, cumarinas, otros metabolitos secundarios y primarios. Debido a ello, la técnica de hidrodestilación es la más utilizada para la obtención de aceites esenciales. (Jayes *et al*, 2008)

Actualmente se utiliza la técnica de extracción de aceites esenciales con el aparato Clevenger o neoClevenger para la realización de extracciones con fines analíticos. Aunque presenta el inconveniente de promover reacciones de oxidación debido a la temperatura de operación y a la cantidad de agua que utiliza. Por otra parte, existe una técnica emergente que requiere de un hidrodestilador tipo Likens-Nickerson la cual expone el aceite esencial a un menor riesgo de oxidación del mismo. (Jayes *et al*, 2008)

Otro de los factores que hay que tomar en cuenta en la extracción de aceites esenciales y que resulta fundamental es la selección adecuada de disolvente orgánico a utilizar. En la actualidad el n-pentano se utiliza tanto en hidrodestilaciones con Clevenger y neoClevenger como con Likens-Nickerson. Esto se debe a la alta solubilidad de los monoterpenos y sesquiterpenos en él como a su alta volatilidad y bajo punto de ebullición, lo cual permite que una vez extraído el aceite, sea posible eliminar el n-pentano sin hacer un alto gasto de energía y así minimizar la pérdida de aceite esencial por evaporación. Otras propiedades que hacen que el n-pentano sea el disolvente ideal para la extracción de aceites esenciales incluyen su insolubilidad en agua, baja densidad y alta presión de vapor. (Windholz, 1983)

Uno de los estudios más importantes relacionados a la extracción de aceites esenciales lo llevo a cabo Aragão en 1981 donde estableció parámetros importantes para la extracción económicamente ventajosa de aceites esenciales. Entre estos parámetros se incluye la abundancia de una especie de interés en una región. Otro parámetro es el rendimiento de aceite esencial por hidrodestilación; el cual debe ser mayor de 0.5%. De igual manera, el componente principal debe de representar por lo menos el 30% del aceite obtenido y tener importancia económica. Mientras que un componente secundario debe de tener también algún valor económico. (Jayes *et al*., 2008)

Al haberse determinado que una planta cumple con los parámetros mencionados anteriormente es posible hacer su introducción al mercado con una mejor oportunidad de

éxito. De acuerdo a la industria blanco del aceite, se encuentran diferentes restricciones. Por un lado en las industrias relacionadas con la química, la aceptación de un nuevo aceite presenta menos restricciones debido a que se utilizaría como disolvente o sustrato. Mientras que en la industria cosmética y de aromas se encuentran patrones y estándares elevados que se enfocan en la homogeneidad del aceite. (Jayes *et al.*, 2008)

2.5 Polimorfismo Químico

Debido a que diferentes individuos de la misma planta crecen en diferentes lugares y por lo tanto en diferentes condiciones, existe lo que se conoce como polimorfismo químico. Esto sugiere que una misma especie es capaz de producir resultados diferentes en un análisis de sus aceites esenciales simplemente debido al lugar de origen de la muestra. Al agruparse estos especímenes o individuos que les dan origen se forma lo que se conoce como quimiotipos. (Pereira *et al.*, 2003)

2.6 Metabolitos Secundarios

Los compuestos que forman el grupo conocido como “metabolitos secundarios” no pertenecen al grupo de metabolitos considerados vitales para el desarrollo y supervivencia de la planta. Sin embargo intervienen en las interacciones entre plantas de la misma especie, entre plantas de especies diferentes y entre las plantas y el ambiente que las rodea. Los metabolitos primarios han sido investigados extensivamente por los bioquímicos mientras que los metabolitos secundarios han sido investigados por los químicos de productos naturales. Es muy difícil establecer un límite claro entre los metabolitos primarios y secundarios en base a su estructura por lo que comúnmente se hace en base a su función y su origen sintético. Entre las principales rutas de síntesis de los metabolitos secundarios se incluyen la del ácido shikímico, acetato malonil coenzima A y ácido mevalónico. (Bruneton, 1993; Trease-Evans, 1991)

Las técnicas que se utilizan actualmente en la química orgánica para extracción, separación, elucidación y síntesis tienen su origen en los estudios desarrollados a partir del siglo XIX en relación con los metabolitos secundarios utilizados, tales como aceites, ceras, drogas,

saborizantes, venenos, disolventes y sustratos. De igual manera se ha logrado comprobar a través de los estudios insecticidas, bactericidas y fungicidas su utilidad como defensa contra depredadores y patógenos. También son útiles tanto como atrayentes ya que son responsables en gran medida de la polinización de las plantas. (Trease y Evans, 1991)

2.7 Alcaloides

Los alcaloides se encuentran poco distribuidos en el reino vegetal, sin embargo presentan actividad en contra de la mayoría de especímenes representativos de las diferentes familias de artrópodos. Se caracterizan por ser producto del metabolismo de los aminoácidos y por contener nitrógenos con pares de electrones disponibles que reaccionan como bases, de ahí su nombre de alcaloides (*álcalis*). Dichos nitrógenos forman parte de un sistema heterocíclico (alcaloides verdaderos) y poseen una actividad farmacológica significativa. Actualmente existen más de 12 mil alcaloides conocidos y su número aumenta constantemente. Uno de los alcaloides más representativos es la nicotina, la cual presenta actividad contra una amplia gama de insectos incluyendo a las larvas y orugas. Otros alcaloides conocidos y de uso común son la atropina, cocaína, colchicina, morfina y quinina. Por aparte existen otros dos grupos de compuestos conocidos como pseudoalcaloides y protoalcaloides que guardan una estrecha relación estructural con los alcaloides verdaderos. (Bruneton, 1993; Trease y Evans, 1991)

2.8 Antraquinonas

Como su nombre lo indica, las antraquinonas son en su mayoría quinonas derivadas del antraceno, donde el anillo central presenta el mayor estado de oxidación y los anillos laterales frecuentemente exhiben grupos metoxilos o hidroxilos. Aunque de igual manera existen quinonas con únicamente dos anillos, que se conocen como naftoquinonas. Las antraquinonas forman parte de los compuestos conocidos como “fenólicos”, donde también se encuentran las cumarinas y los flavonoides. Se encuentran frecuentemente en las hojas, raíces, vainas y semillas de plantas tales como el sen, ruibarbo y la frágula. De igual manera son utilizadas normalmente como catárticos y en casos de estreñimiento. Otras quinonas de importancia son las quinonas propiamente dichas de un solo anillo, las

naftodiantronas de 8 anillos y las diantronas de 6 anillos. (Bruneton, 1993; Trease-Evans, 1991)

2.9 Cumarinas

Las cumarinas son compuestos fenólicos que se caracterizan por la formación de dos ciclos, uno de ellos lactónico. A excepción de la cumarina aislada del Haba de Tonka, todas las cumarinas presentan un grupo hidroxilo en el carbono 7 de su estructura, aunque el nombre de este grupo de compuestos se origina de la palabra “comarou”, nombre vernáculo de esta planta. Esta hidroxilación se debe a que son derivadas de la Umbeliferona ó 7-hidroxi-cumarina. Se encuentran frecuentemente en los frutos, flores, hojas, tallos, raíces y tegumentos de semilla. Su principal utilidad es como deterrente alimenticio. Las plantas altas en cumarinas son de sabor amargo y algunas pueden provocar hemorragias internas en los mamíferos. (Bruneton, 1993; Trease y Evans 1991)

2.10 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos que se caracterizan por la presencia de varios grupos hidroxilo en su estructura. Son compuestos derivados de la fenilalanina, la cual reacciona con un producto del metabolismo de la malonil coenzima A con 3 grupos acetilos, seguida de una ciclación. Debido a la diversidad de estructuras que se observan en los flavonoides, se agrupan en los siguientes grupos principales:

Antocianinas

Chalconas

Flavandioles

Flavonas

Flavonoles y

Taninos Condensados

De igual manera existen isoflavonoides o neoflavonoides los cuales han sufrido algún cambio fundamental en su esqueleto. Entre las funciones que cumplen los flavonoides se incluye la acomplejación de hierro lo que a su vez disminuye la capacidad oxidativa de peróxidos y superóxidos en el cuerpo de la planta o ser vivo que lo ingiera. Debido a ello, los flavonoides son un importante componente de la nutrición diaria de un ser humano donde la quercetina se consume a un promedio de 16 mg al día. Otras funciones de los flavonoides incluyen la resistencia de las plantas a la fotooxidación por luz *uv-vis*, transporte de auxina y deterrente alimenticio. (Bruneton, 1993; Trease-Evans 1991)

Dentro del reino vegetal, los flavonoides se encuentran presentes en prácticamente todas las especies y proveen de coloración a las flores y frutos, en ocasiones también a las hojas. En algunos casos actúan como copigmentos debido a que no son directamente visibles. Se estima que las plantas sintetizan más de 4 mil flavonoides. También las algas son capaces de sintetizarlos (Bruneton, 1993)

2.11 Saponinas

Las saponinas son heterósidos de amplia distribución en el reino vegetal. Sus propiedades tenso-activas les permiten disolverse en agua formando soluciones espumosas. Existen dos grupos fundamentales de saponinas. El primer grupo es formado por los que tienen genina esteroídica y el segundo por los que tienen genina triterpénica. Se encuentran ambos grupos en diferentes familias, siendo las de genina triterpénica las que normalmente se encuentran en la familia Verbenaceae. (Bruneton, 1993)

Una de las utilizaciones tradicionales de las saponinas es la de detergente (*Saponaria Officinalis* L.). De igual manera, se utilizan en procesos dietéticos aunque son capaces de producir hemólisis. Otras especies que contienen cantidades significativas de saponinas son la hiedra, el rusco, el espárrago y la zarzaparrilla. (Trease-Evans, 1991)

2.12 Taninos

Los taninos se dieron a conocer originalmente en Europa debido a sus propiedades curtientes, las cuales les permitían transformar la piel fresca en un material imputrescible (el cuero). El curtido del cuero consiste básicamente en la formación de enlaces entre las fibras de colágeno de la piel. La combinación entre las macromoléculas y los taninos se genera por interacciones hidrofóbicas y la formación de puentes de hidrógeno entre los fenoles de los taninos y las proteínas u otros polímeros. (Bruneton, 1993)

Los taninos no cuentan con nitrógenos en su estructura y provocan la precipitación de las proteínas debido a que son agentes desnaturalizantes. A nivel farmacológico presentan propiedades astringentes, antiinflamatorias y hemostáticas. Al igual que las cumarinas, los taninos provocan sabores desagradables en las plantas por lo que funcionan como deterrentes. Se clasifican los taninos básicamente en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados. (Bruneton, 1993)

2.13 Índice de Refracción

El índice de refracción de una sustancia consiste en la rotación de luz polarizada. Esta rotación provoca un ángulo medible y reproducible. De tal manera que el índice de refracción de una sustancia o en este caso de un aceite esencial pueda ser utilizado para determinar la identidad, pureza y calidad del mismo. Desde el punto de vista de la Física, consiste en la relación existente entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de una longitud de onda determinada que pasa del aire a la sustancia en estudio. (Bandoni, 2003)

3 JUSTIFICACIÓN

La planta que es conocida comúnmente como Salviasanta o Salviyá (*L. chiapasensis*) es utilizada en varias regiones de Guatemala como planta medicinal. Este hecho no sólo es indicativo de la presencia de principios activos entre los componentes que contiene sino también justifica llevar a cabo una investigación profunda de la misma para contar con suficiente información química. El uso que se le puede dar a esta información química es muy variado; desde generar una base de datos y de consulta hasta determinar las posibles aplicaciones que se le pueden dar a sus aceites esenciales.

De igual manera, la información relacionada a la composición química de especímenes provenientes de diferentes individuos permitirá la categorización de los mismos en diferentes quimiotipos. De tal manera que se pueda determinar cual o cuales de estos quimiotipos presentan una mayor posibilidad de utilización. Llegando de tal manera a una comprensión profunda de *L. chiapasensis* al distinguir los diferentes quimiotipos, los componentes de los aceites esenciales e índices de refracción de cada quimiotipo y los grupos de metabolitos secundarios más importantes presentes.

De igual manera se contribuye a los objetivos del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT- en la obtención de información útil en relación con *L. chiapasensis*, la cual fue investigada por primera vez en dicho laboratorio. Al mismo tiempo, se contribuye al Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas –IIQB- de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia al permitirle desarrollar proyectos en el área de Productos Naturales.

Por último, la diversidad florística de Guatemala se beneficiará al contar información más reciente de los lugares donde es posible encontrar *L. chiapasensis*. Cabe mencionar que la ubicación de la misma hasta hace tan sólo tres años era muy difícil debido a la poca información de la misma.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el rendimiento y la calidad de aceites esenciales obtenidos a partir de diferentes quimiotipos de *L. chiapasensis* (colectados en el campo).

4.2 Objetivos Específicos

Determinar los principales metabolitos secundarios presentes en las hojas de los diferentes quimiotipos de *L. chiapasensis* (colectados en el campo).

Determinar la actividad biocida de los aceites esenciales provenientes de los diferentes quimiotipos de *L. chiapasensis* (colectados en el campo).

Clasificar de acuerdo al índice de refracción los aceites esenciales provenientes de de los diferentes quimiotipos de *L. chiapasensis* (colectados en el campo).

5 HIPÓTESIS

Debido a la naturaleza descriptiva de la parte del proyecto a desarrollar, no procede ningún tipo de hipótesis.

6 MATERIALES

6.1 Equipo

Hidrodestilador neoClevenger

Horno de convección

Balanza analítica

Balanza semianalítica

Tamiz 5 Mesh

Refractómetro

Refrigeradora

Campana de extracción

Campana de flujo laminar

Baño ultrasónico

Baño maría

6.2 Cristalería

Viales ámbar de 4 ml

Viales transparentes de 20 ml

Balones de fondo redondo (para hidrodestilación)

Micropipetas

Micropipetas de 5 microlitros

Balones aforados de 100 ml y 250 ml

Beakers de 100 ml y 250 ml

Tubos de ensayo (pruebas fitoquímicas)

Frascos de vidrio y recipientes de plástico (pruebas fitoquímicas)

Varillas de agitación

Vidrios de reloj

Erlenmeyers de 250 ml

Asperjadores

Cubetas para TLC (20 por 20 cm)

6.3 Otros Materiales

Bulbos para micropipetas

Gradillas

Rejillas

Papel filtro

Espátulas de metal y plástico

6.4 Disolventes

n-Pentano

Acetato de Etilo

Cloroformo

Acetona

Etanol

6.5 Reactivos

Reactivos para pruebas fitoquímicas (ver Anexo III)

7 MÉTODOS

7.1 Planta a estudiar

L. chiapasensis (Verbenaceae) recolectada en los departamentos de Sololá, Totonicapán y Quetzaltenango.

7.2 Muestreo

Se realizarán viajes de campo a diferentes sitios de los departamentos de Sololá, Totonicapán y Quetzaltenango. Dichos viajes tendrán como propósito la colecta de material vegetal (hojas) de diferentes especímenes de *L. chiapasensis*, colectando cada espécimen de manera bimensual en dos ocasiones (Febrero-Marzo y Junio-Julio). Cada muestra se identificará con el nombre de la especie, el nombre del lugar donde fue colectado, el número de individuo del que fue recolectado en dicho lugar y el número de colecta correspondiente. Dependiendo del tamaño del espécimen se colectaran entre 100 y 200 gramos de material fresco (ver Imagen II, Anexo I).

7.3 Preparación de la muestra

El material vegetal colectado se mezcla y seca a temperatura ambiente y en la sombra. Se deja una fracción húmeda para determinar porcentaje de humedad y cenizas. El material vegetal seco se tamiza y a continuación se pulveriza (ver Imágenes III a V, Anexo I).

7.4 Extracción de aceites esenciales utilizando neoClevenger

Utilizando un balón de 1000 ml se miden entre 40 y 50 gramos de material vegetal seco. Se añade agua destilada hasta la mitad de capacidad del balón. Se coloca dentro de una manta y se conecta al aparato neoClevenger. Después de prender la manta se espera a que empiece la hidrodestilación del material y se cuenta 3 horas a partir de este momento. Se apaga el aparato y se colecta el aceite en n-pentano (ver Imágenes VI a VII, Anexo I).

7.5 Tamizaje fitoquímico

Se realizarán pruebas de tamizaje fitoquímico en por lo menos 3 especímenes de 3 individuos con propiedades organolépticas diferentes (forma de hoja y olor característico). Las pruebas se llevarán a cabo de acuerdo con el **Manual de Operaciones** Tamizaje Fitoquímico del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT- (ver Anexo III). Los metabolitos a estudiar son: alcaloides, taninos, antraquinonas, cumarinas, saponinas y flavonoides.

7.6 Índice de refracción de aceites esenciales

Para esta prueba se hace uso de un refractómetro tipo Abbe el cual se deja estabilizar por quince minutos después de haber sido encendido. Se coloca una gota de aceite esencial en el portamuestras, se cierra y se inicializa la medición (ver Imagen VII, Anexo I).

8 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Abril '08	Mayo '08	Junio '08	Julio '08	Agosto '08
Implementación de Métodos Analíticos	X				
Preparación Material de Muestreo	X	X	X	X	X
Colectas Material Vegetal	X	X	X	X	X
Análisis Químicos	X	X	X	X	X
Análisis Biocidas				X	X
Análisis de Resultados			X	X	X
Divulgación de Resultados				X	X
Elaboración Reporte Final				X	X
Total de Horas Laboratorio*	80	80	80	80	80
Número de Colectas	2	2	3	3	3
Total de Horas** Colectas	96	96	144	144	144
Total Horas de Trabajo por Mes	176	176	224	224	224
Total de Horas	1024				

*Cuatro horas diarias por cinco días a la semana (Lunes-Viernes).

**Cada colecta es de 2 días (Sábado-Domingo) con un total de 48 horas.

9 RESULTADOS

9.1 Hidrodestilación de aceites esenciales

Tabla I
Ubicación

Muestra	Sub-Mx	Localidad	Ubicación Satelital	Elevación (msnm)	Fecha de Colecta	Hábitat
LCHI.TACK.01.02	A	Tackchimil, Totonicapán	N 14° 57.315' W 91° 17.772'	2,403	02.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.TACK.01.02	B	Tackchimil, Totonicapán	N 14° 57.315' W 91° 17.772'	2,403	02.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.01	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.247' W 91° 15.697'	2,476	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.01	B	Chacayá, Sololá,	N 14° 46.247' W 91° 15.697'	2,476	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.02	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.02	B	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.04	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.684' W 91° 14.810'	2,433	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.04	B	Chacayá, Sololá	N 14° 46.684' W 91° 14.810'	2,433	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHOT.01.01	A	Chotacaj, Totonicapán	N 14° 56.143' W 91° 22.239'	2,611	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHOT.01.01	B	Chotacaj, Totonicapán	N 14° 56.143' W 91° 22.239'	2,611	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHOT.01.04	A	Chotacaj, Totonicapán	N 14° 56.076' W 91° 22.252'	2,611	12.03.08	Bosque Disturbado

Tabla I (Continuación)

Muestra	Sub-Mx	Localidad	Ubicación Satelital	Elevación (msnm)	Fecha de Colecta	Hábitat
LCHI.CHOT.01.04	B	Chotacaj, Totonicapán	N 14° 56.076' W 91° 22.252'	2,611	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHIY.01.02	A	Chiyax, Totonicapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	02.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHIY.01.02	B	Chiyax, Totonicapán	N 14° 53.864'	2,533	02.03.08	Bosque Disturbado

			W 91° 21.434'			
LCHI.CHIY.01.02	C	Chiyax, Totonicapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	02.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHIY.01.02	D	Chiyax, Totonicapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	02.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.01.01	A	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.416' W 91° 23.036'	2,492	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.01.03	A	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.01.03	B	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.01.03	C	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHIY.02.02	A	Chiyax, Totonicapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	15.06.08	Bosque Disturbado

LCHI.CHIY.02.02	B	Chiyax, Totoncapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	15.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHIY.02.02	C	Chiyax, Totoncapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	15.06.08	Bosque Disturbado

Tabla I (Continuación)

Muestra	Sub-Mx	Localidad	Ubicación Satelital	Elevación (msnm)	Fecha de Colecta	Hábitat
LCHI.JUCH.02.02	A	Juchanep, Totoncapán	N 14° 56.371'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado

			W 91° 23.033'			
LCHI.JUCH.02.02	B	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.02.02	C	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.02.02	D	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado

			W 91° 23.033'			
LCHI.JUCH.02.03	A	Juchanep, Tonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.02.03	B	Juchanep, Tonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.02.03	C	Juchanep, Tonicapán	N 14° 56.371'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado

			W 91° 23.033'			
LCHI.CHAC.02.01	B	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.02.04	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.02.04	B	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado

			W 91° 15.106'			
LCHI.CHAC.02.04	C	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.02.05	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.02.05	B	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado

			W 91° 15.106'			
--	--	--	---------------	--	--	--

Tabla I (Continuación)

Muestra	Sub-Mx	Localidad	Ubicación Satelital	Elevación (msnm)	Fecha de Colecta	Hábitat
LCHI.CHOT.02.03	A	Chotacaj, Totonicapán	N 14° 56.076' W 91° 22.252'	2,610	22.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHOT.02.03	B	Chotacaj, Totonicapán	N 14° 56.076' W 91° 22.252'	2,610	22.06.08	Bosque Disturbado

En la tabla se pueden observar cada uno de los códigos para los especímenes analizados; con su respectiva interpretación. Fuente: Datos experimentales.

Tabla II
Porcentaje de Rendimiento de Hidrodestilaciones
de Aceites Esenciales, Primera Colecta (Marzo 2008)

Muestra	Sub-Mx	Masa del Material Vegetal (g)	Masa del Aceite Esencial (g)	Rendimiento (%)
LCHI.TACK.01.02	A	15.0	0.1404	0.94
LCHI.TACK.01.02	B	15.0	0.1576	1.05
LCHI.CHAC.01.01	A	15.0	0.3585	2.39
LCHI.CHAC.01.01	B	15.0	0.4650	3.10
LCHI.CHAC.01.02	A	20.0	0.3580	1.79
LCHI.CHAC.01.02	B	15.0	0.2520	1.68
LCHI.CHAC.01.04	A	15.0	0.3629	2.42
LCHI.CHAC.01.04	B	15.1	0.3464	2.29
LCHI.CHOT.01.01	A	15.0	0.1175	0.78
LCHI.CHOT.01.01	B	15.0	0.1311	0.87
LCHI.CHOT.01.04	A	12.0	0.1646	1.37
LCHI.CHOT.01.04	B	12.0	0.2011	1.68
LCHI.CHIY.01.02	A	15.0	0.1830	1.22
LCHI.CHIY.01.02	B	15.0	0.1380	0.92
LCHI.CHIY.01.02	C	15.0	0.1531	1.02

Tabla II
(Continuación)

Muestra	Sub-Mx	Masa del Material Vegetal (g)	Masa del Aceite Esencial (g)	Rendimiento (%)
LCHI.CHIY.01.02	D	15.0	0.1363	0.91
LCHI.JUCH.01.03	A	12.8	0.1487	1.16
LCHI.JUCH.01.03	B	14.2	0.1643	1.16

En la tabla es posible observar los diferentes porcentajes de rendimiento de acuerdo a la muestra utilizada. Fuente: Datos experimentales.

Tabla III**Análisis Estadístico Aceites Esenciales, Primera Colecta (Marzo 2008)**

Prueba Estadística	Muestra	Sub-muestra	Resultado (%)
Promedio (P)			1.49
Desviación Estándar (DS)			0.65
Límite Inferior (P-DS)			0.84
Límite Superior (P+DS)			2.14
Valor Mínimo (Muestra)	LCHI.CHOT.01.01	A	0.78
Valor Máximo (Muestra)	LCHI.CHAC.01.01	A	3.10

En la tabla se observa el análisis estadístico llevado a cabo a los datos de porcentaje de rendimiento de la primera colecta. Fuente: Datos Experimentales.

Tabla IV

**Porcentaje de Rendimiento de Hidrodestilaciones
de Aceites Esenciales, Segunda Colecta (Junio-Julio 2008)**

Muestra	Sub-muestra	Masa del Material Vegetal (g)	Masa del Aceite Esencial (g)	Rendimiento (%)
LCHI.CHIY.02.02	A	20.0	0.1313	0.66
LCHI.CHIY.02.02	B	20.0	0.1095	0.55
LCHI.CHIY.02.02	C	20.0	0.1592	0.80
LCHI.JUCH.02.02	A	20.0	0.1845	0.92

LCHI.JUCH.02.02	B	20.0	0.1005	0.50
LCHI.JUCH.02.02	C	20.0	0.1489	0.74
LCHI.JUCH.02.02	D	20.0	0.1897	0.95
LCHI.JUCH.02.03	A	20.0	0.1505	0.75
LCHI.JUCH.02.03	B	20.0	0.1932	0.97
LCHI.JUCH.02.03	C	20.0	0.2101	1.05
LCHI.CHAC.02.01	B	20.0	0.4023	2.01
LCHI.CHAC.02.04	A	20.0	0.0808	0.40
LCHI.CHAC.02.04	B	18.6	0.1995	1.07
LCHI.CHAC.02.04	C	20.5	0.3264	1.59
LCHI.CHAC.02.05	A	20.0	0.2080	1.04
LCHI.CHAC.02.05	B	20.0	0.2761	1.38
LCHI.CHOT.02.03	A	20.0	0.1556	0.78
LCHI.CHOT.02.03	B	20.0	0.0352	0.18

En la tabla es posible observar los diferentes porcentajes de rendimiento de acuerdo a la muestra utilizada. Fuente: Datos experimentales.

Tabla V

Análisis Estadístico Aceites Esenciales, Segunda Colecta (Junio-Julio 2008)

Prueba Estadística	Muestra	Sub-muestra	Resultado (%)
Promedio (P)			0.91
Desviación Estándar (DS)			0.43
Límite Inferior (P-DS)			0.48
Límite Superior (P+DS)			1.34
Mínimo (Muestra)	LCHI.CHOT.02.03	B	0.18
Máximo (Muestra)	LCHI.CHAC.02.01	B	2.01

En la tabla se observa el análisis estadístico llevado a cabo a los datos de porcentaje de rendimiento de la segunda colecta. Fuente: Datos Experimentales.

9.2 Tamizaje fitoquímico

Tabla VI

Clave

Muestra	Localidad	Fecha de Colecta	Individuo
LCHI.NAHU.02.05	Nahualá, Sololá	14.07.07	5
LCHI.CHIY.02.02	Chiyax, Totonicapán	21.07.07	2
LCHI.CHAC.02.01	Chacayá, Sololá	21.07.07	1

En la tabla se pueden observar cada uno de los códigos para las muestras analizadas; con su respectiva interpretación. Fuente: Datos experimentales.

Tabla VII

Porcentaje de Humedad

Muestra	Peso (g)	Porcentaje de humedad
LCHI.NAHU.02.05	0.455	14.79%
LCHI.CHIY.02.02	0.452	13.08%
LCHI.CHAC.02.01	0.460	12.55%

Balanza de humedad utilizada: HB35 Halogen. Fuente: Datos experimentales.

Tabla VIII

Presencia de Cumarinas

Muestra	Sin Fluorescencia	Fluorescencia
LCHI.NAHU.02.05	+	Verde ++
LCHI.CHIY.02.02	+	Verde ++
LCHI.CHAC.02.01	+	Verde ++++

En la tabla es posible observar que tanto las pruebas sin como con fluorescencia fueron positivas. Ver Imágenes I y II, Anexo II. Fuente: Datos experimentales.

Tabla IX
Presencia de Flavonoides y Antocianinas

Muestra	Ensayo	Resultados
LCHI.NAHU.02.05	Acido sulfúrico concentrado	-
LCHI.NAHU.02.05	Cloruro férrico al 10%	Isoflavonas
LCHI.NAHU.02.05	Acido clorhídrico concentrado	-
LCHI.NAHU.02.05	Magnesio metálico y HCl concentrado	-
LCHI.NAHU.02.05	NaOH 1N	Isoflavonas
LCHI.CHIY.02.02	Acido sulfúrico concentrado	-
LCHI.CHIY.02.02	Cloruro férrico al 10%	Isoflavonas
LCHI.CHIY.02.02	Acido clorhídrico concentrado	-
LCHI.CHIY.02.02	Magnesio metálico y HCl concentrado	-
LCHI.CHIY.02.02	NaOH 1N	Isoflavonas
LCHI.CHIC.02.01	Acido sulfúrico concentrado	-
LCHI.CHAC.02.01	Cloruro férrico al 10%	Isoflavonas, posibles flavanonas
LCHI.CHAC.02.01	Acido clorhídrico concentrado	Posibles flavanonas
LCHI.CHAC.02.01	Magnesio metálico y HCl concentrado	-
LCHI.CHAC.02.01	NaOH 1N	Isoflavonas

En la tabla se pueden observar los posibles flavonoides y antocianinas presentes en un extracto metanólico de cada uno de las muestras estudiadas. Ver Imagen III, Anexo II.
Fuente: Datos experimentales.

Tabla X
Presencia de Taninos

Muestra	Ensayo	Resultado
LCHI.NAHU.02.05	Gelatina al 1%	Positivo
LCHI.NAHU.02.05	Gelatina – sal (1% y 10%)	Positivo
LCHI.NAHU.02.05	Cloruro férrico al 10%	Negativo
LCHI.CHIY.02.02	Gelatina al 1%	Positivo
LCHI.CHIY.02.02	Gelatina – sal (1% y 10%)	Positivo

LCHI.CHIY.02.02	Cloruro férrico al 10%	Negativo
LCHI.CHAC.02.01	Gelatina al 1%	Positivo
LCHI.CHAC.02.01	Gelatina – sal (1% y 10%)	Positivo
LCHI.CHAC.02.01	Cloruro férrico al 10%	Negativo

En la tabla se observan las diferentes pruebas realizadas para la presencia de taninos. Ver Imágenes IV a VI, Anexo II. Fuente: Datos experimentales.

Tabla XI
Presencia de Antraquinonas

Muestra	Ensayo	Resultado
LCHI.NAHU.02.05	Prueba de Bornträger	Negativo
LCHI.NAHU.02.05	Prueba de Bornträger modificada	Negativo
LCHI.CHIY.02.02	Prueba de Bornträger	Negativo
LCHI.CHIY.02.02	Prueba de Bornträger modificada	Negativo
LCHI.CHAC.02.01	Prueba de Bornträger	Negativo
LCHI.CHAC.02.01	Prueba de Bornträger modificada	Negativo

En la tabla se puede observar los diferentes resultados negativos para las pruebas de antraquinonas realizadas. Ver Imágenes VII a X, Anexo II. Fuente: Datos experimentales.

Tabla XII
Presencia de Alcaloides

Muestra	Ensayo	Resultados
LCHI.NAHU.02.05	Reactivo de Mayer's	Positivo
LCHI.NAHU.02.05	Reactivo de Dragendorff	Positivo
LCHI.NAHU.02.05	Reactivo de Wagner	Positivo
LCHI.CHIY.02.02	Reactivo de Mayer's	Positivo

LCHI.CHIY.02.02	Reactivo de Dragendorff	Positivo
LCHI.CHIY.02.02	Reactivo de Wagner	Positivo
LCHI.CHAC.02.01	Reactivo de Mayer's	Positivo
LCHI.CHAC.02.01	Reactivo de Dragendorff	Positivo
LCHI.CHAC.02.01	Reactivo de Wagner	Positivo

En la tabla es posible observar que todos las muestras analizadas dieron resultado positivo a las distintas pruebas de alcaloides. Ver Imágenes XI a XIV, Anexo II.

Fuente: Datos experimentales.

9.3 Actividad biocida e índice de refracción

Tabla XIII

Clave

Muestra	Sub-Mx	Localidad	Ubicación Satelital	Elevación (msnm)	Fecha de Colecta	Hábitat
LCHI.CHAC.01.01	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.247' W 91° 15.697'	2,476	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.02	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	30.03.08	Bosque Disturbado

LCHI.CHAC.01.04	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.684' W 91° 14.810'	2,433	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.01.04	B	Chacayá, Sololá	N 14° 46.684' W 91° 14.810'	2,433	30.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHOT.01.04	A	Chotacaj, Tonicapán	N 14° 56.076' W 91° 22.252'	2,611	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHIY.01.02	C	Chiyax, Tonicapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	02.03.08	Bosque Disturbado

Tabla XIII

(Continuación)

Muestra	Sub-Mx	Localidad	Ubicación Satelital	Elevación (msnm)	Fecha de Colecta	Hábitat
----------------	---------------	------------------	----------------------------	-------------------------	-------------------------	----------------

LCHI.JUCH.01.03	A	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	12.03.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHIY.02.02	A	Chiyax, Totonicapán	N 14° 53.864' W 91° 21.434'	2,533	15.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.02.02	A	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.JUCH.02.03	A	Juchanep, Totonicapán	N 14° 56.371' W 91° 23.033'	2,521	22.06.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHAC.02.01	B	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado

			W 91° 15.106'			
LCHI.CHAC.02.04	A	Chacayá, Sololá	N 14° 46.763' W 91° 15.106'	2,436	06.07.08	Bosque Disturbado
LCHI.CHOT.02.03	A	Chotacaj, Tonicapán	N 14° 56.076' W 91° 22.252'	2,610	22.06.08	Bosque Disturbado

En la tabla se presenta la información correspondiente a los códigos y sus significados.

Tabla XIV

Actividad Biocida, Primera Colecta (Marzo 2008)

Código	Sub- muestra	Concentración	Organismo Experimental	Resultado Prueba Citotóxica
LCHI.CHAC.01.01	A	0.5 mg/ml	<i>Artemia salina</i>	Negativo
LCHI.CHOT.01.04	A	0.5 mg/ml	<i>Artemia salina</i>	Negativo

Se observan los resultados obtenidos al tratar *Artemia salina* con los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación.

Tabla XV
Índice de Refracción, Primera Colecta (Marzo 2008)

Muestra	Sub-muestra	Índice de Refracción	Temperatura	Índice Corregido	Sólidos
LCHI.CHAC.01.01	A	1.4755	24.0	1.4773	74.2
LCHI.CHAC.01.02	A	1.4750	24.0	1.4768	74.0
LCHI.CHAC.01.04	A	1.4775	23.5	1.4791	75.0
LCHI.CHAC.01.04	B	1.4815	24.0	1.4833	76.5
LCHI.CHOT.01.04	A	1.4800	24.0	1.4818	76.0
LCHI.CHIY.01.02	C	1.4700	23.5	1.4716	72.0
LCHI.JUCH.01.03	A	1.4785	24.0	1.4803	75.8

En la tabla se pueden observar los diferentes índices de refracción de acuerdo a la muestra analizada durante la primera colecta. Fuente: Datos experimentales.

Tabla XVI
Análisis Estadístico
Índice de Refracción, Primera Colecta (Marzo 2008)

Prueba Estadística	Muestra	Sub-muestra	Resultado
Promedio (P)			1.4786
Desviación Estándar (DS)			0.0039
Límite inferior (P-DS)			1.4747
Límite superior (P+DS)			1.4825
Mínimo	LCHI.CHIY.01.02	C	1.4716
Máximo	LCHI.CHAC.01.04	B	1.4833

En la tabla se observan los diferentes datos estadísticos derivados del análisis de índice de refracción de las muestras obtenidas en la primera colecta.

Tabla XVII
Índice de Refracción, Segunda Colecta (Junio-Julio 2008)

Muestra	Sub-muestra	Índice de Refracción	Temperatura	Índice Corregido	Sólidos
LCHI.CHIY.02.02	A	1.4720	24.0	1.4738	72.4
LCHI.JUCH.02.02	A	1.4825	24.0	1.4843	77.0
LCHI.JUCH.02.03	A	1.4825	24.0	1.4843	77.0
LCHI.CHAC.02.01	B	1.4760	24.0	1.4778	74.8
LCHI.CHAC.02.04	A	1.4810	24.0	1.4828	76.5
LCHI.CHOT.02.03	A	1.4830	24.0	1.4848	77.2

En la tabla se pueden observar los diferentes índices de refracción de acuerdo a la muestra analizada durante la segunda colecta. Fuente: Datos experimentales.

Tabla XVIII
Análisis Estadístico
Índice de Refracción, Segunda Colecta (Junio-Julio 2008)

Prueba Estadística	Muestra	Sub-muestra	Resultado
Promedio			1.4813
Desviación Estándar			0.0045
Límite inferior			1.4768
Límite superior			1.4858
Mínimo	LCHI.CHIY.02.02	A	1.4738
Máximo	LCHI.CHOT.02.03	A	1.4848

En la tabla se observan los diferentes datos estadísticos derivados del análisis de índice de refracción de las muestras obtenidas en la primera colecta.

10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Hidrodestilación de aceites esenciales

El aceite esencial de una planta es una fracción líquida volátil, para la cual existen diversas técnicas de extracción. En esta ocasión en particular se utilizó la técnica de hidrodestilación con neoClevenger, la cual es una técnica reproducible y con alto rendimiento. Aún así, durante el desarrollo de la investigación se hicieron algunos ajustes para mejorar el porcentaje de rendimiento.

El principal ajuste que se llevó a cabo fue la reducción de material vegetal a colocar dentro del balón de fondo redondo. En lugar de colocar entre 40.0 y 50.0 gramos de material vegetal como se menciona en la sección 7.4, se colocaron en la mayoría de los casos entre 15.0 y 20.0 gramos. Este cambio responde a que se comprobó empíricamente que el colocar una menor cantidad de material vegetal, el porcentaje de rendimiento aumenta. De igual manera, el sistema de hidrodestilación se hace más estable, ya que al haber menos material vegetal, también hay menos fluctuaciones de la presión dentro del sistema. Fluctuaciones muy violentas de la presión dentro del sistema ocasiona frecuentemente su inoperatividad y por ende pérdida del aceite esencial.

Otro ajuste que se realizó fue la utilización de un refrigerante en el sistema de condensación. Este refrigerante permitió reducir la temperatura de condensación de los aceites esenciales a una temperatura de 5° C. Debido a la volatilidad de los aceites esenciales siempre se busca condensarlos a la menor temperatura posible después de que han sido hidrodestilados. Ya propiamente durante la hidrodestilación del material vegetal se encontraron situaciones que hicieron variar la cantidad de aceite esencial extraído o su porcentaje de rendimiento, tanto en la época seca como la época lluviosa.

En la Tabla II de la sección 9.1 se observa la cantidad de material vegetal con la que se trabajó en cada extracción al igual que la cantidad y porcentaje de aceite esencial obtenido para la colecta realizada en la época seca. Estudios realizados previamente han identificado la existencia de por lo menos tres quimiotipos de *L. chiapasensis* de acuerdo a su composición de aceite esencial. El quimiotipo más distribuido presenta citral como su componente mayoritario, especímenes provenientes de Chacayá, Sololá pertenecen a otro quimiotipo donde el acetato de bornilo y el 1,8-cineol son los componentes mayoritarios, por su parte, especímenes de Chiyax, Totonicapán presentan altas cantidades de citronelal además de citral. (Jayes *et.al.* 2008)

Al comparar los porcentajes de rendimiento de acuerdo a la localidad de origen del material vegetal, se observa como los especímenes de Chacayá, con alto contenido de acetato de bornilo y 1,8-cineol (Jayes *et al.*, 2008), presentan los rendimientos más altos. En el caso particular del espécimen LCHI.CHAC.01.01 sub-muestra B se logra observar un rendimiento de 3.10%, el cual es seis veces superior al recomendado por la Aragão. Aunque se debe hacer énfasis a que todas las hidrodestilaciones realizadas en la época seca dieron porcentajes de rendimiento superiores al 0.5%. (Aragão, 1981)

Los porcentajes de rendimiento de los especímenes provenientes de Chiyax, Totonicapán, con alto contenido de citronelal además de citral (Jayes *et al.*, 2008), son similares a los de los especímenes provenientes de otras localidades, con alto contenido de citral (Jayes *et al.*, 2008). La similitud de su porcentaje de rendimiento como de sus componentes mayoritarios sugieren que los individuos de Chiyax, Totonicapán y de otras localidades de Totonicapán tales como Tackchimil, Chotacaj y Juchanep guardan una relación evolutiva menos divergente entre ellos que con los individuos de Chacayá, Sololá.

En la Tabla III de la sección 9.1 se observan los análisis estadísticos llevados a cabo a la información obtenida a partir de la hidrodestilación de especímenes colectados en la época seca. El promedio de porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales obtenidos es alto (1.49%), lo cual corrobora la utilidad de *L. chiapasensis* como fuente de aceites esenciales. Otro dato estadístico de relevancia es la desviación estándar. En este caso en particular la desviación estándar es muy amplia (0.65%), pero esto se debe a la notable diferencia de

rendimiento de aceites esenciales entre los especímenes de Chacayá, Sololá y los especímenes de otras localidades. Aunque se observó que los especímenes provenientes de Chacayá, Sololá tuvieron entre ellos valores similares, de igual manera los especímenes provenientes de todas las demás localidades también tuvieron valores muy similares entre ellos.

El porcentaje de rendimiento mínimo observado fue el de la muestra LCHI.CHOT.01.01 sub-muestra A (0.78%), sin embargo al ser éste superior al 0.5% se considera un valor aceptable. El porcentaje de rendimiento máximo observado fue el de LCHI.CHAC.01.01 sub-muestra B (3.10%); lo cual se atribuye a las características propias de los especímenes de dicha localidad.

En la Tabla IV de la sección 9.1 se observan los resultados de la hidrodestilación de aceites esenciales a partir de los especímenes colectados durante la época lluviosa. Los datos que resaltan más fácilmente son los concernientes a la masa del material vegetal con la que se realizaron las extracciones. En todos los casos, excepto con LCHI.CHAC.02.04 Sub-muestra B, se realizaron las hidrodestilaciones con 20.0 gramos de material vegetal. Esto se debe a que durante la época lluviosa los individuos a partir de los cuales se colectaron los especímenes presentaron un aumento significativo de follaje. Aunque este aumento de follaje no se traduce necesariamente en una mayor disponibilidad de aceite esencial como se verá más adelante.

La ventaja principal que ofrece la mayor cantidad de material vegetal es el poder llevar a cabo una mayor cantidad de hidrodestilaciones del mismo espécimen. Este hecho ayuda a diferenciar bajos porcentajes de rendimientos debidos a las características propias de la planta con bajos porcentajes de rendimiento debidos a la realización incorrecta de la técnica de hidrodestilación con neoClevenger.

Al comparar los resultados obtenidos entre el material obtenido durante la segunda colecta y el material obtenido en la primera colecta, se hace obvia una disminución generalizada del porcentaje de rendimiento. En el caso de los especímenes provenientes de Chacayá, Sololá se observan los cambios más drásticos. Mientras que en las hidrodestilaciones

realizadas con el material de la primera colecta, 4 sub-muestras superaban el 2% de rendimiento e inclusive se observó una por encima del 3%, en las hidrodestilaciones realizadas con el material de la segunda colecta, únicamente una sub-muestra superó el 2% de rendimiento.

En el caso de las demás localidades se observa que las hidrodestilaciones de la segunda colecta rara vez superan el 1% de rendimiento; mientras que las hidrodestilaciones de la primera colecta se lograban valores de hasta el 3.10%. Sin embargo, en la mayoría de localidades el porcentaje de rendimiento es todavía comparable entre las dos colectas y no presenta diferencias tan drásticas como es el caso del material colectado en Chacayá, Sololá. Todo esto refuerza lo ya mencionado anteriormente; los especímenes provenientes de Chacayá, Sololá son los que guardan una relación evolutiva más divergente con respecto de los especímenes provenientes de las demás localidades estudiadas.

Al observar los resultados del análisis estadístico del material proveniente de la segunda colecta presentados en la Tabla V sección 9.1 se observan pocas similitudes y varias diferencias con respecto de los datos estadísticos de la primera colecta. La única similitud que se observa es el hecho que una vez más fue un ejemplar proveniente de Chacayá, Sololá el que dio el porcentaje de rendimiento más alto; en este caso fue LCHI.CHAC.02.01 sub-muestra B (2.01%). Es importante hacer notar que esta muestra proviene del mismo individuo que arrojó el máximo porcentaje de rendimiento en la primera colecta.

Son varias las diferencias que se observan entre los datos estadísticos de ambas colectas. La más significativa de ellas es el promedio de rendimiento ($1.49\% \pm 0.65\%$ en la primera colecta y $0.91\% \pm 0.43\%$ en la segunda). Esta disminución entre la primera colecta y la segunda colecta o entre la colecta de época seca y la colecta de época lluviosa es un caso normal y generalizado en el reino vegetal en relación a los aceites esenciales. Esto se debe a la variación significativa del ambiente en el que se desarrolla la planta. Hay menos estrés por lo que algunos metabolitos secundarios dejan de ser tan necesarios. De igual manera, la

constante lluvia provoca una pérdida significativa de aceite esencial debido al lavado constante de la superficie de las hojas.

El mínimo porcentaje de rendimiento observado en la segunda colecta correspondió a la muestra LCHI.CHOT.02.03 sub-muestra B y fue claramente menor al observado en la primera colecta. La desviación estándar también es menor en la segunda colecta, este hecho se debe a la disminución significativa de los porcentajes de rendimiento de las muestras provenientes de Chacayá, Sololá; lo que hizo que fueran más semejantes a los porcentajes de rendimiento de las muestras provenientes de las otras localidades.

10.2 Tamizaje Fitoquímico

Para la realización del tamizaje fitoquímico se seleccionaron tres muestras de *L. chiapasensis* cuyos análisis cromatográficos sugieren que pertenecen a quimiotipos diferentes. En el caso de LCHI.NAHU.02.05, originario de Nahualá, Sololá, se sabe que tiene un alto contenido de citral en su aceite esencial. Otra muestra utilizada fue LCHI.CHIY.02.02, proveniente de Chiyax, Totonicapán, del cual se sabe que tiene un alto contenido de citral y citronelal. La última muestra utilizada fue la LCHI.CHAC.02.01, originario de Chacayá, Sololá, con un alto contenido de 1,8-cineol y acetato de bornilo. (Jayes *et al.*, 2008)

La primera prueba que se realizó fue la de porcentaje de humedad, sus resultados se observan en la Tabla VII de la sección 9.2. En todos los casos el porcentaje de humedad fue superior al 10%, el cual es el porcentaje de rendimiento recomendado. En el caso de LCHI.NAHU.02.05 el porcentaje de humedad fue casi del 15%. Sin embargo, este hecho no se considera relevante debido a que la finalidad de reducir el porcentaje de humedad del material vegetal al 10% es de poder almacenarlo sin que pierda su integridad por un período de dos años aproximadamente, y esa no fue la finalidad de este estudio.

En la Tabla VIII de la sección 9.2 se presentan los resultados relacionados a las cumarinas. En las tres muestras estudiadas se determinó que efectivamente se encontraban presentes. La prueba se llevó a cabo haciendo uso únicamente del extracto metanólico de *L.*

chiapasensis. Las cumarinas forman un grupo de metabolitos secundarios presentes en varias familias y con poca actividad por lo que detectar su presencia no es particularmente significativo a menos que se lleven a cabo estudios que profundicen en su composición.

En la Tabla IX de la sección 9.2 se encuentran los resultados relacionados a la presencia de flavonoides en las tres muestras. Esta prueba es particularmente relevante debido a que se reportan a los flavonoides como agentes importantes de la actividad de *L. chiapasensis*. (Hernández-Arteseros, 2006). Una de las propiedades más importantes que se le atribuyen a los flavonoides es la de actuar como agentes antioxidantes, aunque frecuentemente presentan más actividades (Bruneton, 1993). Los flavonoides encontrados incluyen a las isoflavonas para las tres muestras estudiadas. Por su lado LCHI.CHAC.02.01 también presentó indicios de flavanonas. Aunque la prueba de flavanonas no se considera concluyente, es un indicio de la significativa divergencia evolutiva entre los individuos de Chacayá, Sololá y los de otras localidades sugeridas ya por estudios anteriores. (Jayes *et al.*, 2008)

Los resultados relativos a la presencia de taninos se observan en la Tabla X de la sección 9.2. La propiedad que ha distinguido a los taninos es de actuar como curtientes. Las tres muestras estudiadas dieron positivas las pruebas generales de taninos. Sin embargo estas mismas muestras dieron negativa la prueba específica para catecol y pirogalol por lo que se considera que estos dos taninos se encuentran ausentes en todos los quimiotipos hasta hoy estudiados de *L. chiapasensis*. En la Tabla XI de la sección 9.2 se observa que las antraquinonas también se encuentran ausentes.

Un grupo de metabolitos secundarios de gran importancia es el conformado por los alcaloides. Esto se debe a que presentan actividad contra una gran cantidad de herbívoros provenientes de diferentes familias. De igual manera, han demostrado presentar actividad en el cuerpo humano, aunque no siempre benéfica (Bruneton, 1993). Los resultados se presentan en la Tabla XII de la sección 9.2. Estos resultados indican la presencia de estos metabolitos secundarios en las tres muestras estudiadas. Dichos resultados son relevantes,

ya que indican que *L. chiapasensis* cuenta con una alta variedad de compuestos químicos que podrían presentar alguna actividad en investigaciones posteriores.

Las saponinas son compuestos que cuentan con una molécula hidrofóbica (terpenoide) unida a una molécula hidrofílica (carbohidrato) por lo que presentan propiedades tensoactivas (Bruneton, 1993). Estas mismas propiedades tensoactivas no son deseables durante la hidrodestilación de aceites esenciales al hacer uso de neoClevenger o cualquier sistema similar debido a que provocan proyecciones del material vegetal al igual que fluctuaciones de la presión dentro del sistema. En las tres muestras estudiadas se encuentran ausentes las saponinas, como se puede observar en la Tabla XIII de la sección 9.2. Estos resultados son concluyentes ya que también la prueba hemolítica dio negativo en los tres casos, por lo que se corrobora el hecho que *L. chiapasensis* es una buena fuente de aceites esenciales.

10.3 Actividad Biocida e Índice de Refracción

En la Tabla XIV de la sección 9.3 se pueden observar los resultados relativos a la actividad citotóxica del aceite esencial de *L. chiapsensis* al exponer *Artemia salina* al mismo. Una dosis de 0.5 mg/ml es una dosis alta y se utiliza para determinar si la sustancia de interés es tóxica o no. En el caso de que sea tóxica, se realiza pruebas a menores concentraciones para determinar que tan tóxica es. Sin embargo, en este caso se puede observar que con ambos aceites, tanto para LCHI.CHOT.01.04 sub-muestra A como para LCHI.CHAC.01.01 sub-muestra A, los resultados son negativos.

Este resultado es muy útil ya que incluye a un espécimen proveniente de la población Chacayá, Sololá que como ya se ha mencionado anteriormente es la población que diverge más de las otras, de tal manera que se puede generalizar que los aceites esenciales provenientes de diferentes quimiotipos de *L. chiapsensis* no son tóxicos para *Artemia salina* a la concentración con la que se trabajó. Aunque todavía hace falta realizar pruebas en animales y eventualmente en seres humanos, la falta de toxicidad de los aceites esenciales de *L. chiapsensis* ante *Artemia salina* indica que eventualmente se podrían preparar distintos productos inocuos con los mismos.

Los resultados del índice de refracción para algunos aceites esenciales obtenidos durante la primera colecta de *L. chiapasensis* se observan en la Tabla XV de la sección 9.3 con su respectivo análisis estadístico en la Tabla XVI. Los datos obtenidos resultan útiles para distinguir los aceites esenciales de *L. chiapasensis* de otros aceites esenciales debido al estrecho margen en el que se presentan. El índice de refracción mínimo corresponde a LCHI.CHIY.01.02 sub-muestra C, mientras que el máximo pertenece a LCHI.CHAC.01.04 sub-muestra B, ambos con una diferencia de tan sólo 0.0117. De igual manera, la desviación estándar fue muy estrecha, con un valor de 0.0039.

Los resultados para los aceites esenciales de la segunda colecta se presentan en la Tabla XVII y su análisis estadístico en la Tabla XVIII. Algo muy importante que se observa es el hecho que el promedio del índice de refracción de los aceites esenciales de la segunda colecta es muy próximo al de los aceites esenciales de la primera colecta. Esto sugiere que aunque el porcentaje de rendimiento disminuye entre ambas épocas; la composición química no varía significativamente. De igual manera, la desviación estándar es comparable a la observada en los aceites esenciales de la primera colecta.

Sin embargo, los resultados más importantes se observan al comparar la Tabla XV y la Tabla XVII, donde se observa que los resultados de índice de refracción son reproducibles a nivel individuo. El caso más obvio es el de los aceites correspondientes a los índices de refracción de LCHI.CHIY.01.02 sub-muestra C y LCHI.CHIY.02.02 sub-muestra A, provenientes del mismo individuo, los cuales aunque no son demasiados cercanos entre sí, son muy distantes a los índices de refracción de los demás especímenes y en ambas colectas constituyeron los índices de refracción más bajos.

Un caso similar se observan con LCHI.CHAC.01.04 sub-muestra B y LCHI.CHAC.02.04 sub-muestra A, provenientes del mismo individuo. En este caso en particular los índices de refracción son muy cercanos entre sí: 1.4833 y 1.4828 respectivamente. Sin embargo, los datos obtenidos todavía no pueden considerarse concluyentes debido al bajo número de aceites esenciales a los que se les tomó su índice de refracción. Esto se debió a la poca disponibilidad de aceite esencial para llevar a cabo las pruebas. Pero de manera preliminar

se sugiere la utilización del índice de refracción como una prueba rápida y sencilla para determinar la calidad e inclusive procedencia del aceite esencial de *L. chiapasensis*.

11 CONCLUSIONES

11.1 El porcentaje de rendimiento promedio obtenido de la extracción de aceite esencial de las hojas de diferentes especímenes de *L. chiapasensis* por medio de la hidrodestilación con neoClevenger durante la primera colecta fue de 1.49%; el cual es significativamente superior al 0.5% que se sugiere como aceptable.

11.2 El porcentaje de rendimiento más alto obtenido de la extracción de aceite esencial durante la primera colecta correspondió a un espécimen colectado en Chacayá, Sololá con un valor del 3.10%.

11.3 El porcentaje de rendimiento promedio obtenido de la extracción de aceite esencial durante la segunda colecta fue de 0.91%, el cual es superior al 0.5% que se sugiere como aceptable, pero menor al obtenido durante la primera colecta.

11.4 El porcentaje de rendimiento más alto obtenido de la extracción de aceite esencial durante la segunda colecta correspondió a un espécimen colectado en Chacayá, Sololá con un valor de 2.01%, el cual es menor al obtenido en la primera colecta.

11.5 Los porcentajes de rendimiento de la extracción de aceite esencial disminuyeron en la época lluviosa al compararlos con la época seca, en particular para los especímenes provenientes de Chacayá, Sololá.

11.6 Los metabolitos secundarios a los que se les realizaron pruebas y se encontraron presentes en las hojas de *L. chiapasensis* son: cumarinas, isoflavonas, taninos y alcaloides.

11.7 Los metabolitos secundarios a los que se les realizaron pruebas y se encontraron ausentes en las hojas de *L. chiapasensis* son: antraquinonas, piragolol, catecol y saponinas.

11.8 Un espécimen de *L. chiapasensis* colectado en Chacayá, Sololá tuvo presencia en sus hojas de flavanonas además de los otros metabolitos secundarios ya mencionados.

11.9 Los especímenes de *L. chiapasensis* colectados en Chacayá, Sololá presentan diferencias significativas de porcentaje de rendimiento de aceite esencial, respuesta al cambio de época y pruebas fitoquímicas de sus hojas con respecto a especímenes colectados en poblaciones de otras localidades lo que sugiere que existe una divergencia evolutiva entre esta población y las otras poblaciones estudiadas.

11.10 El aceite esencial de las hojas de *L. chiapasensis* no es tóxico al usarse en una concentración de 0.5 mg/ml en presencia de *Artemia salina*.

11.11 El índice de refracción de los aceites esenciales de las hojas de *L. chiapasensis* se puede utilizar para determinar la calidad del aceite debido al rango estrecho en que se presenta y a su reproducibilidad entre diferentes épocas de colecta.

12 RECOMENDACIONES

12.1 Realizar pruebas de toxicidad del aceite esencial de las hojas de *L. chiapasensis* en seres superiores a *Artemia salina*.

12.2 Determinar los índices de refracción del aceite esencial de las hojas de más especímenes de *L. chiapasensis* para crear una base de datos útil para determinar su calidad.

12.3 Realizar pruebas fitoquímicas y análisis cromatográficos al igual que ensayos de biología molecular tanto de las hojas como de otras partes de la planta de especímenes de *L. chiapasensis* provenientes de Chacayá, Sololá y compararlos con las mismas pruebas y análisis de especímenes provenientes de otras comunidades.

13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aragão, A. (1981). Oleos Essenciais de Plantas do Nordeste. Edicoes UFC. Fortaleza, Brasil.

Bandoni, A. (2003). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED. Argentina. 31.

Bruneton, J. (1993). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2 Edición. Editorial Acribia, S.A. España. 123-124, 183-184, 261-263, 305-306, 366-367, 405-407, 467, 775.

Hernández-Arteseros, J.A., Vila, R., Cañigual, S., Cruz, S.M., Cáceres, A. (2006). Composition of the Essential Oil of *Lippia chiapasensis* Loes. J. Essen. Oil Res. 18:6-9.

Hostettmann, K., Queiroz, E., Vieira, P. (2003). Princípios Ativos de Plantas Superiores. Sao Carlos, Brasil, Edufscar.

Jayes, P., De León, J., Navas, P., Pérez, J., Mérida, M., Farfán, C., (2007) Aceites esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala, familias Verbenaceae y Lauraceae. USAC, Guatemala

Jayes, P., Pérez, J., Mérida, M., Farfán, C., (2008) Estudio del aceite esencial y metabolitos secundarios de diferentes poblaciones de *Lippia chiapasensis* Loes. (Verbenacea). USAC, Guatemala

Larson, R.A. (1995). Antioxidant mechanisms of secondary natural products. In: Oxidative stress and antioxidant defense in biology. London, Ed. Ahmad.

Medinilla, B. (1996). Manual de Laboratorio de Farmacognosia. USAC, Guatemala.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J. of Ethnopharm. 76:201-214.

Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salguero, L.R., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2003). Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitosus* Grown on the Islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). *Phytochem. Anal.* 14:228-231

Pérez, J.F., Mérida, M., Ribeiro da Silva, A.J. (2005). Composicao do oleo essencial da planta *Lippia chiapasensis* de uma populacao da Guatemala. Livro de Resumos, XXVIII Reuniao Anual Sociedade Brasileira de Química. Caldo de Poças, Brasil.

Pérez, J.F., Mérida, M., Samayoa, M. Del C., Hollanda, M.C., Ribeiro da Silva, A.J. (2007). Livro de Resumos, XXX Reuniao Anual Sociedade Brasileira de Química. San Pablo, Brasil.

Potterat, O. (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*, 1, 415.

Standley, P., Steyermark, J., (1970). Flora de Guatemala, part IX. *Fieldiana: Botany, USA.*, vol. 24. 209-211.

Trease, G., Evans, C., (1991). *Farmacognosia*. 13 Edición. Editorial McGraw-Hill, México. 590-594.

Windholz, M. (1983). *The Index Merck*. 10 Edición. Merck & Co. E.E.U.U.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I	
Imágenes Extracción de Aceites Esenciales e Índices de Refracción_____	48
ANEXO II	
Imágenes Tamizaje Fitoquímico_____	53
ANEXO III	
Procedimientos de Operación Estandarizados P.O.E.'s_____	62

ANEXO I
Imágenes Extracción de Aceites Esenciales e Índice de Refracción

Imagen I
Hojas e Inflorescencias de Salviasanta



Fotografía: Max Mérida

Imagen II
Colecta de Material Vegetal



Fotografía: Max Mérida

Imagen III
Secado del Material Vegetal



Fotografía: Christian Farfán

Imagen IV
Corte del Material Vegetal



Fotografía: Christian Farfán

Imagen V
Tamizaje del Material Vegetal



Fotografía: Max Mérida

Imagen VI
Hidrodestilación de Aceites Esenciales



Fotografía: Christian Farfán.

Imagen VII
Aceite Esencial



Fotografía: Christian Farfán.

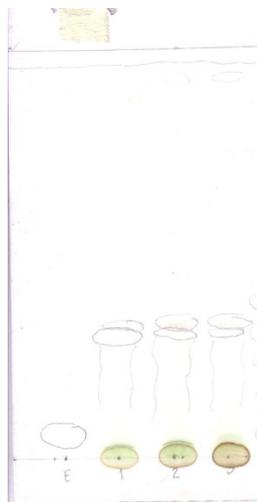
Imagen VIII
Refractómetro Abbe



Fotografía: Christian Farfán.

Anexo II
Imágenes Tamizaje Fitoquímico

Imagen I
Cromatografía de Cumarinas
Salviasanta



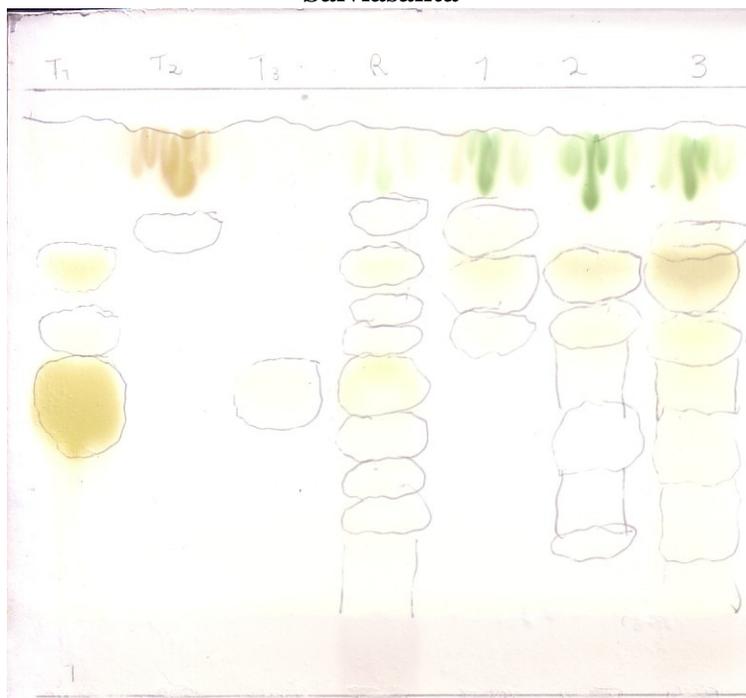
En la imagen se observa: E: Estandar de Cumarina al 1%, 1: LCHI.NAHU.02.05, 2: LCHI.CHIY.02.02, 3: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio.

Imagen II
Cromatografía en capa fina de Cumarinas
Salviasanta



En la imagen se observa: E: Estandar de Cumarina al 1%, 1: LCHI.NAHU.02.05, 2: LCHI.CHIY.02.02, 3: LCHI.CHAC.02.01. Revelador: KOH 5%. Longitud de onda: 365 nm. Fotografía: Aura Osorio.

Imagen III
Cromatografía de Flavonoides
Salviasanta



En la imagen se observa: E: Estandar de Cumarina al 1%, 1: LCHI.NAHU.02.05, 2: LCHI.CHIY.02.02, 3: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio.

Imagen IV
Prueba de Taninos
Salviasanta



En la imagen se puede observar: Tubo 1: testigo, Tubo 2: gelatina al 1%, Tubo 3: Gelatina – sal, Tubo 4: cloruro férrico al 10%.
Código del material vegetal: LCHI.NAHU.02.05. Fotografía: Aura Osorio

Imagen V

**Prueba de Taninos
Salviasanta**



En la imagen se puede observar: Tubo 1: testigo, Tubo 2: gelatina al 1%,
Tubo 3: Gelatina – sal, Tubo 4: cloruro férrico al 10%.
Código del material vegetal: LCHI.CHIY.02.02. Fotografía: Aura Osorio

**Imagen VI
Prueba de Taninos
Salviasanta**



En la imagen se puede observar: Tubo 1: testigo, Tubo 2: gelatina al 1%,
Tubo 3: Gelatina – sal, Tubo 4: cloruro férrico al 10%.
Código del material vegetal: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio

Imagen VII

**Prueba de Antraquinonas
Salviasanta**



En la imagen se observa: 1: LCHI.NAHU.02.05, 2: LCHI.CHIY.02.02,
3: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio.

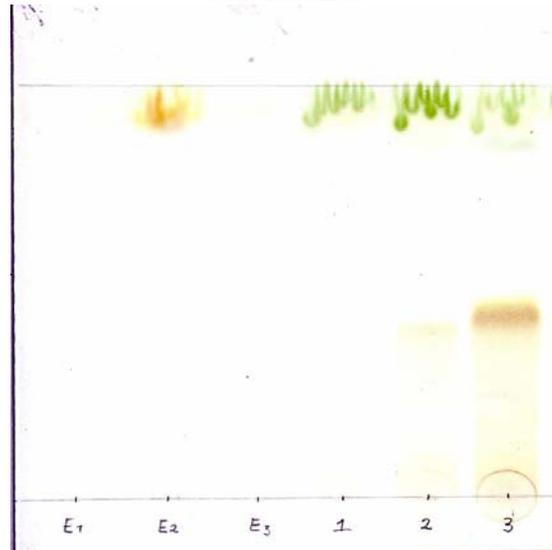
**Imagen VIII
Prueba Modificada de Antraquinonas
Salviasanta**



En la imagen se observa: 1: LCHI.NAHU.02.05, 2: LCHI.CHIY.02.02,
3: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio.

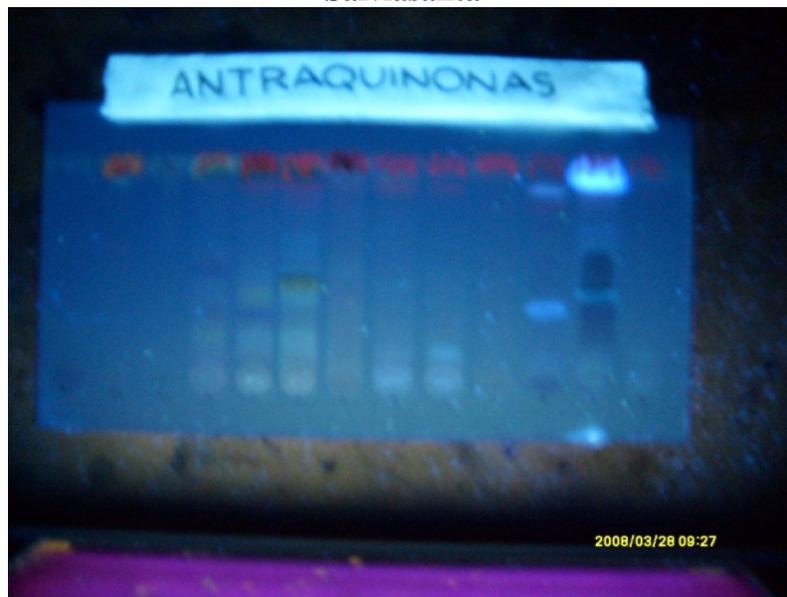
Imagen IX

**Cromatografía de Antraquinonas
Salviasanta**



En la imagen se observa: 1: LCHI.NAHU.02.05, 2: LCHI.CHIY.02.02,
3: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio.

**Imagen X
Cromatografía de Antraquinonas
Salviasanta**



En la imagen se observa: 1: LCHI.NAHU.02.05,
2: LCHI.CHIY.02.02, 3: LCHI.CHAC.02.01.
Revelador: KOH 5%. Longitud de onda: 365 nm. Fotografía: Aura Osorio.

Imagen XI

**Prueba de Alcaloides
Salviasanta**



En la imagen se puede observar: Tubo 1: testigo,
Tubo 2: Mayer's, Tubo 3: Dragendorff, Tubo 4: Wagner.
Código del material vegetal: LCHI.NAHU.02.05. Fotografía: Aura Osorio

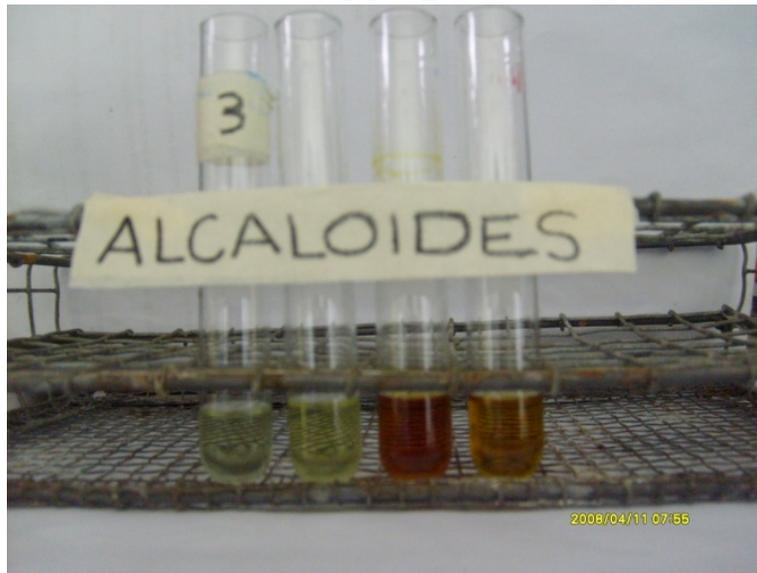
**Imagen XII
Prueba de Alcaloides
Salviasanta**



En la imagen se puede observar: Tubo 1: testigo,
Tubo 2: Mayer's, Tubo 3: Dragendorff, Tubo 4: Wagner.
Código del material vegetal: LCHI.CHIY.02.02. Fotografía: Aura Osorio

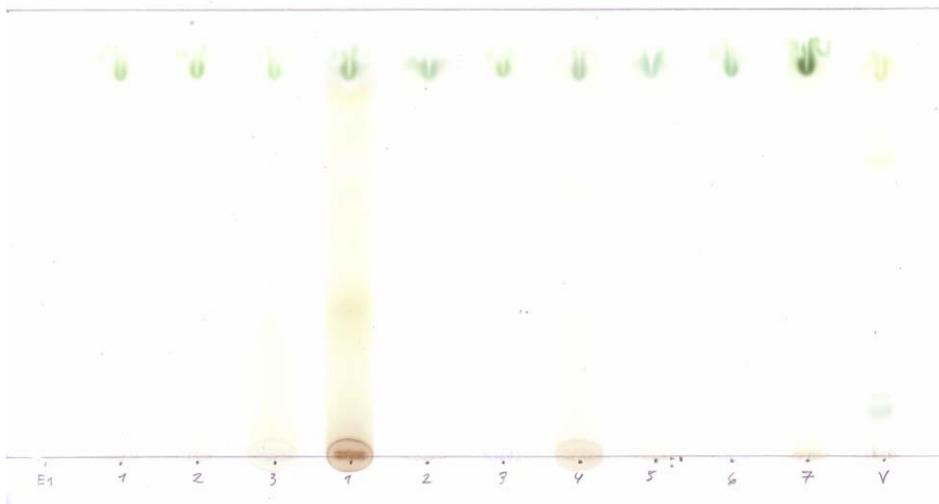
Imagen XIII

Prueba de Alcaloides Salviasanta



En la imagen se puede observar: Tubo 1: testigo,
Tubo 2: Mayer's, Tubo 3: Dragendorff, Tubo 4: Wagner.
Código del material vegetal: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio

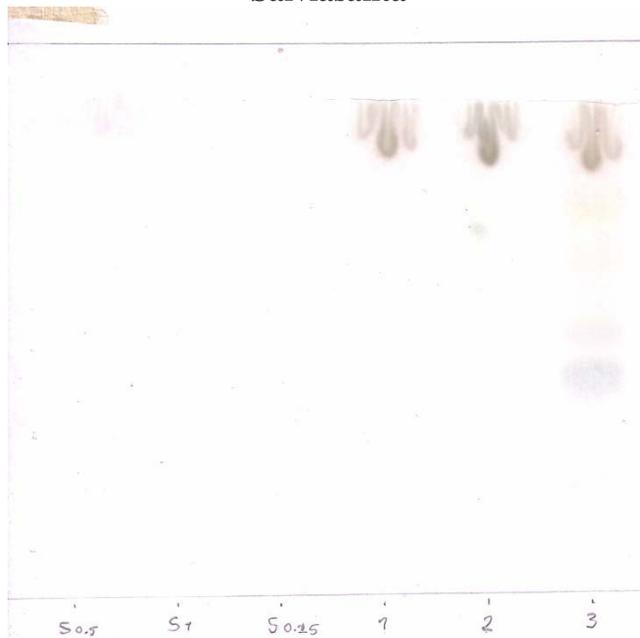
Imagen XIV Cromatografía de Alcaloides Salviasanta



En la imagen se observa: 1: LCHI.NAHU.02.05,
2: LCHI.CHIY.02.02, 3: LCHI.CHAC.02.01.
V = Vinca E1= Papaverina. Fotografía: Aura Osorio.

Imagen XV

Cromatografía de Saponinas Salviasanta



En la imagen se observa: 1: LCHI.NAHU.02.05,
2: LCHI.CHIY.02.02, 3: LCHI.CHAC.02.01. Fotografía: Aura Osorio.

Anexo III
Procedimientos de Operación Estandarizados
P.O.E's

I. Definición:

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y análisis por cromatografía en capa fina. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensible, reproducibles y de bajo costo.

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc) distribuido sobre una placa de vidrio o de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz Visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

R_f : factor de retención, es la medida de la migración de una sustancia determinada en un disolvente dado.

R_f: Distancia recorrida por la sustancia

Distancia recorrida por el disolvente

II. Objetivo:

Proporcionar instrucciones para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en las diferentes especies vegetales, empleando técnicas macro y semimicro y cromatografía en capa fina.

III. Responsable:

Es responsabilidad de la persona designada el cumplimiento de este PEO, este debe ser ejecutado de forma correcta para identificar los metabolitos secundarios presentes en una especie vegetal.

IV. Distribución:

Auxiliar de laboratorio.

Estudiantes.

V. Materiales y equipo necesarios:

Reactivos específicos para cada metabolito.

Disolventes orgánicos según el ensayo.

Ácidos y bases según el caso.

Cristalería (beakers, tubos de ensayo, erlenmeyer, micropipetas, pipetas, probetas).

Perillas de succión.

Papel filtro.

Baño María.

Cámaras cromatográficas.

Cromatofolios de aluminio de silica gel 60 F254 o placas de vidrio.

Micropipetas de 5 μ L o capilares.

Asperjador de vidrio.

Estufa.

Agitador magnético.

Estándares según el ensayo.

Lámpara de luz UV.

Regla.

VI. Procedimiento:

Investigación de alcaloides:

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

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

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

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

Tubo 4: testigo.

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

Preparación de Reactivos:

Mayer's (yoduro de mercurio y potasio)

- a. 1.36 g de HgCl_2 / 60 mL H_2O
- b. 5 g KI / 10 mL H_2O
- c. Mezclar y diluir a 100 mL.

Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)

- a. 8 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / 20 mL HNO_3
- b. 27.2 g KI / 50 mL H_2O
- c. Mezclar, reposar, decantar supernadante. Diluir a 100 mL.

Wagner (yodo-yoduro de potasio)

- a. 1.27 g I_2 + 2 g KI / 5 mL H_2O
- b. Diluir a 100 mL.

Cromatografía en capa fina: Pesar 1 g de material vegetal seco y molido, agregar 1 mL de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v) y extraer con 5 mL de metanol. Colocar en baño maría a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de silica gel 60 F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10 µL).

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

Detección:

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

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

Investigación de flavonoides y antocianinas:

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

Tubo 1: agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

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

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

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

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

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

Tubo 7: testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

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

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

Detección:

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

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

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

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

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

Investigación de antraquinonas:

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

Prueba de Bortränger modificado: Calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento y calentar 10 minutos en baño de maría a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10 mL de benceno. A la capa bencénica adicionar 5

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

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

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

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

Detección:

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

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento.

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

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

Investigación de cumarinas:

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

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

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7); tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 mL de tolueno y 50 mL de éter son mezclados durante 5 min con 50 mL de

ácido acético al 10%, se filtra y se descarta la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter es usada).

Detección:

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

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

Investigación de cardenólicos y bufadienólicos:

Presencia de lactonas insaturadas: Extraer 10 g de material vegetal con 30 mL de etanol o metanol al 80 por ciento y filtrar. Colocar tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 mL) sobre un papel filtro. Secar y agregar unas gotas del reactivo Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 por ciento.

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

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

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

Detección:

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

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

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

Investigación de esteroides o triterpenoides:

Reacciones de color

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

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

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

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

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

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

Investigación de saponinas:

Prueba de espuma:

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

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

Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo se le adiciona 10 mL de agua destilada. Calentar en baño de maría (60°C) durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 segundos. Dejar

reposar los tubos durante 30 minutos, observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

Cromatografía en capa fina: 2 g de material vegetal seco, se extraen con 10 mL de etanol al 70 por ciento con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5 mL y proceder a aplicar 25-40 μ L en una cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 μ L).

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

Detección:

Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

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

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

Investigación de principios amargos:

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

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

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

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

Investigación de taninos:

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

Tubo 1: testigo.

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

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

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

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

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

Investigación de glicósidos cianogénicos:

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

Investigación de aceites volátiles:

Cromatografía en capa fina:

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

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

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

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

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

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

Investigación de Esteroles insaturados:

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

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

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

Tubo 3: Testigo.

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

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

Investigación de Sesquiterpenlactonas:

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

Prueba de Baljet:

Preparación de reactivo:

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

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

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

Cromatografía en capa fina:

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

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

Investigación de Aceites grasos:

Examinar por cromatografía en capa fina, utilizando como sustancia de recubrimiento un gel de sílice

octadecilsililado adecuado para cromatografía en capa fina de alta resolución.

Disolución problema: Salvo indicación contraria, disolver aproximadamente 20 mg (1 gota) del aceite graso en 3 ml de *cloruro de metileno R*.

Disolución de referencia: Disolver aproximadamente 20 mg (1 gota) de *aceite de maíz R* en 3 ml de *cloruro de metileno R*.

Aplicar a la placa, por separado, 1 µl de cada disolución.

Procedimiento:

- Desarrollar dos veces hasta una distancia de 0,5 cm utilizando *éter R*.
- Desarrollar otras dos veces hasta una distancia de 8 cm utilizando una mezcla de 20 mL de *cloruro de metileno R*, 40 mL de *ácido acético glacial R* y 50 mL de *acetona R*.
- Dejar que la placa se seque al aire y pulverizar con una disolución de 100 g/L de *ácido fosfomolibdico R* en *etanol al 96 por ciento V/V R*.
- Calentar la placa a 120 °C durante aproximadamente 3 min y examinar a la luz del día.

Investigación de valepotriatos:

Extracción: Pesar 0.2 g de material vegetal seco y molido, agregar 5 mL de diclorometano a 60 °C en baño María por 5 minutos. Agitar y filtrar, lavar el residuo con diclorometano, mezclar y evaporar a sequedad. Al residuo agregar 2 mL de acetato de etilo.

Cromatografía en capa fina:

De la solución agregar 10 μ L a la cromatoplaça.

Fases móviles: Tolueno:acetato de etilo (75:25), n-hexano:metiletilcetona (80:20).

Detección: ácido clorhídrico y ácido acético, luz UV/VIS 254 nm, calentar a 100 °C (zonas azules indican la presencia de valtratos y acevaltratos, zonas cafés indican dihidrovaltratos).

Dinitrofenilhidrazina luz UV/VIS 254 nm (zonas verdes gris o azules, si hay calor excesivo, entonces zonas cafés-amarillas).

Referencias:

KUKLINSKI, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona. 515 p.

LOCK, O. (1994). Investigación Fitoquímica. 2ª. Ed. Fondo Editorial. Perú. 300 p.

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA (2002) 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 p.

SHARAPIN, N. (2000) Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247 p.

SANTA CRUZ, L. Manual: Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. 92 p.

VILA, R & REING, M. (2003). Métodos de Control de Calidad. Madaus, UB Virtual, Imicromat. 39 p.

WAGNER, H. *et al.* (1984). Plant Drug Analysis. Berlin, Springer-Verlang, 320 p.

WHO (1998) Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO. 115 p.