

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Estudio sobre los aceites esenciales y metabolitos secundarios en las especies *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenaceae”,

Odra Babette Lara Sandoval

QUÍMICA

Guatemala, agosto de 2009

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Estudio sobre los aceites esenciales y metabolitos secundarios en las especies *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenaceae”,

Proyecto de Investigación

Presentado por

ODRA BABETTE LARA SANDOVAL

Para optar al título de

QUÍMICA

Guatemala, agosto de 2009

Miembros de Junta Directiva

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón	Vocal I
Licda. Lilibian Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS: Por haberme dado la sabiduría para llegar hasta aquí.
- A MI MAMA: Nubia Sandoval por su amor, apoyo incondicional y por ser la fuente de motivación y deseos de superación. Sos la persona más importante en mi vida. Te quiero mucho.
- A MI PAPA: Efraín Pamal por su apoyo, consejos y cariño.
- A MI ABUELITA: Bertha Corzo por sus sabios consejos.
- A MI TIA: Dra. Vilma Sandoval por su cariño, interés y apoyo.
- A MIS HERMANAS: Andrea y Pamela por aguantarme mis berrinches y por ayudarme.
- A MIS AMIGOS: En especial a Ariel (Q.P.D), Claudia, Vicky, Mercedes, Brenda, Vivian, Sofía, Mafer, Mónica, Walda, Jorge, Diego y Cristian. Por su honestidad, por su buen sentido del humor y sobre todo por apoyarme en los momentos buenos y malos de mi vida.
- A MI NOVIO: Juan Pablo Camposeco por su motivación y apoyo de seguir adelante y sabes que ocupas un gran lugar en mi corazón.
- A LOS CATEDRÁTICOS: Especialmente a la Licda. Idolly Carranza, Lic. Jhony Alvarez, Lic. Pedro Jayes y Lic. Eduardo Robles por sus sabias enseñanzas y acertados consejos.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Plantas a Estudiar	2
2.1.1 <i>Lantana Camara</i>	2
2.1.2 <i>Lantana Hispida HBK</i>	3
2.1.3 <i>Lantana Trifolia L.</i>	4
2.2 Aceites Esenciales	5
2.2.1 Índice de Refracción de Aceites Esenciales	6
2.2.2 Actividad Biocida de Metabolitos Secundarios aislados y aceites esenciales	6
2.3 Metabolitos Secundarios	6
2.3.1 Alcaloides	7
2.3.2 Taninos	8
2.3.3 Flavonoides	9
2.3.4 Principios Amargos	11
2.3.5 Antraquinonas	11
2.3.6 Cumarinas	12
2.3.7 Saponinas	12

2.4	Espectrometría Ultra-Violeta	13
2.5	Índice de Refracción	14
3.	JUSTIFICACIÓN	15
4.	OBJETIVOS	16
4.1	Objetivo General	16
4.2	Objetivos Específicos	16
5.	HIPÓTESIS	17
6.	MATERIALES Y METODOS	18
6.1	Materiales	18
6.1.1	Equipo	18
6.1.2	Cristalería	18
6.1.3	Otros Materiales	19
6.1.4	Solventes	19
6.1.5	Reactivos para pruebas fitoquímicas	20
6.2	Métodos	23
6.2.1	Planta a Estudiar	23
6.2.2	Muestreo	23
6.2.3	Preparación de la Muestra	23
6.2.4	Determinación de la humedad	23

6.2.5 Determinación del contenido de cenizas	24
6.2.6 Tamizaje Fitoquímico	24
7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	25
8. RESULTADOS	27
8.1 Hidrodestilación de aceites esenciales	28
8.2 Tamizaje fitoquímico	30
9 . DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
9.1 Hidrodestilación de aceites esenciales	38
9.2 Tamizaje fitoquímico	39
10. CONCLUSIONES	43
11. RECOMENDACIONES	44
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
13. ANEXOS	47

1. RESUMEN

La presente investigación consiste en el estudio de los aceites esenciales y metabolitos secundarios de tres especies de plantas del género *Lantana*, como lo son: *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., las cuales pertenecen a la Familia Verbenaceae. Se realizaron colectas en el departamento de Quetzaltenango donde se colecto *Lantana camara* L., en Zacapa *Lantana hispida* HBK y en Quetzaltenango y en Zacapa *Lantana trifolia* L. Las colectas se realizaron el 30 de junio, 06 de julio y 02 de septiembre de 2008. Al material vegetal colectado se le realizo un estudio de los aceites esenciales, el cual consistió en la extracción del aceite a partir de material vegetal seco por hidrodestilación, utilizando un aparato tipo clevenger, a partir del cual se calculó el porcentaje de rendimiento. También se midió el índice de refracción del aceite.

A seis muestras (dos de cada especie) se les realizo el tamizaje fitoquímico de siete metabolitos principales, tales como: Antraquinonas, Flavonoides, Cumarinas, Principios Amargos, Alcaloides, Taninos y Saponinas. A las seis muestras se les realizaron pruebas a nivel macro (colorimétricas) y en cromatografía capa fina. Con los resultados obtenidos se puede determinar que ninguna de las tres especies estudiadas (*Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L.) son una fuente de aceites esenciales aceptable, por lo que se sugiere coleccionar una mayor cantidad de material vegetal, realizar más extracciones de los aceites, y realizar un estudio cuantitativo más profundo en lo que se refiere al tamizaje fitoquímico.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas a Estudiar

Las plantas a estudiar pertenecen al género *Lantana*, de la Familia Verbenaceae. La cual se caracteriza por contar con varios géneros que presentan rendimientos interesantes de aceite esencial. A continuación, se describen las plantas estudiadas, de las cuales no se contaba en Guatemala con la información fitoquímica básica.

2.1.1 *Lantana cámara* (ver imagen I anexo II)

Conocida también como "cinco negritos". Arbusto de 1 a 3 m de altura, de tallo espinoso, flores amarillas, anaranjadas o rojas en forma de pequeños manojos. Las hojas caducifolias, son simples, opuestas, pecioladas, ovadas a oblongas; base subcordada; acuminadas en el ápice; de borde dentado; ásperas y rugosas en el haz.

Las flores jóvenes son amarillas anaranjadas, tornándose rojizas cuando maduran. La corola es tubulosa, zigomorfa, ovario súpero binocular, inflorescencia capituliforme. Florece en primavera, verano y otoño. El fruto drupáceo esférico es negro brillante en la madurez y tiene de 5 mm de diámetro. Fructifica en verano y otoño. (Stevens, W. 2001)

La planta es originaria de América tropical, habita en los climas cálidos, semicálido y semiseco, desde el nivel del mar hasta los 1000 m y de los 2300 a los 3000 msnm. Presenta diferentes usos etnomédicos, siendo usado en El Salvador como antipirético, a partir de la cocción de flores y hojas con agua. Los frutos son tóxicos por contener lantadeno, un sesquiterpenoide. En Colombia, se usa la planta entera en forma de cocción para facilitar el parto, y como emenagogo. En Guatemala se le atribuyen propiedades curativas de heridas, úlceras y contusiones e infecciones de la piel. Se reporta también su uso en afecciones respiratorias como catarro y tos ferina, se usan solo las ramas en cocimiento. En Guatemala se encuentra desde nivel del mar hasta los 2200 msnm. Se reporta en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá, Zacapa (Standley, Steyermark, 1970)

En cuanto a su composición química, se ha reportado el triterpenoide lantadeno A como principio tóxico, asimismo se ha reportado la presencia de amarina,

lantamarona, lantadeno B, C, y D. Ácidos lantanílico, lantanólico y lantoico, oleanólico, verbascósido, ácidos botulínicos y butulónico, sitosterol, furanonaftaquinonas. Presenta aceite esencial, especialmente en las flores. Ha presentado hepatotoxicidad en ganado y animales de experimentación (Ross, 1999).

En estudios realizados en México, se ha encontrado actividad antibiótica por las hojas y el aceite esencial sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Sarcina lutea*, *Salmonella typhi* y los hongos *Aspergillus níger* y *A fumigatus*. El extracto etanólico de las ramas de la planta presentó efecto antibióticos contra *staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis*, habiendo resistencia en cuanto a *Eschericchia coli* y *Candida albicans*.

La planta es tóxica para el ganado. Se ha reportado actividad antimicrobiana de los extractos brutos de sus hojas (Cáceres *et. al.*, 1990). Se ha reportado también que las hojas presentan usos etnobotánicos para enfermedades gastrointestinales, del tracto respiratorio y enfermedades de piel y mucosas (Cáceres *et al*, 1990 a). Sin embargo, no se ha determinado a qué metabolitos corresponde la actividad encontrada, ya que los estudios solo han llegado a nivel de extracto, no habiéndose realizado con anterioridad, ensayos por bioautografía que permiten identificar el grupo de compuestos o el compuesto específico responsables de la actividad biológica. ¹

2.1.2 Lantana hispida HBK

Arbustos erectos, de 1-2 m de altura con ramas puberulentas a hispidas, hojas usualmente opuestas, raramente verticiladas, raramente subsésiles ovales o oblongas lanceoladas, de 1-9 cm de longitud (principalmente de 2-5 cm) bracteas lanceovaladas, corola blanca, crema, púrpura, o levemente rosadas. Frutos púrpura-negros, jugosos.

La planta crece en bosques de roble, pino-roble, o de pino, ocasionalmente en colinas secas y rocosas, entre los 300 a los 2700 msnm. Las dos formas más diversas de esta especie compleja son las plantas con hojas oblongas-lanceoladas, escabrosas a

¹ Pérez, F., Arriola, C., De León, J., Cáceres, A., Cruz, S., Oliva B., Jayes P.,(2008) Estudio Químico de los Aceites Esenciales y Metabolitos Secundarios de tres plantas del género *Lantana* (Verbanaceae). USAC, Guatemala

hispidulosas (1300-2700 msnm) y las que presentan hojas ovales anchas, siempre velutinosas tomentulosas (600-1900msnm). (Standley, P. Steyermark, 1970). Cáceres reporta que los extractos brutos presentan actividad contra levaduras (Cáceres *et al.*, 1990) y que sus hojas presentan usos etnobotánicos para enfermedades gastrointestinales, y enfermedades de piel y mucosas (Cáceres *et al.*, 1990 a). Al igual que con la *Lantana cámara*, solo se han realizado los ensayos de actividad biológica a nivel de extractos, por lo que no se conoce el metabolito responsable por dicha actividad.

2.1.3 *Lantana trifolia* L.

Se le encuentra normalmente en matorrales húmedos, en bosques de pino, raramente en terrenos claros. Crece desde el nivel del mar hasta los 1,200 msnm, en Alta Verapaz, Guatemala, Izabal (tipo Los Amates), Petén, El Quiché. Son arbustos erectos de hasta tres metros de altura, arbusto con 3 hojas en cada nudo; las hojas lanceoladas, con glándulas anaranjadas en la cara inferior, con espigas densas y cilíndricas, con las brácteas inferiores largamente puntiagudas; frutos maduros jugosos y de color lila o púrpura. Presenta generalmente 3 hojas en cada nudo o bien 2 opuestas, lanceoladas, de hasta 16 cm de largo y hasta 8.4 cm de ancho (frecuentemente más pequeñas), rugosas, puntiagudas, angostándose hacia la base, la cara inferior con pelillos finos y cortos, erectos o curvados, con glándulas anaranjadas. Sus flores poseen un cáliz poco evidente; la corola morada, rosada, lila, rosado-purpúrea, morada con centro amarillo, azul o a veces blanca o amarilla, es un tubo que hacia el ápice se amplía abruptamente y se divide en 4 o 5 lóbulos; presenta 4 estambres, dos de ellos más pequeños.

Es una planta común en muchos lugares de América Central, a menudo en bosques secundarios (Standley, P. Steyermark, 1970), (Stevens, W, 2001)

No se encontró información en la literatura sobre estudios realizados acerca de esta planta.²

² Pérez, F., Arriola, C., De León, J., Cáceres, A., Cruz, S., Oliva B., Jayes P.,(2008) Estudio Químico de los Aceites Esenciales y Metabolitos Secundarios de tres plantas del género *Lantana* (Verbanaceae). USAC, Guatemala

2.2 Aceites Esenciales

Son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Son intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles y poco densos. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire.

Las plantas elaboran los aceites esenciales con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores, atraer insectos benéficos que producen la polinización. Son característicos de las siguientes familias: Myrtaceae, Rutaceae, Apiales, Lamiaceae, Verbenaceae y Asteraceae.

Su principal uso es en perfumería, ya que son considerados productos químicos que forman las esencias odoríferas de un gran número de vegetales. También constituyen compuestos de partida para síntesis de otras sustancias útiles en las industrias química y farmacéutica. Pueden sintetizarse en forma artificial, que es la manera más habitual de obtenerlos, debido a que la gran demanda de estos productos no llega a ser abastecida por las fuentes naturales. En cambio, otros componentes de los aceites esenciales tienen propiedades farmacológicas y son usados como antibacterianos, analgésicos, sedantes, expectorantes, estimulantes y estomáquicos en la composición de medicamentos. (Trease y Evans, 1991)

En cuanto a las técnicas de extracción, las más conocidas son el arrastre con vapor de agua, la hidrodestilación y la extracción con solventes. Para propósitos analíticos es la hidrodestilación con aparato tipo clewenger la más utilizada (Pereira, *et al*, 2000), sin embargo, esta técnica provoca reacciones de oxidación en varios componentes del aceite esencial, debido a la presencia de agua y la alta temperatura, por lo que la composición del aceite se altera antes del análisis cromatográfico. Recientemente se ha utilizado la técnica de destilación-extracción por tres horas, utilizando el aparato de Likens-Nickerson, para la extracción del aceite con fines puramente analíticos (Pereira *et al.*, 2003). Además, se ha utilizado la técnica de Microextracción en Fase Sólida, que permite las sustancias volátiles a partir del material vegetal fresco y su inyección inmediata en el cromatógrafo de gases, lo cual evita el uso de solventes y permite un

análisis más inmediato de la composición del aceite esencial estudiado.³

2.2.1 Índice de refracción de aceites esenciales

Se determinará el índice de refracción de los aceites esenciales obtenidos, para la clasificación de los mismos y con esto poder evaluar las diferencias entre ellos. Para la realización de esto se utilizará un refractómetro (tipo Abbe), el cual al encenderlo hay que esperar quince minutos para que el aparato se estabilice. Colocar una gota del aceite esencial, en el portamuestras. Cerrar el portamuestras. Realiza la medición en la escala del aparato. Limpiar el aparato.

2.2.2 Actividad biocida de metabolitos secundarios aislados y aceites esenciales

Someter a una cromatografía en capa fina, los aceites esenciales y metabolitos secundarios aislados a partir de la cromatografía Flash, utilizando CHCl₃:tolueno en diferentes proporciones. De cada cromatoplaaca desarrollada, cortar una tira lateral para revelar y localizar la ubicación de los metabolitos separados en el resto de la cromatoplaaca.

2.3 Metabolitos Secundarios

Se llaman así, a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. (Trease y Evans, 1991)

El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria. De hecho, el estudio de los metabolitos secundarios de las plantas estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopía para dilucidar su estructura, y metodologías de síntesis que hoy constituyen la fundación de la química orgánica contemporánea.

³ Pérez, F., Arriola, C., De León, J., Cáceres, A., Cruz, S., Oliva B., Jayes P.,(2008) Estudio Químico de los Aceites Esenciales y Metabolitos Secundarios de tres plantas del género *Lantana* (Verbanaceae). USAC, Guatemala

En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas (Trease y Evans 1991). El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, la creciente apreciación de los altamente diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas. Los Principales metabolitos secundarios a estudiar en esta investigación son los siguientes:

2.3.1 Alcaloides

Los alrededor de 12.000 alcaloides que se conocen , es un compuesto químico que posee un nitrógeno heterocíclico biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cafeína, cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estricnina. (Trease y Evans, 1991)

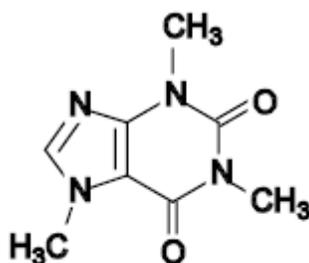


Figura I. Estructura química de la Cafeína

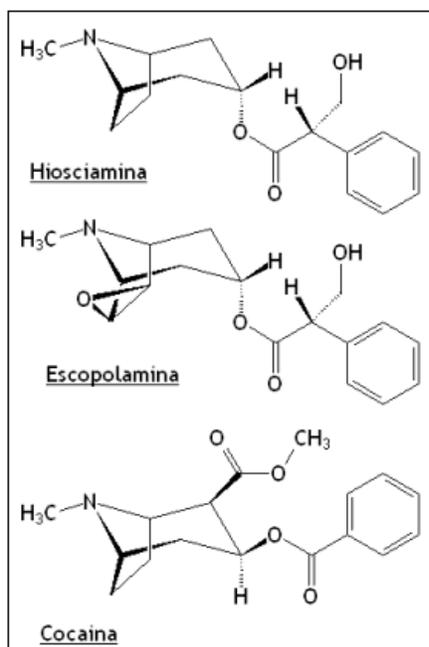


Figura II. Ejemplos de diferentes estructuras químicas de alcaloides

2.3.2 Taninos

Son sustancias de origen vegetal carentes de nitrógeno en su molécula y solubles parcialmente en agua y en alcohol, cuya característica más evidente es su capacidad para desnaturizar las proteínas provocando al entrar en contacto con ellas coagulación y consiguiente precipitación. Esta propiedad se traduce farmacológicamente en un efecto astringente, antiinflamatorio y hemostático. Los taninos están ampliamente repartidos entre las plantas, y parece ser que juegan un papel disuasorio para insectos y herbívoros, ya que dotan de sabor desagradable a las partes de la planta que los contienen. También son muy frecuentes en los frutos inmaduros, siendo los responsables del sabor astringente y desagradable de estos. Como ejemplos de plantas ricas en taninos cabe mencionar a la Salicaria (*Lythrum salicaria*) y las agallas del rebollo (*Quercus faginea*). (Bruneton, 1993)

La fórmula C₁₄H₁₄O₁₁, considerada en algunos libros como la del *tanino común*, es sólo aproximada, ya que son polímeros complejos. Hay dos categorías de taninos, clasificados en base a su vía de biosíntesis y sus propiedades químicas: los taninos condensados y los taninos hidrolizables.

- Los taninos condensados (a veces también llamados proantocianidinas) son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina. Es común encontrarlos en la madera de las plantas leñosas.
- Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico, y azúcares simples. Son más pequeños que los taninos condensados y son hidrolizados con más facilidad, sólo basta ácido diluido para lograrlo. La mayoría tiene una masa molecular entre 600 y 3.000.

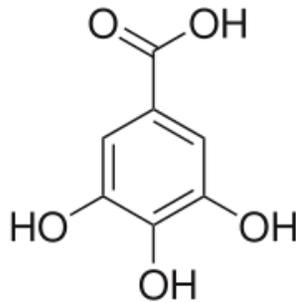


Figura III. Estructura química de ácido gálico

2.3.3 Flavonoides

Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. Los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados. También el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides o el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides.

Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del Sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo. Una

función importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores. (Bruneton, 1993).

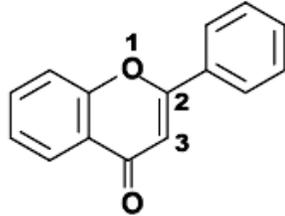


Figura IV. Estructura química 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los flavonoides

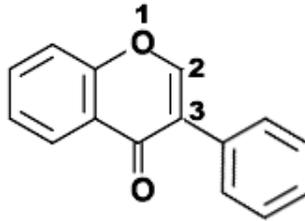


Figura V. Estructura química de la 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona), esqueleto de los isoflavonoides.

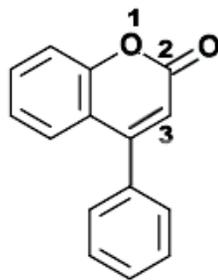


Figura VI. Estructura química de la 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirona), esqueleto de los neoflavonoides

2.3.4 Principios Amargos

Compuestos químicamente heterogéneos, aunque suelen presentar un anillo lactónico, pero con la propiedad común de tener un sabor amargo. Esta característica organoléptica es precisamente lo que los hace útiles farmacológicamente ya que produce un aumento de la secreción gástrica y una estimulación del apetito (deben tomarse media hora antes de las comidas). En muchos casos, también tienen una acción colerética y colagoga. Un buen amargo de la medicina popular es la centáurea o hiel de tierra (*Centaurium umbellatum*) y también la corteza de naranja amarga (*Citrus aurantium*). (Trease y Evans, 1991)

2.3.5 Antraquinonas

Es un polvo cristalino amarillento o de un color que varía del gris claro al gris verdusco. Es insoluble en agua y alcohol, pero se disuelve fácilmente en nitrobenzeno y anilina. Químicamente es bastante estable en condiciones normales.

La antraquinona se encuentra en forma natural en algunas plantas (Ruibarbo, Espino Cerval y el género *Áloe*), hongos, líquenes e insectos, donde sirve como esqueleto básico para sus pigmentos.

Los derivados naturales de la antraquinona son glucósidos con acción laxante y purgante sumamente potente. En la terapéutica farmacológica, la antraquinona pertenece a la categoría de catárticos y se usan en la terapia contra el estreñimiento. Se encuentran en las hojas, vainas, raíces y semillas de diversas plantas como el sen, el ruibarbo y la frángula. (Bruneton, 1993).

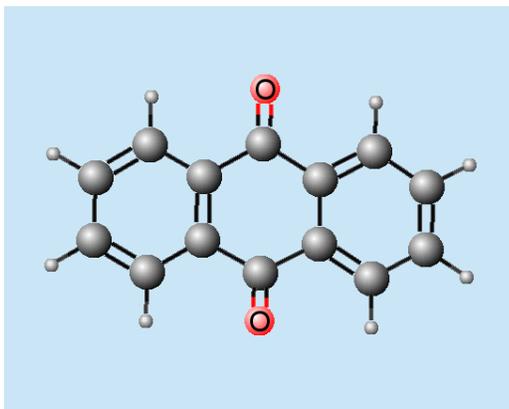


Figura VII. Estructura molecular de la Antraquinona

2.3.6 Cumarinas

Las cumarinas se consideran todo un grupo de metabolitos secundarios fenólicos de las plantas, que comparten la misma vía biosintética y esqueleto químico. En las plantas, se encuentran en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas, y tallos, aunque la mayor concentración se encuentra en general en frutos y flores. Originalmente la cumarina se aisló de la Haba de Tonka. Su rol en las plantas parece ser de defensa, dándole propiedades de rechazo a la alimentación (en inglés *antifeedant*), antimicrobiana, captadora de radiación UV e inhibidora de la germinación. (Trease y Evans, 1991)

La mejor propiedad conocida de las cumarinas indirectamente demuestra su rol en la defensa de las plantas. La ingesta de cumarinas de plantas como el trébol puede causar hemorragias internas en mamíferos.

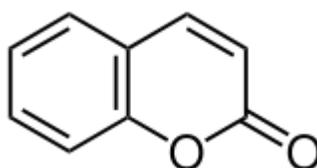


Figura VIII. Estructura química de la Cumarina

2.3.7 Saponinas

Las saponinas son glicósidos derivados de las plantas. Se caracterizan por producir espuma cuando se mezclan con el agua, por eso son consideradas jabones naturales. La *Saponaria officinalis* ha sido usada desde tiempos inmemoriales como detergente. A nivel gástrico contribuyen a disminuir la absorción en el tubo digestivo por lo que se usan en procesos dietéticos, sin embargo, al ser consumidas en dosis altas se convierten en sustancias tóxicas, ya que producen hemólisis.

La hiedra, el rusco, el espárrago y la zarzaparrilla son ejemplo de plantas que poseen saponinas. (Trease y Evans, 1991).

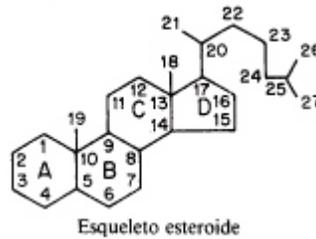


Figura IX. Estructura química de saponina esteroideal

2.4 Espectrometría Ultravioleta-visible

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm.

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados. Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV, como es el caso del β -caroteno.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absorptividad molar, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente).

Esta técnica es útil para el análisis de algunos metabolitos secundarios. (Skoog, Holler, Nieman, 2001)

2.5 Índice de Refracción

El índice de refracción es una propiedad física de los aceites esenciales utilizada para el control de pureza, ya que los aceites esenciales de variedades o especies vegetales, presentan índices de refracción (indicador del grado de refracción de la luz polarizada), característicos. Es la relación que existe 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 examen. Esta se mantiene a una temperatura constante y determinada. Según el aparato utilizado, en este caso el refractómetro, el método se basa en la medida directa del ángulo de refracción; o bien, en la observación del límite de reflexión total, manteniendo la sustancia dentro de condiciones de isotropismo y transparencia. El refractómetro permite la lectura directa del índice de refracción entre 1.3000 y 1.7000 con una precisión de 0.0002. . El procedimiento que se sigue es el siguiente: Encender el refractómetro (tipo Abbe), y esperar por quince minutos a que se estabilice. Colocar una gota del aceite esencial, en el portamuestras. Cerrar el portamuestras. Realiza la medición en la escala del aparato. Limpiar el aparato.

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas a estudiar de la familia Verbenaceae, género *Lantana*, especies: *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., son plantas nativas que se utilizan en medicina popular. Actualmente existe información obtenida en otros países, sobre la composición química de una de las plantas propuestas (*Lantana camara*), sin embargo, dicha información no puede considerarse válida para Guatemala, en vista que las variaciones en el clima generan diferenciación en los metabolitos secundarios producidos. En Guatemala se ha determinado únicamente la actividad biocida de dos de las plantas a estudiar (*Lantana camara* y *Lantana hispida*), a nivel de extractos, por lo cual no se tiene conocimiento sobre que metabolito o grupo de metabolitos son los responsables de esa actividad, lo cual no permite la generación de valor agregado para estas plantas. De la tercera planta, *Lantana trifolia*, no se encontró información en la literatura sobre estudios sobre su composición química.⁴ Es debido a ello que se justifica la realización de esta investigación; el contar con información química respecto a los aceites esenciales y sus índices de refracción, y los grupos de metabolitos secundarios más importantes presentes en estas plantas; servirá para el desarrollo de investigaciones futuras con un grado de especificidad mayor acerca de otros componentes de las plantas; y a la vez se espera que ayude en gran manera al desarrollo económico de diferentes regiones en Guatemala, a partir del aprovechamiento económico de las plantas de estudio, que podría generar mayores oportunidades de trabajo y a su vez llegar a mejorar la calidad de vida de sus habitantes. Por otra parte, también se contribuye a los objetivos de la escuela de Química y al Laboratorio de investigación de Productos Naturales –LIPRONAT- en la obtención de información útil en relación con *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., la cual está siendo investigada por primera vez en Guatemala a nivel químico.

⁴ Pérez, F., Arriola, C., De León, J., Cáceres, A., Cruz, S., Oliva B., Jayes P.,(2008) Estudio Químico de los Aceites Esenciales y Metabolitos Secundarios de tres plantas del género *Lantana* (Verbanaceae). USAC, Guatemala

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el rendimiento y caracterizar los aceites esenciales y la presencia de metabolitos secundarios de las plantas *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenaceae.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar los principales metabolitos secundarios (alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, principios amargos, saponinas y Taninos) en las hojas de las especies de *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenacea.
- 2) Determinar el rendimiento de los aceites esenciales provenientes de las especies de *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenacea por el método de hidrodestilación con aparato tipo Clevenger .
- 3) Determinar el contenido de cenizas de muestreas de plantas de las especies de *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenacea por el método de hidrodestilación con aparato tipo Clevenger .

5. Hipótesis

Debido a la naturaleza descriptiva de la parte del proyecto a desarrollar, no se contempla hipótesis alguna

6. Materiales y Métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Equipo

- Hidrodestilador Clevenger
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Horno de convección
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Mufla
- Rotavapor
- Estufa
- Tamiz 5 Mesh
- Refractómetro
- Refrigeradora
- Campana de extracción
- Campana de flujo laminar
- Baño ultrasónico
- Baño maría

6.1.2 Cristalería

- Cápsulas de porcelana
- Crisoles de porcelana
- Embudos de vidrio
- Viales ámbar de 4 ml
- Viales transparentes de 20 ml
- Balones de fondo redondo 150 ml y 250 ml (para hidrodestilación)
- Balones de fondo redondo 1 L y 2L (para hidrodestilación)
- Micropipetas
- Micropipetas de 5 microlitros
- Balones aforados de 100 ml y 250 ml
- Beakers de 100 ml y 250 ml
- Probetas de 10 ml, 25 ml, 50 ml y 100 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)

6.1.3 Otros Materiales

- Percolador
- Bulbos para micropipetas

- Gradillas

- Rejillas

- Papel filtro

- Cromatoplasmas

- Espátulas de metal y plástico

- Papel Mayordomo

6.1.4 Solventes

- n-Pentano

- n-hexano

- Metanol

- Acetato de Etilo

- Cloroformo

- Acetona

- Etanol

- Tolueno

6.1.5 Reactivos para pruebas fitoquímicas

6.1.5.1 Alcaloides:

- Hidróxido de amonio 10 % p/v
- Ácido Clorhídrico 2 N
- Reactivo de 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.
- Reactivo de 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.
- Reactivo de Wagner ((yodo-yoduro de potasio)
 - a. 1.27 g I_2 + 2 g KI / 5 mL H_2O
 - b. Diluir a 100 mL.
- Solución de atropina y papaverina al 1%

6.1.5.2 Taninos

- Etanol al 80%
- Cloruro de Sodio al 10%
- Solución de gelatina al 1% p/v
- Solución de gelatina-sal (1% de gelatina y cloruro de sodio al 10%)
- Cloruro Férrico al 10% p/v

6.1.5.2 Fenoles (flavonoides)

- Etanol al 80%
- Éter de petróleo
- Metanol al 80%
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Cloruro Férrico al 10% p/v
- Ácido Clorhídrico concentrado
- Magnesio Metálico
- Ácido Bórico
- Anhídrido Acético
- n-butanol
- Ácido Acético
- Acetato de Etilo
- Ácido Fórmico
- Solución Metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP)
- Solución Etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG)
- Amoniaco

6.1.5.3 Principios Amargos

- Metanol
- Acetato de etilo
- Cloroformo
- Vainilina-ácido sulfúrico
- Anisaldehído-ácido sulfúrico

- Reactivo de Liebermann-Buchard

6.1.5.4 Antraquinonas

- Etanol al 80%

- Benceno

- Solución de prueba de amonio

- Peróxido de Hidrógeno

- Ácido acético glacial

6.1.5.5 Cumarinas

- Hidróxido de Potasio 0.5 N

- Metanol

- Umbeliferona

- Ácido p-cumárico

- Tolueno

- Ácido Acético 10 %

- Éter

- Solución Etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 %.

6.1.5.6 Saponinas

- Etanol al 70%

- Cloroformo

- Metanol

- n-butanol

- Ácido Acético

- Reactivo de Liebermann-Burchard
- Reactivo de Komarowsky
- Vainilina-ácido sulfúrico
- Anisaldehído-ácido sulfúrico

6.2 Métodos

6.2.1 Planta a estudiar

Tres especies del género *Lantana*, de la familia Verbenaceae : *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L.

6.2.2 Muestreo

Los viajes de campo se realizaron a diferentes sitios pertenecientes a los departamentos de Alta Verapaz, Guatemala y Quetzaltenango; con el propósito de llevar a cabo la colecta del material vegetal (hojas) de las tres especies del género *Lantana*, de la familia Verbenaceae. Se realizó tres colectas por cada especie en sitios diferentes de una forma bimensual (Abril-Mayo, Junio-Julio, Agosto-Septiembre).

Cada muestra colectada fue identificada con el nombre del sitio donde fue colectada, fecha de la recolección y número de especie. Se recolectaron entre 150-200 gramos del material vegetal fresco (hojas).

6.2.3 Preparación de la muestra

Una vez recolectado el material vegetal (hojas), éstas se mezclan y se dejan secar en sombra a temperatura ambiente. Se debe de dejar una fracción considerable para realizar la determinación del porcentaje de humedad y el contenido de cenizas. El material vegetal ya seco se debe tamizar y posteriormente pulverizarlo.

6.2.4 Determinación de humedad

Pesar 10.00 g de material vegetal húmedo en una balanza analítica y colocarlo en una cápsula de porcelana y dejarla en el horno de convección a 95°C por 20 h. Enfriar la cápsula a temperatura ambiente y pesarla. Determinar el porcentaje de humedad por diferencia de peso con el peso original.

6.2.5 Determinación de contenido de cenizas:

Pesar 4.00g de material vegetal húmedo en una balanza analítica utilizando un crisol de porcelana. Posteriormente a ello, calcinar la muestra en una mufla a 550°C por 14 horas, o hasta obtener cenizas blancas. Después de la calcinación pesar las cenizas en una balanza analítica. Se obtiene el contenido de cenizas relacionando el peso de las cenizas con el peso de la muestra original.

6.2.6 Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación con aparato tipo Clevenger

Pesar aproximadamente 45-50 g de material vegetal seco en un balón de 1000 ml; agregar agua destilada hasta la mitad (500 ml) del balón. Colocarle una manta y posteriormente se conecta al aparato de extracción. Destilar el aceite esencial por 3 h, contadas a partir de la hora en que se inicia la destilación. Apagar el aparato y coleccionar el aceite con n-pentano y concentrar en rotavapor. Medir el volumen de aceite obtenido y almacenarlo en refrigeradora.

6.2.7 Tamizaje fitoquímico

Se realizaran pruebas de tamizaje fitoquímico en las especies de *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L. Las pruebas se llevarán a cabo de acuerdo con el Manual de Operaciones de Tamizaje Fitoquímico del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT- (ver Anexo II). Los metabolitos a estudiar son: alcaloides, taninos, principios amargos, antraquinonas, cumarinas, saponinas y flavonoides.

7. Cronograma de Actividades

Actividad	Abril `08	Mayo `08	Junio `08	Julio `08	Agosto `08	Septiembre `08	Octubre 08	Noviembre 08
Recopilación de Información	X							
Implemen- tación de Métodos Analíticos	X	X						
Preparación Material de Muestreo	X	X	X	X	X			
Colectas Material Vegetal	X	X	X	X	X	X		
Análisis Químicos	X	X	X	X	X	X		
Análisis Biocidas						X		
Análisis de Resultados							X	
Elaboración Reporte Final								X
Total de Horas Laboratorio*	80	80	80	80	80	80	80	

Número de Colectas *	2	2	2	2	2	2	2	
Total Horas de Colecta **	96	96	96	96	96	96	96	
Total Horas de Trabajo Por mes	176	176	176	176	176	176	176	

Total de horas 1,232 hrs.

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.

8. RESULTADOS

8.1 Hidrodestilación de aceites esenciales

Tabla I
Ubicación

Código Muestra	Sub Muestra	Muestra	Localidad	Ubicación Satelital	Elevación (msnm)	Fecha de Colecta
LCAM.SNFE.01.01	A	<i>Lantana camara</i>	San Felipe	N 14º 37.373' W 91º 35.771'	620.12 msnm	06.07.08
LCAM.ZUNI.01.01	A	<i>Lantana camara</i>	Zunil	N 14º 46.748' W 91º 29.791'	2085.98 msnm	06.07.08
LCAM.ZUNI.01.01	B	<i>Lantana camara</i>	Zunil	N 14º 46.748' W 91º 29.791'	2085.98 msnm	06.07.08
LCAM.ZUNI.01.04	A	<i>Lantana camara</i>	Zunil	N 14º 46.748' W 91º 29.791'	2085.98 msnm	06.07.08
LHIS.SNJO.01.03	A	<i>Lantana hispida</i>	San José	N 14º 59.043' W 89º 41.677'	248.48 msnm	30.06.08
LHIS.SNJO.01.03	B	<i>Lantana hispida</i>	San José	N 14º 59.043' W 89º 41.677'	248.48 msnm	30.06.08
LHIS.KM93.01.01	A	<i>Lantana hispida</i>	San Cristóbal	N 14º 55.305' W 89º 56.413'	277.74 msnm	30.06.08
LHIS.KM93.01.01	B	<i>Lantana hispida</i>	San Cristóbal	N 14º 59.043' W 89º 41.677'	248.48 msnm	30.06.08
LHIS.KM93.01.02	A	<i>Lantana hispida</i>	San Cristóbal	N 14º 55.305' W 89º 56.413'	277.74 msnm	30.06.08
LHIS.KM93.01.02	B	<i>Lantana hispida</i>	San Cristóbal	N 14º 55.305' W 89º 56.413'	277.74 msnm	30.06.08
LHIS.KM93.01.02	C	<i>Lantana hispida</i>	San Cristóbal	N 14º 55.305' W 89º 56.413'	277.74 msnm	30.06.08
LHIS.KM93.01.03	A	<i>Lantana hispida</i>	San Cristóbal	N 14º 55.341' W 89º 56.480'	295.73 msnm	30.06.08
LHIS.PACA.01.01	A	<i>Lantana hispida</i>	Volcán Pacaya			01.05.08

LTRI.AMAT.01.03	A	<i>Lantana trifolia</i>	Los Amates	N 15° 13.788' W 89° 07.623'	97.87 msnm	02.09.08
LTRI.AMAT.01.03	B	<i>Lantana trifolia</i>	Los Amates	N 15° 13.788' W 89° 07.623'	97.87 msnm	02.09.08
LTRI.AMAT.01.03	C	<i>Lantana trifolia</i>	Los Amates	N 15° 13.759' W 89° 07.623'	98.48 msnm	02.09.08

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 de las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.* con aparato tipo Clevenger
Primera Colecta

MUESTRA	Submx	Masa Material vegetal (g)	Masa del aceite (g)	% de rendimiento
LCAM.ZUNI.01.01	A	25.0	0.0217	0.09
LCAM.ZUNI.01.01	B	20.0	0.0181	0.09
LHIS.SNJO.01.03	A	25.0	0.1171	0.47
LHIS.SNJO.01.03	B	20.0	0.0651	0.33
LHIS.KM93.01.01	B	15.0	0.0516	0.34
LHIS.KM93.01.02	A	30.0	0.179	0.60
LHIS.KM93.01.02	B	27.3	0.1765	0.65
LHIS.KM93.01.02	C	30.0	0.1389	0.46
LHIS.PACA.01.01	A	9.8	0.0089	0.09
LTRI.AMAT.01.03	A	25.0	0.0325	0.13
LTRI.AMAT.01.03	B	25.0	0.0066	0.03
LTRI.AMAT.01.03	C	25.0	0.1278	0.51

Fuente: Datos experimentales

Tabla III
Análisis estadístico de aceites esenciales de las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

Muestra	n	Promedio	Desviación estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>Lantana camara L.</i>	2	0.09	0	0	0
<i>Lantana hispida HBK.</i>	7	0.42	0.1883	0.09	0.65
<i>Lantana trifolia L.</i>	3	0.223	0.2532	0.03	0.13

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
Análisis estadístico general de aceites esenciales de las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

Muestra	n	Promedio	Desviación estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
<i>Lantana camara L.</i> , <i>Lantana Hispida HBK</i> , <i>Lantana trifolia L.</i>	12	0.3	0.22	0.03	0.65

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

8.2 Tamizaje Fitoquímico

Tabla V
Clave de las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	Localidad	Fecha de Colecta
1	Lcam.zuni.01.01	Zunil	06.07.08
2	Lcam.zuni.01.04	Zunil	06.07.08
3	Ltriamat.01.03	Los Amates	02.09.08
4	Lhis.snjo.01.03	San Jose	30.06.08
5	Ltriamt.01.03	Los Amates	02.09.08
6	LHiskm93.01.01	San Cristóbal	30.06.08

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

Tabla VI
Porcentaje de humedad de las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. muestra	Muestra	Peso (g)	Porcentaje de Humedad
1	Lcam.zuni.01.01	0.5	14.55
2	Lcam.zumi.01.04	0.5	13.80
3	Ltri1.01.01	0.5	14.75
4	Lhis.snfe.01.01	0.5	14.01
5	Ltri3.01.03	0.5	13.08
6	LHis.km93½.01.01	0.5	14.80

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

Tabla VII
Presencia de alcaloides
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	Reactivo Mayer's	Reactivo Dragendorff	Reactivo Wagner
1	Lcam.zuni.01.01	-	-	+ Marrón
2	Lcam.zumi.01.04	-	-	-
3	Ltri1.01.01	-	-	+ Marrón
4	LHis.snfe.01.01	-	-	+ Marrón
5	Ltri3.01.03	-	+ (naranja)	+ Marrón
6	LHis.km93½.01.01	-	+ (naranja)	+ Marrón

Fuente: Datos Experimentales.

Reactivo Mayer's cambio de color blanco a crema (+)

Reactivo Dragendorff cambio de color rojo a naranja (+)

Reactivo Wagner cambio de color marrón (+). Ver imágenes I, II y III, anexos III

Tabla VIII
Cromatografía en Capa Fina de Alcaloides
de las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	No. De bandas	Rf	Color de la banda
1	Lcam.zuni.01.01	2	0.50, 0.68	Naranja, naranja
2	Lcam.zumi.01.04	2	0.38, 0.55	Naranja, naranja
3	Ltri1.01.01	2	0.33, 0.38	Naranja, naranja
4	LHis.snfe.01.01	3	0.23, 0.30, 0.37	Naranja, naranja, naranja
5	Ltri3.01.03	3	0.23, 0.32, 0.42	Naranja, naranja, naranja
6	LHis.km93½.01.01	2	0.28, 0.42	Naranja, naranja
	Papaverina	1	0.28	Naranja
	Atropina	1	0.08	Naranja
	Reserpina	1	0.22	Naranja

Fuente: datos experimentales. Fase móvil: tolueno, acetato de etilo, dietilamina (70:20:10). Revelador utilizado: Reactivo de Dragendorff

Tabla IX
Presencia de Flavonoides y antocianinas
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	Acido sulfúrico	Cloruro Férrico al 10%	Ácido clorhídrico	Magnesio + ácido clorhídrico	Hidróxido de sodio
1	Lcam.zuni.01.01	-	-	-	-	-
2	Lcam.zumi.01.04	-	-	-	-	-
3	Ltri1.01.01	-	-	-	-	-
4	LHis.snfe.01.01	-	-	-	-	-
5	Ltri3.01.03	-	-	-	-	-
6	LHis.km93½.01.01	-	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales. Cuando se produce cambio de coloración y/o formación de precipitado comparados con el testigo es positivo (+). Se puede observar que en ninguna de las pruebas realizadas a las muestras hay presencia de flavonoides(-). Ver imágenes IV, V y VI, anexos III

Tabla X
Cromatografía en capa fina Flavonoides y antocianinas
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	No. de bandas	Rf	Color de la banda
1	Lcam.zuni.01.01	2	0.50, 0.68	Naranja, naranja
2	Lcam.zumi.01.04	2	0.38, 0.55	Naranja, naranja
3	Ltri1.01.01	2	0.33, 0.38	Naranja, naranja
4	LHis.snfe.01.01	3	0.23, 0.30, 0.37	Naranja, naranja, naranja
5	Ltri3.01.03	3	0.23, 0.32, 0.42	Naranja, naranja, naranja
6	LHis.km93½.01.01	2	0.28, 0.42	Naranja, naranja
	Estándar de Flavonoides	1	0.09,0.22,0.28	Naranja

Fuente: Datos Experimentales. Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50)
 Reactivo Revelador: Productos naturales (NP/PEG). Ver imagen VII, anexos III

Tabla XI
Presencia de Antraquinonas
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	Bornträger	Bornträger modificado
1	Lcam.zuni.01.01	-	-
2	Lcam.zumi.01.04	-	-
3	Ltri1.01.01	-	-
4	LHis.snfe.01.01	-	-
5	Ltri3.01.03	-	-
6	LHis.km93½.01.01	-	-

Fuente: datos Experimentales Prueba de Bornträger cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: +). Prueba de Bornträger modificado cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: +). Ver imágenes VII y VIII anexos III

Tabla XII
Presencia de Cumarinas
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	Reactivo (KOH)	Observación
1	Lcam.zuni.01.01	-	No se observó fluorescencia azul o verde, bajo luz UV de 365 nm
2	Lcam.zumi.01.04	-	
3	Ltri1.01.01	-	
4	LHis.snfe.01.01	-	
5	Ltri3.01.03	-	
6	LHis.km93½.01.01	-	

Fuente: Datos Experimentales

Tabla XIII
Cromatografía en capa fina Cumarinas
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	No. De bandas	Rf	Color de la banda
1	Lcam.zuni.01.01	0	0	
2	Lcam.zumi.01.04	0	0	
3	Ltri1.01.01	0	0	
4	LHis.snfe.01.01	0	0	
5	Ltri3.01.03	0	0	
6	LHis.km93½.01.01	0	0	
	Ácido p-cumarico	1	0.07	Verde
	Umbelliferona	1	0.07	Verde
	cumarinas	1	0.34	Verde

Fuente: Datos Experimentales. Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7)
 Revelador: solución etanólica de hidróxido de potasio al 5%. Ver imagen X, anexos III

Tabla XIV
Presencia de Saponinas (test de espuma)
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	Reactivo (KOH)	Observación
1	Lcam.zuni.01.01	+	Se observó formación de espuma
2	Lcam.zumi.01.04	+	
3	Ltri1.01.01	+	
4	LHis.snfe.01.01	+	
5	Ltri3.01.03	+	
6	LHis.km93½.01.01	+	
	Estándar de saponinas	+++	

Fuente: Datos Experimentales.

+ poca formación de espuma

+++ abundante formación 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. Ver imágenes XI y XII, anexos III.

Tabla XV
Cromatografía capa fina Saponinas
en las plantas *Lantana cámara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana Trifolia L.*

No. Muestra	Muestra	No. de bandas	Rf	Color de la banda
1	Lcam.zuni.01.01	1	0.97	Violeta
2	Lcam.zumi.01.04	1	0.94	Violeta
3	Ltri1.01.01	1	0.94	Violeta
4	LHis.snfe.01.01	2	0.96	Violeta
5	Ltri3.01.03	2	0.96	Amarillenta
6	LHis.km93½.01.01	2	0.96	Amarillenta
	Estándar de Saponinas	1	0.69	Violeta

Fuente: Datos Experimentales.

Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40)

Revelador: vainillina-ácido sulfúrico. Ver imágenes XIII y XIV, anexos III

Tabla XVI
Presencia de Principios Amargos en Cromatografía en Capa Fina en las plantas *Lantana* cámara L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana Trifolia* L.

No. Muestra	Muestra	No. de bandas	Rf	Color de la banda
1	Lcam.zuni.01.01	0	0	
2	Lcam.zumi.01.04	0	0	
3	Ltri1.01.01	0	0	
4	LHis.snfe.01.01	0	0	
5	Ltri3.01.03	0	0	
6	LHis.km93½.01.01	0	0	
	Neuroloena lobata	1	0.17	Amarillenta

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (97:15:8)
 Revelador: vainillina-ácido sulfúrico. Las seis muestras dieron resultados negativos. Ver imagen XV, anexos III

Tabla XVII
Presencia de Taninos en las plantas *Lantana* cámara L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana Trifolia* L.

No. Muestra	Muestra	Gelatina al 1%	Gelatina-sal	Cloruro férrico al 10%
1	Lcam.zuni.01.01	-	-	-
2	Lcam.zumi.01.04	-	-	-
3	Ltri1.01.01	-	-	-
4	LHis.snfe.01.01	-	-	-
5	Ltri3.01.03	-	-	-
6	LHis.km93½.01.01	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales. Observación de formación de precipitados y/o cambio de coloración es positivo (+). Las seis muestras dieron resultados negativos (-). Ver imágenes XVI y XVII, anexos III.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Hidrodestilación de aceites esenciales

El aceite esencial de una planta es una fracción líquida volátil, para la cual existen diversas técnicas de extracción. En la presente investigación se utilizó la técnica de hidrodestilación con aparato tipo clewenger, la cual es una técnica reproducible y con alto rendimiento. Durante el desarrollo de la investigación se presentaron algunos inconvenientes y también a su vez se realizaron algunos ajustes en el sistema para optimizar el % de rendimiento del aceite.

Una modificación del método fue que, en lugar de colocar entre 40.0 y 50.0 gramos del material vegetal, en la mayoría de los casos se utilizó entre 15.0 y 30.0 gramos. Este cambio se realizó debido a que se contaba con poco material vegetal, ya que durante los viajes de campo no se pudo recolectar una mayor cantidad.

El principal ajuste que se realizó fue el enfriamiento con hielo del sistema de agua circulante para mejorar la condensación. Este enfriamiento permitió reducir la temperatura de condensación de los aceites esenciales a una temperatura de 5° C aproximadamente, debido a la volatilidad de los mismos. Siempre se busca condensarlos a la menor temperatura posible después de que han sido hidrodestilados.

En la Tabla II de la sección 8.1 se observa la cantidad de material vegetal con la que se trabajó en cada extracción al igual que la cantidad y porcentaje de rendimiento de aceite esencial obtenido para la colecta. No existen estudios previos sobre hidrosdestilaciones de los aceites esenciales en este género; pero empíricamente se tiene conocimiento que distintos géneros de la Familia Verbenaceae tienen buenos rendimientos en los aceites esenciales.

Se puede observar en la tabla III, de la sección 8.1 que casi todas las muestras y submuestras tienen % de rendimiento bajos y están por debajo del 0.5%, el cual se sugiere como aceptable⁵; a excepción de las muestras: LHIS.KM93.01.02 A y B y LTRI.AMAT.01.03 C

⁵ Pérez, F., Arriola, C., De León, J., Cáceres, A., Cruz, A., Oliva B., Jayes P., (2008) Estudio Químico de los Aceites Esenciales y Metabolitos Secundarios de tres plantas del género *Lantana* (Verbenaceae). USAC, Guatemala

que obtuvieron % de rendimientos de aceites esenciales bajos pero superiores a 0.5%; los % de rendimientos de los aceites pudieron ser afectados durante su hidrodestilación debido a complicaciones que se tuvieron durante su extracción; tales como emulsiones las cuales causan pérdida de gran parte del aceite esencial, o también puede ser por la poca cantidad de material vegetal que se utilizó en el proceso. Debido a la poca cantidad de aceite esencial que se obtuvo no se pudo realizar la medición del índice de refracción utilizando el refractómetro; esto es debido que dentro del proyecto macro al aceite esencial se le va a realizar cromatografía de gases y la cantidad de aceite obtenido era aproximadamente la cantidad de muestra que se requiere para llevar a cabo el análisis. En el caso de *Lantana hispida HBK.* se obtuvo mayor variabilidad en el rendimiento de extracción del aceite, por lo que es importante considerar importantes investigaciones sobre la variabilidad de rendimiento y composición entre individuos.

En la tabla IV, de la sección 8.1 se puede observar que el promedio de los aceites esenciales es de 0.3% en todas las muestras; lo cual se considera aceptable ya que el valor 0.5% no es relevante en este caso ya que es un valor sugerido para uso a nivel industrial del aceite.

9.2 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó en seis muestras; dos de cada especie de la familia *Lantana*: *Lantana camara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana trifolia L.* provenientes de distintos lugares como se puede observar en la tabla V de la sección 8.2.

El Tamizaje fitoquímico se realizó con el fin de determinar cualitativamente los siete grupos principales de constituyentes químicos presentes en planta ya que en Guatemala no se le ha realizado ningún estudio previo; tales como Alcaloides, Taninos, Flavonoides (fenoles), Principios Amargos, Antraquinonas, Cumarinas y Saponinas. Se realizaron extracciones con disolventes apropiados a partir de material vegetal seco. Posteriormente se realizaron pruebas colorimétricas (ensayo macro) cualitativas y un análisis por cromatografía en capa fina.

Se puede observar en la tabla VI, sección 8.2 que el porcentaje de Humedad en todos los casos fue superior al 10%, el cual es el porcentaje de rendimiento recomendado. Esto no es relevante ya 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.

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. Los distintos resultados de las pruebas realizadas a las seis muestras se presentan en la tabla VII de la sección 8.2; se puede observar que se realizaron tres pruebas colorimétricas (ensayo macro) para indicar o no la presencia de alcaloides. Para que se pueda tomar como significativa la presencia de alcaloides, tienen que ser positivas por lo menos dos de las tres pruebas realizadas, de lo contrario no son significativas. Las muestras No. 5 y 6 (Ltri3.01.03 y LHis.km93½.01.01 respectivamente) dieron ambas positivas en las pruebas del reactivo de Dragendorff y Wagner. La desventaja que puede tener este tipo de pruebas es que en muchas ocasiones se pueden obtenerse resultados ambiguos, es decir, positivo y negativo; es por eso que se realizó la cromatografía en capa fina, solamente para saber de una forma muy general si hay presencia o no de alcaloides. Se puede observar en la tabla VII, de la sección 8.2 que en la cromatografía de capa fina se obtuvo que en las seis muestras hay presencia de cualquier tipo de alcaloide. Se utilizaron tres estándares de alcaloides específicos (Papaverina, Atropina y Reserpina), estos se utilizaron con el fin de tener una referencia de comparación en el color de las bandas siempre dependiendo del reactivo revelador (bandas naranjas o cafés), y también a su vez se pudo realizar una comparación entre los factores de retención (rf) teóricos vs los obtenidos experimentalmente de las seis muestras. Con la realización de esto se determinó que en la muestra no. 6, LHis.km93½.01.01, hay presencia del alcaloide Papaverina ya que el rf teórico es igual a uno de los obtenidos experimentalmente en esa muestra; lo cual se puede decir de una forma general que hay presencia de alcaloides.

En la tabla IX de la sección 8.2 se presentan los resultados de flavonoides y antocianinas; este grupo es de suma importancia ya que poseen la propiedad de actuar como agentes antioxidantes, aunque frecuentemente presentan más actividades (Bruneton, 1993). Se clasifican en isoflavonas, antocianidinas, flavanos, flavonoles, flavonas y flavanonas. Según la tabla, las seis muestras dieron resultados negativos con las distintas pruebas realizadas (ensayo macro); pero en cambio en la cromatografía en capa fina se puede observar en la tabla X de la sección 8.2 que en las seis muestras hay presencia de flavonoides y antocianinas, debido a que se obtuvieron varias bandas de color naranja

similar al de los obtenidos en el estándar; específicamente en la muestra no. 6 ya que el r_f teórico (estándar) es igual al r_f experimental.

Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de quinonas naturales y son la base para muchos colorantes. Según la tabla XI, se la sección 8.2 en las seis muestras y las dos pruebas realizadas (Borträger y Borträger modificado) se obtuvieron resultados negativos de presencia de antraquinonas ya que se trabajó con hojas secas; y las antraquinonas se encuentran más que todo en la Corteza y raíz de las plantas en las familias: de Poligonáceas, leguminosas, Liliáceas y Verbenáceas (familia a la que pertenecen las seis muestras). Debido a lo anteriormente mencionado no se procedió a la realización de la cromatografía en capa fina.

Con respecto al grupo de Cumarinas, se puede observar en la tabla XII, de la sección 8.2 que en la prueba realizada en el ensayo macro en las seis muestras se obtuvieron resultados negativos; y para confirmar lo anterior se realizó una cromatografía en capa fina y se puede observar en la tabla XII, de la sección 8.2 que en ninguna de las seis muestras hay presencia de cumarinas ya que no se obtuvo ninguna banda característica de color verde que sea similar al de los estándares utilizados. Hay que recordar que este grupo no es muy grande y tampoco tiene un gran interés a nivel farmacológico.

Las saponinas son compuestos que presentan propiedades tensoactivas. Estas mismas propiedades tensoactivas no son deseables durante la hidrodestilación de aceites esenciales al hacer uso del aparato tipo cleveger o cualquier sistema similar debido a que provocan proyecciones del material vegetal. Se obtuvo que las seis muestras en el ensayo macro hay presencia de saponinas, observar en la tabla XIV, sección 8.2, ya que al realizar la prueba se observó una formación de capa de espuma de aproximadamente tres centímetros la cual persistió por más de 30 minutos. Esto se corroboró con la cromatografía en capa fina, (tabla XV), en la cual los resultados de presencia de saponinas fueron positivos al revelarse con vainillina-ácido sulfúrico y anís aldehído-ácido sulfúrico aunque el estándar que se utilizó tiene diferentes bandas de color violeta.

En base a estos resultados se puede decir que *Lantana camara L.*, *Lantana hispidaHBK*, *Lantana trifolia L.*, producen aceites esenciales en bajas concentraciones.

Respecto a los principios amargos se pueden observar los resultados en la tabla XVI, sección 8.2 que no hay presencia de principios amargos ya que con el revelador utilizado no hay ningún color característico de bandas ya sea zonas rojas-violetas, cafés-rojas o azules.

Los taninos, la propiedad que los ha distinguido es de actuar como curtientes según la tabla XVII de la sección 8.2 se obtuvo que las seis muestras dieron resultados negativos, ya que no se produjo ningún cambio de coloración en los tubos a la hora de realizar las distintas pruebas.

10. CONCLUSIONES

- El porcentaje de rendimiento promedio obtenido de la extracción de aceite esencial de las hojas de *Lantana camara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana trifolia L.*; por medio de la hidrodestilación con aparato tipo clevenger fue de 0.3%, el cual es aceptable.
- El porcentaje de rendimiento de extracción del aceite esencial más alto obtenido de la correspondió a la especie de *Lantana hispida HBK*. colectada en San Cristóbal, en época lluviosa con un valor de 0.65%.
- De acuerdo con los rendimientos obtenidos se espera que *Lantana hispida HBK*. es la planta que presenta el mayor potencial para su aprovechamiento en procesos agroindustriales.
- El porcentaje de rendimiento más bajo fue de 0.09% obtenido de la extracción del aceite esencial correspondió a la especie de *Lantana Camara L.* y *Lantana Hispida HBK*; colectada en Zunil y Volcán de Pacaya respectivamente, ambas colectadas en época lluviosa.
- Las plantas *Lantana camara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana trifolia L.* presentaron Alcaloides, Flavonoides y Saponinas.
- Las plantas *Lantana camara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana trifolia L.* no presentaron Cumarinas, Principios Amargos, Antraquinonas y Taninos.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Recolectar una cantidad mayor de material vegetal de *Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenaceae; para poder realizar más extracciones del aceite esencial con diferentes técnicas de extracción.

11.2 Crear una base de datos útiles de índices de refracción de los aceites esenciales de las tres especies de *Lantana* (*Lantana Camara* L., *Lantana Hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenaceae) para determinar su calidad.

11.3 Realizar análisis cromatográficos de los aceites esenciales y ensayos de actividad biológica tanto en hojas como en otras partes de la planta en las especies de *Lantana Camara* L., *Lantana Hispida* HBK y *Lantana trifolia* L., de la Familia Verbenaceae.

11.4 Realizar varias colectas en diferentes épocas del año, para así poder realizar una comparación de los porcentajes de rendimiento de los aceites esenciales.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Bruneton, J. (1993). Farmacognosia. Fotoquímica. Plantas Medicinales. Segunda edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp 123-124, 183-184, 261-263, 305-306, 366-367, 405-407, 467 y 775.
- 2) Cáceres A., Samayoa, B., Logemann, H. (1990). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala: Tamizaje de la actividad antimicrobiana (2ª parte) Revista de la Universidad de San Carlos, No. 10, marzo, 1990.
- 3) Cáceres, A., Girón, L., Freire, V. (1990). Plantas de uso medicinal en Guatemala. Detección etnobotánica y bibliográfica. Revista de la Universidad de San Carlos, No. 10, junio, 1990.
- 4) Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, 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). Phytochemical Analysis, 14, 228-231
- 5) Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2000). Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitosus* Grown on the island S. Jorge (Azores). Phytochemistry, 55, 241-246.
- 6) Pérez, F., Arriola, C., De León, J., Cáceres, A., Cruz, S., Oliva B., Jayes P., (2008) Estudio Químico de los Aceites Esenciales y Metabolitos Secundarios de tres plantas del género *Lantana* (Verbanaceae). USAC, Guatemala
- 7) Ross, I.A., (1999). Medicinal Plants of the World. Totowa: Humana Press. Vol. 1. pp 179-187.
- 8) Skoog, Holler, Nieman. (2001). 5ta. Edición. Principios de Análisis Instrumental. España. Pp 322-329
- 9) Stevens, W. D., C. Ulloa U., A. Pool y O. M. Montiel (eds.), 2001. Flora de Nicaragua. Vol. 85, tomos I, II y III. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis Missouri.

- 10) Trease y Evans, (1991). Farmacognosia. 13a. edición. Editorial Mcgraw-Hill, México. pp. 590-594.
- 11) Windholz, M. (1983). The Index Merck. 10 ed. New Jerwey, Merck & Co.

13. ANEXOS

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

Manual del Lipronat

TAMIZAJE FITOQUIMICO

Elaborado por: _____	Fecha: _____
Revisado por: _____	Fecha: _____
Autorizado por: _____	Fecha: _____

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.

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

Rf: 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
7. 27.2 g KI / 50 mL H_2O
8. 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 sílica

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-amonió 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 amoniaco 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 Bornträger 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 cromatoplaca 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 cromatoplaque 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 μ L en la cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar digoxina 5 mg/2 mL de metanol (20 μ L), lanatósido, A,B,C; oleandrin, k-strophantin.

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

Detección:

Sin tratamiento químico: Fluorescencia por cardenólidos en UV-265 nm, la mayor fluorescencia es 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 µL en una cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 µL).

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

Detección:

Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.

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

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

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 µL).

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

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

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

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 uL 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 5uL (1:10) en cromatoplaca de silicagel 60 F₂₅₄.

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

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

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, vanillina-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 .

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 mL 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.

Anexos II

Imágenes Extracción de Aceites esenciales e Índice de refracción



Imagen I
Lantana Camara



Imagen II
Colecta del Material vegetal



Imagen III
Secado del Material Vegetal



Imagen IV
Tamizaje del Material Vegetal



Imagen V
Hidrodestilación de Aceites Esenciales



Imagen VI
Aceite Esencial



Imagen VII
Refractómetro Abbe

Anexos III
Imágenes
Tamizaje Fitoquímico



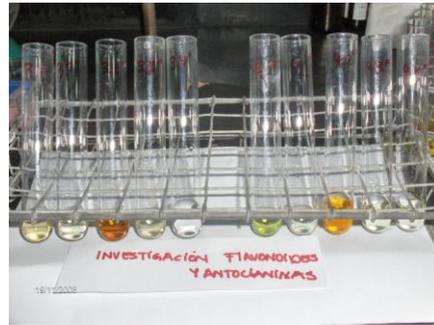
Imagen I
Prueba de Alcaloides
Reactivo de Mayer's



Imagen II
Prueba de alcaloides
Reactivo de Dragendorff



Imagen III
Prueba de alcaloides
Reactivo de Wagner



Imágenes IV, V y VI
Prueba de Flavonoides y antocianinas
* Todas las pruebas son negativas



Imagen VII
Cromatografía en Capa Fina Flavonoides y Antocianinas (+)

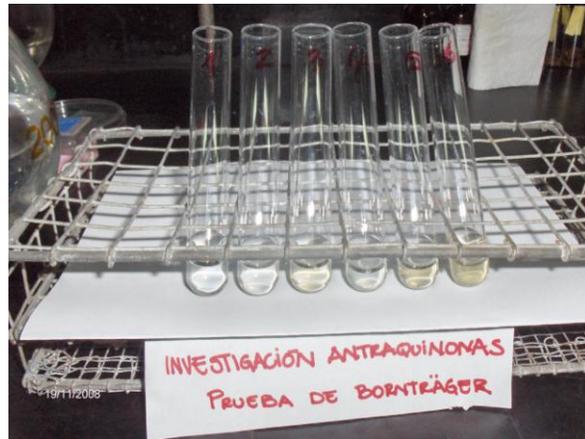


Imagen VIII
Prueba de Antraquinonas
Prueba de Borträger
Las seis muestras dieron resultados negativos



Imagen IX
Prueba de Borträger modificado (-)
Las seis muestras dieron resultados negativos.

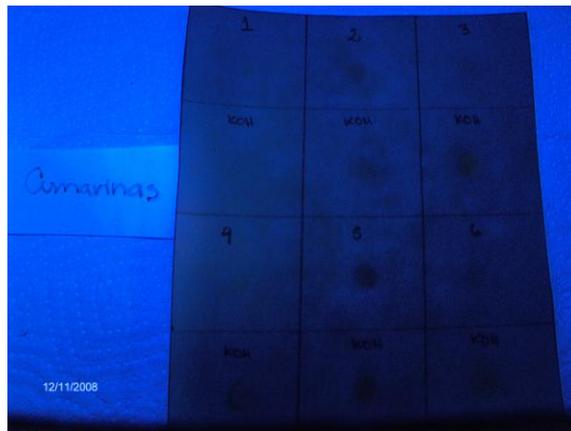


Imagen X
Cumarinas en papel filtro
 Las seis muestras dieron resultados negativos.



Imágenes XI y XII
Prueba de Saponinas (test de espuma)



Imágenes XIII y XIV
Cromatografía de Saponinas

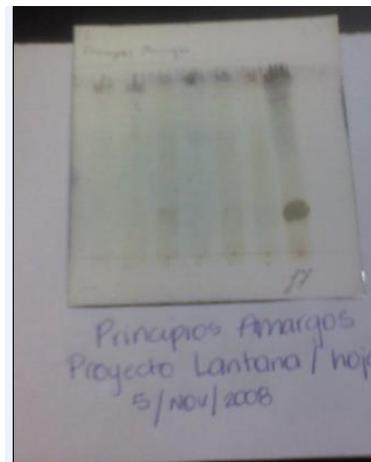
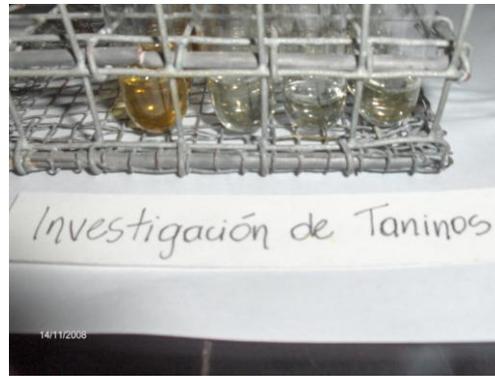


Imagen XV
Cromatografía en Capa fina Principios Amargos (-)
Las seis muestras dieron resultados negativos



Imágenes XVI y XVII
Prueba de Taninos