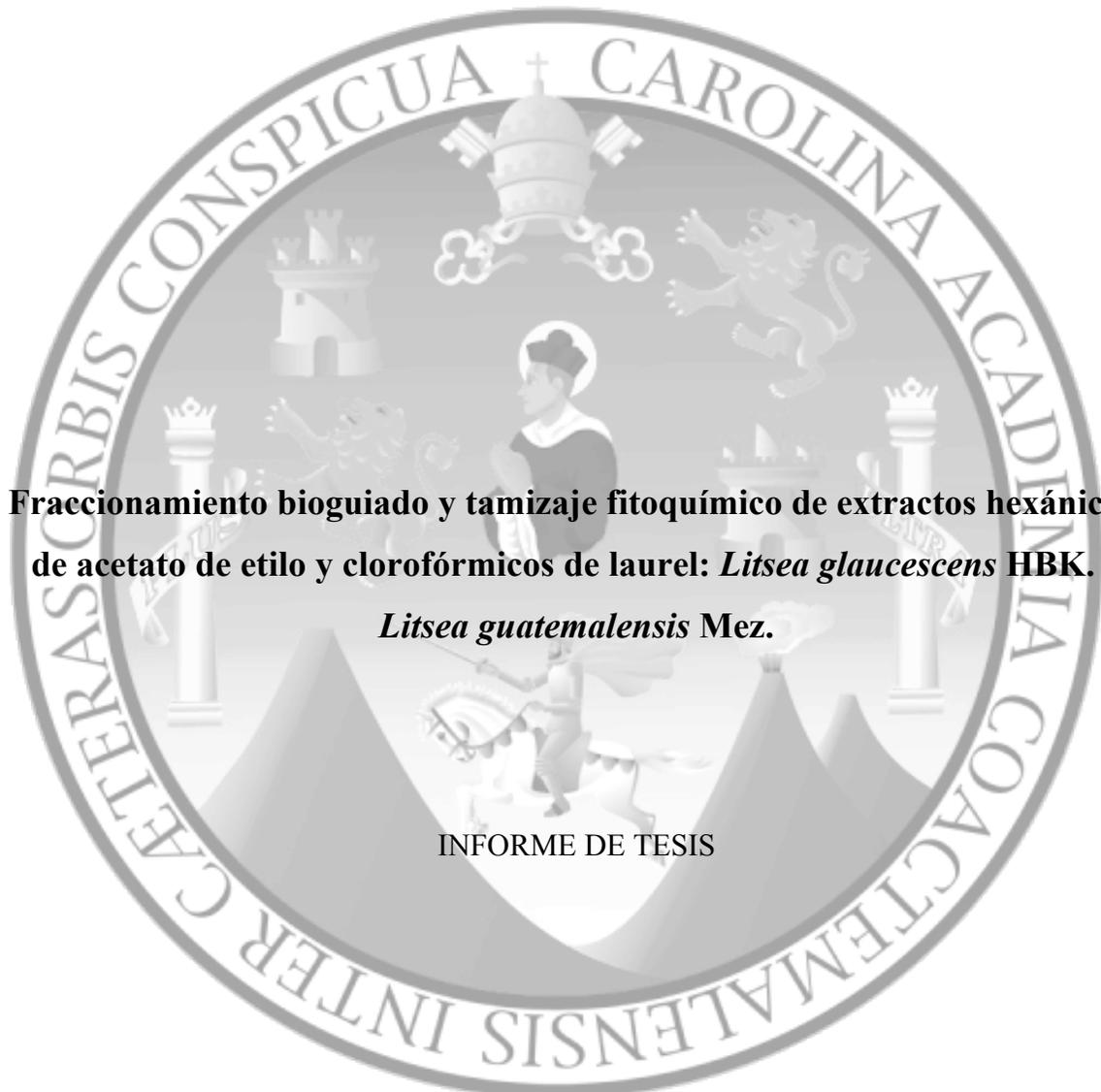


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos,
de acetato de etilo y clorofórmicos de laurel: *Litsea glaucescens* HBK. y
Litsea guatemalensis Mez.**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR
Ingrid Carolina Oliva Flores

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, MAYO DE 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos,
de acetato de etilo y clorofórmicos de laurel: *Litsea glaucescens* HBK. y
Litsea guatemalensis Mez.**

Ingrid Carolina Oliva Flores

QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, MAYO DE 2012

MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

Este trabajo de Tesis ha sido el fruto del esfuerzo y el trabajo que ahora con alegría le presento a Dios. Los éxitos en mis años de estudio son producto de todas las personas que me han apoyado a lo largo de mi vida. En especial a mis padres: Edgar y Lucky, a mis queridas hermanas: Silvia y Vivian, y a mis abuelos: Esperanza, Joaquín y Margarita, es de ustedes este gran logro. También deseo dedicar este logro a mi novio Victor Gudiel por ser luz en mi vida y recordarme amada por Dios.

A todas las personas que directa o indirectamente han sido parte mi formación, a todas ellas les dedico este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al escribir estas palabras pienso todo lo que ha quedado en el pasado, un pasado con experiencias que han forjado mi presente y me han hecho lo que ahora soy. Ante todo, deseo agradecer a Dios por brindarme inspiración, sabiduría y fortaleza para sobreponerme a las dificultades del camino. También agradezco a mi Madre María por acompañarme siempre en mi vida. Además le agradezco a mi familia por ser siempre mi soporte y estar conmigo y a mi novio Victor Gudiel por ser mi apoyo en todo momento.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT– y a la Licda. Sully Cruz por ayudarme en la realización de esta tesis y por brindarme más que ayuda y un lugar de trabajo, amistad en cada uno de sus integrantes. Al Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica por recibirme con tanta amabilidad en los años de trabajo.

A todos mis amigos, a los Scouts del Grupo 61, a los Salesianos y a todas las personas que han dejado huella en mi vida. Ustedes han compartido su amor y confianza conmigo y estoy muy agradecida por tenerlos en mi mundo.

A la Universidad de San Carlos por brindarme la oportunidad de aprender y poder transformar con mi conocimiento a mi país.

1. Resumen

A lo largo de la historia, el hombre ha recurrido a la naturaleza en busca de formas para curar problemas de salud y en busca de alimento. El laurel es una planta que ha acompañado la gastronomía guatemalteca desde tiempos ancestrales y también se ha reportado que tiene muchas propiedades medicinales. Dentro de estas se puede mencionar la actividad antibacteriana y antioxidante.

Por lo cual se seleccionaron dos especies endémicas de Guatemala, utilizadas indistintamente como laurel, *Litsea guatemalensis* y *Litsea glaucescens*. A las cuales se les realizó un extracto etanólico y tres particiones con disolventes de diferentes polaridades. Hexano como solvente apolar, cloroformo como solvente medianamente polar y acetato de etilo como solvente polar. Dichos disolventes extrajeron metabolitos diferentes, los cuales se ensayaron con el objetivo de comprobar cuál de las tres particiones, para cada especie presentaba la mejor actividad antibacteriana y antioxidante, y detectar los metabolitos característicos de las dos especies en cada partición.

Todos los extractos presentaron actividad contra *Mycobacterium smegmatis*, siendo los extractos clorofórmicos de ambas especies los que reportaron mejor actividad contra esta bacteria. Para *Bacillus subtilis*, los extractos hexánicos de ambas especies y el extracto clorofómico de *L. glaucescens* presentan una concentración de inhibición menor que los otros. En el ensayo de inhibición de la levadura *Candida albicans*, *L. glaucescens* presenta una mejor actividad que *L. guatemalensis*, presentando dos extractos activos: hexánico y clorofómico. Todos los extractos ensayados presentaban actividad antioxidante, sin embargo, el extracto de acetato de etilo de *L. glaucescens* inhibe el radical libre difenilpicrilhidrazil (DPPH) a una menor concentración, siendo este el mejor extracto antioxidante. En cuanto a los metabolitos característicos de la especie, todos los extractos presentaron flavonoides, saponinas, cumarinas y aceites esenciales.

2. Introducción

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad (Hernández, R., y Gally, M., 1981). El hombre recurría a la naturaleza en busca de alimento y de formas para curar problemas de salud. El método por el cual el hombre aprendió a diferenciar las plantas inocuas de las tóxicas fue por medio de ensayo y error. Este conocimiento se ha trasladado de generación en generación hasta nuestros días. En la actualidad el conocimiento de las propiedades curativas de una planta se puede comprobar por medio de investigaciones científicas. Así se puede corroborar la actividad terapéutica de la planta e investigar si presenta diferentes tipos de actividades.

Dentro de la cultura guatemalteca el uso de plantas ha sido una práctica en la cual se ha cimentado nuestra cultura, debido a la alta biodiversidad existente en nuestro país. Estos conocimientos también se han trasladado desde nuestros ancestros mayas. Debido a esta tradición, el uso de plantas está ampliamente difundido ya sea como medicinales o como gastronómicas. Una de las plantas más utilizadas en Guatemala es el laurel, por sus propiedades gastronómicas como condimento de varias comidas. Tiene aplicación en la industria de cervezas y salchichas. Pero también tiene aceptación popular en la medicina, ya que se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias y gastrointestinales; así como en caso de mordeduras de serpientes y de perros (Cáceres, 1996; 2003)

La investigación de productos naturales está orientada a la búsqueda y comprobación de actividades biológicas. En este camino se pueden someter los extractos a un fraccionamiento químico para identificar el potencial biológico que presentan los mismos. Este análisis permite detectar otras actividades biológicas y así ampliar el estudio de cada planta y atribuirle, mediante investigación científica, nuevas propiedades para continuar el estudio de cada especie y orientar en el tipo de pruebas que se deben realizar según la actividad biológica. Se procedió a investigar la actividad antioxidante y antibacteriana del laurel (*Litsea glaucescens* HBK y *Litsea guatemalensis* Mez.) para luego determinar los metabolitos secundarios que le confieren la actividad descrita.

3. Antecedentes

3.1. Extracción y Caracterización Química

Las investigaciones de plantas medicinales en Guatemala están orientadas a buscar o confirmar actividades de aquellas que se utilicen popularmente, así como determinar los grupos químicos responsables de ellas. Esta búsqueda constituye una referencia para el estudio de principios activos dentro de las plantas con actividad farmacológica. El tamizaje es seguido de un fraccionamiento fitoquímico bioguiado para lograr la evaluación de la bioactividad.

3.1.1. Extracción:

Para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar. Para ello se realiza una extracción con disolventes de diferentes polaridades, generalmente diclorometano o hexano, éter o etanol y agua (Cáceres, 1996). Debido a la toxicidad de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (evaporador rotatorio) hasta alcanzar una consistencia similar a la miel. En el caso de los extractos acuosos se suele concentrar por medio de liofilización.

El fraccionamiento fitoquímico bioguiado es una liberación extractiva segmentada mediante un gradiente de polaridad ascendente. Al seleccionar un solvente se debe considerar la facilidad de manipulación, precio, seguridad y riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental. Mediante el uso de este diseño se pretende aprovechar la selectividad y especificidad de los disolventes extractores (Molina, 2005).

3.1.2. Tamizaje Fitoquímico:

Esta es una etapa importante dentro de la investigación fitoquímica, ya que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de ahí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Este tamizaje consiste en la extracción de principios activos con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación (Sandberg, 1967, p.15; Solís, 2005).

Se realiza un tamizaje preliminar con pruebas cualitativas macro o micrométricas en tubo de ensayo o en capa fina, y para el análisis fitoquímico definitivo y elucidación estructural se usan técnicas de cromatografía en papel, capa fina o columna, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases, espectroscopía infrarroja, análisis de espectroscopía de masas, técnicas de refracción y cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (MNR), etc, pero en todos los casos se recomienda un fraccionamiento bioguiado. La confirmación de la cualquier actividad biológica que se presente en el tamizaje fitoquímico justifica la continuación de los estudios. Este datos preeliminares sobre los constituyentes químicos de la planta que, junto con los resultados del tamizaje farmacológico, pueden orientar la continuación de los estudios (Solís, 2005; Cannel, 1998).

3.1.3. Fraccionamiento de extractos:

Los procesos de separación involucran la división de la mezcla en un número discreto de fracciones. Se refiere a la separación de metabolitos de mezclas de naturaleza química compleja, para obtener fracciones de compuestos afines, con características y propiedades similares. La mayor parte de los métodos de fraccionamiento aprovechan la naturaleza química de los compuestos que se van a separar, específicamente las diferencias en

polaridad y acidez-alcalinidad. El fraccionamiento de extractos crudos vegetales implica la utilización de métodos altamente especializados, esto se hace con el propósito de optimizar recursos y técnicas y aumentar la eficiencia de las metodologías (Cannel, 1998).

3.1.3.1. Partición líquido – líquido:

Éste método se fundamenta en las diferencias de los coeficientes de reparto de los metabolitos extraídos entre dos líquidos inmiscibles (uno polar y otro apolar). Esta técnica constituye un método de fraccionamiento grueso, que permite obtener extractos selectivamente caracterizables y con una mayor especificidad en lo que a grupos funcionales se refiere (Cannel, 1998).

3.1.4. Evaluación de la actividad biocida:

La actividad biocida se refiere a la capacidad de una sustancia para causar la muerte en determinados organismos, es detectada por medio de una serie de ensayos biológicos *in vitro*. Estas permiten dar una idea preliminar de las potencialidades de un extracto crudo, fracción purificada o principio activo puro de especies vegetales. Las técnicas utilizadas en la fase de pretamizaje pueden tener distintos grados de dificultad en la medida en que se identifican con mayor claridad las potencialidades de las especies en estudio, son relativamente sencillas siempre que no involucren animales; además son baratas, rápidas, reproducibles y permiten evaluar un número grande de muestras (Anderson, 1991; Chariandy, 1999; Cox y Balick, 1994; Martínez, 1997).

3.1.4.1. Tamizaje antimicrobiano:

La actividad antimicrobiana es empleada para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas

de una droga de origen vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Es indispensable en la evaluación de la actividad antimicrobiana conocer y controlar las condiciones de laboratorio modelo microbiano, tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro* (Cáceres, 1996; Martínez, 1997; Murphy, 1999).

3.1.4.1.1. Método de dilución en agar:

Este método está basado en que el crecimiento exponencial de bacterias susceptibles inoculadas en superficie o profundidad en los medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar. Este ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y está basado en el método descrito por Mitscher *et al.* En este método una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua (Mitscher, 1972; Ríos, 1988).

El método de dilución se emplea para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, es decir, la CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible, esta prueba puede ser en caldo (tubo) o en agar (placa). Se ha utilizado principalmente para determinar los valores de CIM de un extracto, aceite esencial o sustancia pura, así como para el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana, además permite evaluar la CIM usando diluciones decrecientes del extracto (Ríos, 1988; Murphy, 1999).

3.1.4.1.2. Método de difusión:

Este método se basa en el descrito por Bauer-Kirby y es usado para evaluar la actividad antibacteriana vegetal. Se utiliza un disco, agujero o cilindro como reservorio en el agar, el cual contiene la muestra a ensayar, luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona clara alrededor del reservorio (diámetro de inhibición) (Cáceres, 1996). Y seguido no se requiere dispersión homogénea en agua del extracto a evaluar, la cantidad de muestra utilizada en el tamizaje es pequeña y permite probar cinco a seis compuestos contra varios organismos, además es el más conveniente para el tamizaje preliminar de sustancias puras (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.) (Ríos, 1988; Murphy, 1999).

3.1.5. Actividad Antioxidante

Estudios en los últimos años han mostrado que los antioxidantes de origen polifenólico tienen la capacidad de secuestrar radicales libres. Estos son especies químicas muy reactivas que fácilmente conducen a reacciones incontroladas, resultando en daños oxidativos importantes en macromoléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Hirayama, 1997; Imark, 2001). Se ha encontrado que el papel de estos radicales podría asociarse con el estrés oxidativo, el cáncer y enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Havsteen, 2002). De igual manera, se han asociado las dietas con un alto contenido de antioxidantes naturales con una disminución en los índices de enfermedades crónicas, debido a que se cree que fortalecen el sistema antioxidante endógeno y reducen el estrés oxidativo. Muchas hierbas y especias, utilizadas para darle sabor a los platillos, son una excelente fuente de compuestos fenólicos, reportándose una buena actividad antioxidante (Hinneburg, 2006).

3.1.5.1. Oxidaciones biológicas:

Los radicales libres son aquellas especies que poseen uno o más electrones desapareados en su orbital externo, lo que da como resultado una molécula altamente inestable. Esta tiene altas propiedades oxidantes ya que reaccionan rápidamente con casi cualquier tipo de molécula biológica hallada en forma libre o formando parte de cualquier estructura celular viva (Montero, 2007).

Las fuentes más comunes de generación de radicales libres son: las radiaciones (ultravioleta, X, infrarrojo), el metabolismo (ejercicio extenuante, bebidas alcohólicas, drogas y péptidos alfa-amiloides), las sustancias químicas ambientales (ozono, nitrógeno, productos de combustión, tabaco, hidrocarburos halogenados y metales pesados) y las infecciones (bacterianas, víricas, parasitarias y priones). En la actualidad se reconoce que alrededor de 60 patologías pueden estar relacionadas con el aumento de radicales libres (Montero, 2007).

3.1.5.2. Importancia de los antioxidantes

El aumento del consumo de frutas y vegetales se ha asociado a la protección contra varias enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades cardio y cerebrovasculares. Esta asociación es usualmente atribuida a los antioxidantes, tales como la vitaminas C y E, carotenoides, licopenos y flavonoides que previenen el daño de radicales libres. En frutas y vegetales abundan los flavonoides y otros compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante que, aunque no constituyen parte del sistema antioxidante endógeno, lo refuerzan (Serrano, 2007).

Los compuestos fenólicos en los alimentos poseen propiedades químicas en las cuales se puede destacar la formación de radicales de

baja energía a través de híbridos de resonancia estable. Como preservantes en alimentos se han utilizado compuestos fenólicos sintéticos como hidroxilanisol butilado (BHA), dihidroxitolueno butilado (BHT) y propil galato (PG), entre otros. Sin embargo estos compuestos han demostrado poseer efectos tóxicos por lo que su uso es regulado (Sin, 2006).

3.2. Descripción de la familia Lauracea

Los árboles pertenecientes a la familia Lauracea son aromáticos, con hojas alternas, raramente opuestas, simples, pinnadamente venadas, usualmente enteras, deciduas con las zonas templadas, perennifolias en los trópicos; sin estípulas. Las inflorescencias son comúnmente axilares, paniculas, espigas, racimos o umbelas. Las flores por lo general son bisexuales, en ocasiones unisexuales, actinomorfas. Poseen caliz de seis sepalos, en dos series unidos en un tubo en la base. No poseen corola. El androceo tiene cuatro verticilos de tres estambes cada uno de ellos, o uno de ellos, o uno o más verticilos reducidos a estaminodios o ausentes, adnados al tubo del perianto. El gineceo es un pistilo simple con un carpelo, un lóculo, y un óvulo, placentación marginal, ovario súpero, un estilo, un estigma. Los frutos son bayas o drupas frecuentemente rodeadas en la base por una cúpula que se deriva del tubo del cáliz persistente. El embrión es recto y grande y no posee endospermo (Jones, 1987).

3.3. Descripción del género *Litsea*

El género *Litsea* posee más de 100 especies, unas 12 de América, y en Guatemala se han descrito tres especies nativas que se usan indistintamente como laurel (*Litsea glaucescens* HBK, *L. neesiana* (Schauer) Hemsl. y *L. guatemalensis* Mez.). Se ha mencionado en 1790 el nombre nahuatl Ecapátli o medicina del viento por Hernández y también se describen sus propiedades medicinales. Las hojas de las tres especies tienen olor muy parecido al del laurel europeo (*Laurus nobilis* L.), por lo que se le atribuyen propiedades similares. *L. nobilis* se cultiva y usa

medicinalmente desde los griegos y romanos; sus hojas eran las guirnaldas que se daban a los ganadores de las Olimpíadas (Cáceres, 1996; 2003).

3.4. Descripción de las especies *Litsea glaucescens* y *Litsea guatemalensis*

El laurel *Litsea glaucescens* es un árbol de 3 – 12 m de alto con ramas glabras. Presenta hojas coriáceas, con peciolo de 18 mm de largo, lanceoladas, peninervadas. Tiene inflorescencia en racimos axilares, de 4 – 9 flores unisexuales. El fruto es en forma de drupa, negro, de 7 – 9 mm de diámetro, rodeado por una cúpula. Es nativo de México y Centro América. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Huehuetenango, Quetzaltenango, San Marcos y Zacapa (Cáceres, 1996; 2003).

El laurel *Litsea guatemalensis* es un árbol de hasta 6 m de alto con ramas delgadas y caféas. Las hojas son coriáceas, con peciolo de 1.5 cm de largo, elíptico – lanceoladas, de 8 cm de largo, agudas en la base, lustrosas y glabras. Presenta flores axilares, con pedúnculo simple, solitarias, de 15 mm de largo, 5 – 11 flores, brácteas de involucro deciduo, con filamentos glabros. Es endémico de Guatemala y crece en bosques de pino y matorrales de 1,500 – 3150 msnm. Se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (Cáceres, 1996; 2003).

3.5. Usos medicinales de las especies

Al cocimiento de las hojas de laurel se le ha atribuido actividad antibacteriana, y se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, males de la garganta, tos, tos ferina), gastrointestinales (diarrea, cólico, úlcera) y carencia de leche en la madre e hinchazón. Por vía tópica se usa en lavados y baños para el cansancio y epilepsia. El cocimiento de la corteza se utiliza para tratar mordeduras de culebras y de perros. Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia, en sahumeros se usa para parálisis (Cáceres, 1996). Estudios realizados han comprobado que la tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene

moderada actividad contra los hongos y levaduras *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporium canis* (Cáceres, 2003).

3.6. Otros usos populares

Las hojas aromáticas son muy empleadas como condimento en la preparación de platillos como sopas, guisos y repostería, se usa en forma similar a *L. nobilis*. De las hojas se extrae un aceite etéreo con aplicación en la industria de cerveza y salchichas (Cáceres, 1996)

3.7. Farmacognosia

La materia médica son las hojas secas, las que deben tener las características botánica, fisicoquímica y organolépticas que caracterizan a la especie oficial. El aceite esencial de *L. glaucescens* tiene el olor característico pero difiere en su composición química, contiene 10 compuestos más que *L. nobilis* y hay 17 compuestos comunes a ambos. La presencia de limoneno en el aceite esencial reduce la dismenorrea por inhibición de la biosíntesis de prostaglandina (Cáceres, 1996; Cáceres, 2003).

3.8. Composición química

Se encuentra muy poca información sobre la composición química de las tres especies endémicas del país. Por su olor característico similar a *Laurus nobilis*, se asume que *L. guatemalensis* y *L. glaucescens* tienen un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoléico. El tamizaje fitoquímico de *Litsea guatemalensis* indica: alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, quercetina, estibina y taraxon; el aceite esencial contienen limoneno y citral. El aceite esencial de *Litsea glaucescens* contiene 1,8-cineol (22%), sabineno (13%), terpinen-4-ol (10%), γ -terpineno (9%), acetato de α -terpinilo (7%), acetato de nerilo (7%), α -pineno (5%) y β -pineno (4%) (Cáceres, 1996).

3.9. Estudios realizados de las especies

En la Universidad de San Carlos de Guatemala se han realizado estudios sobre estas especies de laurel. Así, en 1999 Alvarez Hernández encontró que una infusión de laurel (*Litsea glaucescens*) al 10% tiene un efecto inhibitorio de 13.40% sobre las cepas de *Lactobacillus acidophilus*, y la infusión de laurel al 5% tiene efecto inhibitorio de 13.57% sobre las cepas de *Streptococcus mutans*. En este estudio se realizaron 3 infusiones del extracto del laurel (*Litsea glaucescens*) al 20, 10 y 5% p/v para lo cual se utilizaron 20, 10 y 5 g de las hojas frescas. Los resultados obtenidos en el presente estudio comprobaron que el laurel (*L. glaucescens*) puede causar inhibición en el crecimiento de los microorganismos, pero en distintas concentraciones. En la fase de estudio realizado con *Lactobacillus acidophilus* se obtuvo la mayor inhibición con la infusión al 10%, un 13.40%, y al 20% de concentración, una baja del 6.7%, debajo del 100% obtenido de la siembra control. En el caso de *Streptococcus mutans* también se observó un descenso del 13.81%, en el crecimiento de microorganismos al 5% de concentración. Este fenómeno posiblemente se puede explicar como una probable consecuencia de una alteración de los mecanismos que regulan la división celular, o por daños específicos a determinadas enzimas, pero no hay evidencia que respalde esto (Alvarez, 1999).

En 2005 Ortiz Quiroa comparó los porcentajes de rendimiento y la variación que presenta este metabolito en relación al lugar de colecta y determinó los componentes mayoritarios presentes en los dos tipos de laurel, los cuales son 1,8 – cineol y linalol.

Se compararon los porcentajes de rendimiento de los aceites esenciales obtenidos en los tres diferentes lugares de colecta de *Litsea guatemalensis* y *Litsea glaucescens* y se determina que este porcentaje se ve afectado significativamente por el lugar de colecta. Posterior a estas determinaciones se realizó el análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los aceites y se compararon los componentes obtenidos para cada especie. Para *L. guatemalensis* se

observa que el componente mayoritario es el 1,8 – cineol en la región 1 y en las otras regiones se observa en menores cantidades. Un componente que se determinó que se encuentra en porcentajes parecidos en las tres regiones fue el linalol. Los componentes que predominan en el aceite esencial de *L. glaucescens* es el 1,8 – cineol y el linalol, al igual que en el *L. guatemalensis* (Ortiz, 2005).

Por medio de la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se identificaron 14 componentes no descritos previamente en el aceite esencial de *L. guatemalensis* y se identificaron 5 componentes no descritos previamente en el aceite esencial de *L. glaucescens* (Ortiz, 2005).

En el año 2007 Hernández Méndez determinó que la infusión al 10% de las hojas de *Litsea guatemalensis* no presentó actividad antiinflamatoria a dosis de 750 y 1000 mg/Kg de peso corporal in vivo (Hernández, 2007).

Posteriormente en el 2009 López Salazar obtuvo mayor rendimiento de resina con las concentraciones de etanol al 95 y 35% (v/v) e identificó que el compuesto mayoritario es el Linalool.

3.10. **Toxicología**

No se encuentran datos sobre la toxicidad de las tres especies nativas guatemaltecas.

3.11. **Indicaciones terapéuticas**

Por su similitud organoléptica con *L. nobilis* y su uso popular en alimentación y medicina, está indicado en el tratamiento de anorexia, digestión lenta, espasmo gastrointestinal, meteorismo y bronquitis crónica. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 1-2 g/taza en infusión o 1-2 ml de tintura 1:8 con etanol al 35% (Cáceres, 1996; 2003).

Para uso t3pico se recomienda la decocci3n de 5 hojas/taza en el tratamiento de estomatitis, faringitis y sinusitis, usada como colutorio, gargarismo o compresa; en alcoholato o pomada se usa como antirreumático pediculicida y parasiticida (Cáceres, 1996; 2003).

4. Justificación

El uso de plantas medicinales en Guatemala es una práctica que se ha utilizado desde nuestros ancestros mayas, y fue el único remedio que se utilizó antes de la introducción de la medicina sintética. Debido a esta tradición, el uso de plantas medicinales está ampliamente difundido en nuestro país por la alta biodiversidad de plantas que existen en la región. En el área rural ha sido la única alternativa el tratamiento de enfermedades mediante el uso de plantas medicinales. Es con este propósito que se evaluará la actividad biológica *in vitro* de dos especies nativas para contribuir al estudio de especies vegetales con propiedades medicinales provenientes de nuestra región.

En la actualidad el estudio de las plantas medicinales ha ganado protagonismo en el ámbito científico de Guatemala debido al amplio uso que se les puede dar a las mismas. El laurel es una planta ampliamente utilizada como condimento en la cocina guatemalteca y ha demostrado interesantes propiedades tales como antioxidante y antibacteriana. Previamente se han realizado estudios en donde los extractos etanólicos de las dos especies de laurel de Guatemala, *Litsea guatemalensis* y *Litsea glaucescens*, han demostrado estas actividades por lo que es necesario comprobar si se mantiene las actividades antes mencionadas en diferentes extractos con solventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y cloroformico).

Es por esta razón que se realizará un estudio de fraccionamiento bioguiado para identificar qué fracción presenta y si mantiene la actividad descrita; además de poder determinar los metabolitos secundarios que le confieren esta.

5. Objetivos

5.1. General

- 5.1.1. Evaluar la actividad antioxidante, antibacteriana y composición química de dos especies comerciales de laurel en Guatemala: *Litsea glaucescens* HBK. y *Litsea guatemalensis* MEZ para su aprovechamiento industrial.

5.2. Específicos

- 5.2.1. Identificar el extracto de las dos especies de laurel que presenta mayor actividad antibacteriana y antioxidante.
- 5.2.2. Determinar la actividad antioxidante en los extractos (hexánicos, de acetato de etilo y clorofórmicos) de dos especies de laurel.
- 5.2.3. Caracterizar los principales metabolitos secundarios en las diferentes particiones de las dos especies de laurel.

6. Hipótesis

Al menos una de las particiones de las especies de laurel presenta actividad biológica significativa, expresada en actividad antibacteriana y/o actividad antioxidante y presentan los metabolitos característicos de la especie.

7. Materiales y Métodos

7.1. Universo

7.1.1. Universo: Dos diferentes especies de laurel comercial: *Litsea glaucescens* HBK. (Sasson) y *Litsea guatemalensis* Mez (Quínfica)

7.1.2. Muestra: extractos hexánicos, de acetato de etilo y clorofórmicos de las hojas secas de *Litsea glaucescens* HBK. y *Litsea guatemalensis* Mez.

7.2. Materiales

7.2.1. Extracción continua por percolación

- Percolador de acero inoxidable
- Etanol al 95%
- Balanza
- Algodón
- Papel filtro
- Vasos de precipitar
- Erlenmeyers

7.2.2. Concentración usando evaporador rotatorio

- Rotavapor (balón de evaporación, condensador, bomba de vacío, refrigerante y balón de colecta)
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua
- Balón de 1000 ml

7.2.3. Obtención del extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo a partir de partición líquido – líquido

- Hexano
- Acetato de etilo
- Cloroformo

7.2.4. Actividad antimicrobiana *in vitro*

- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella tify*
- *Mycobacterium Smegmatis*
- *Bacillus subtilis*
- *Pseudomona aeruginosa*
- *Candida albicans*
- *Cryptococcus neoformes*
- *Escherichia coli*
- Agar Muller Hinton
- Asa de nicromo
- Autoclave
- Cajas de petri cuadriplate
- Caldo tripticasa soya
- Etanol al 50%
- Incubadora a 36°C
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas de 200µL
- Puntas azules de 1000 µL
- Refrigeradora
- Solución salina
- Tubos de tapón de rosca de 15 ml

7.2.5. Actividad Antioxidante

- 5 µL del estándar antioxidante (β -caroteno, Rutina, Quercetina)
- Placa cromatográfica de sílica gel 60 F₂₅₄
- Cámara de vidrio
- Acetato de etilo:Ácido acético:Ácido fórmico: agua (100:11:11:26)
- Aspersor
- DPPH

- Metanol
- Tubos de 10 ml
- Buffer de acetatos
- Vortex

7.2.6. Tamizaje Fitoquímico

- 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
- Baño María
- Cámaras cromatográficas
- Cromatofolios de aluminio de sílica gel 60 F₂₅₄ o placas de vidrio
- Micropipetas de 5 mL o capilares
- Asperjador de vidrio
- Estufa
- Agitador magnético
- Estándares según el ensayo
- Lámpara de luz UV

7.3. Métodos

7.3.1. Extracción continua por percolación con etanol al 95% (Molina, 2005)

- Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón adecuado, de manera que sirva de filtro. Cortar un pedazo de papel filtro de forma circular y colocarlo cubriendo el fondo del percolador
- Tapar la punta del percolador con un tapón plástico.

- Agregar la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y cubrir con etanol al 95 por ciento
- Verificar que no queden burbujas y si las hay, hacer presión con una espátula para desaparecerlas.
- Agregar el resto de material vegetal seco y cubrir nuevamente con etanol al 95 por ciento, repetir el paso anterior.
- Rotular el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha y peso. Dejar reposar por 12 – 24 horas para que reaccione.
- Retirar el tapón plástico y dejar gotear hasta que salga todo el disolvente.
- Agregar el disolvente recuperado a la materia en extracción en el percolador, repetir esta operación cinco veces antes de comenzar a concentrar en rotavapor.
- Pasar el disolvente recogido al balón de rotavapor para concentrar.

7.3.2. Concentración en evaporador rotatorio (Molina, 2005; CYTED, 1993; Kuklinski, 2000; Sharapin, 2000)

- Encender el baño María y llevar la temperatura a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Engrasar todas las bocas esmeriladas y armar el rotavapor según el instructivo específico
- Succionar la solución obtenida del percolador (alcohol más planta)
- Conectar la bomba de vacío y el rotavapor e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a consistencia semisólida.
- Verter el extracto concentrado en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.
- Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente tarados y rotulados.
- Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C .

7.3.3. Obtención del extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo a partir de partición líquido – líquido (Molina, 2005; CYTED, 1993; Kuklinski, 2000; Sharapin, 2000)

- Disolver 20 g de extracto etanólico de *L. guatemalensis* y *L. glaucescens* en etanol al 95%, realizar una partición líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad. (hexano, cloroformo y acetato de etilo).
- Eliminar los disolventes por destilación a presión reducida con el fin de concentrar el extracto (ver concentración en rotavapor).

7.3.4. Actividad antimicrobiana *in vitro* (Molina, 2005; Cáceres, 1998, CYTED, 1993, Mitcher, 1987; 1972)

- Preparación del Agar – Planta: preparar tubos con 9.0 mL Mueller Hinton. Esterilizar, dejar enfriar a 50°C y agregar 1 mL de la solución del extracto disuelto, el cual debe tener una concentración de 10 mg/mL. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL. Agitar y verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad. Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.
- Preparación del inóculo: purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Mueller Hinton inclinado, incubar a 36°C por 24 horas. Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Trypticase Soya, incubar a 36°C por 48 horas. Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua destilada estéril (dilución 1: 100). Utilizar *M. smegmatis* y *C. neoformans* sin dilución. Sembrar en cajas de Petri según la planta a utilizar.
- Demostración de la actividad antibacteriana: Inocular en cajas con Agar – Planta una asada de cada uno de los microorganismos (ver inciso anterior) siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cinco repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36°C

por 24 horas. Utilizar como control negativo 9 mL de Agar Mueller Hinton mezclado con 1 mL de etanol al 50%.

- Interpretación de resultados: si hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad negativa. Si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad positiva. Presencia de microorganismo fuera de la inoculación = contaminación.
- Determinación de la Concentración Inhibitoria Media CIM: Preparar cajas cuadruplicate con las siguientes diluciones del extracto:
 - 3.6 mL de Agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg/mL
 - 3.8 mL de Agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/mL
 - 3.9 mL de Agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/mL
 - 4 Un cuadrante con 4.0 mL de Agar como control negativo
- Inocular cinco estrías en cada uno de los cuadrantes e incubar a 36°C por 24 horas. Realizar la lectura e interpretar según el procedimiento descrito en el inciso anterior.

7.3.5. Actividad antioxidante: método de Cromatografía en Capa Fina (CCF) (Lima, 2003)

- Aplicar 10 µL de muestra y 5 µL del estándar antioxidante (β-caroteno, Rutina, Quercetina) en una placa cromatográfica de sílica gel 60F₂₅₄. Colocar la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo:ácido acético: ácido fórmico:agua (100:11:11:26). Secar y asperjar con 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (1 mg/mL en metanol)
- Resultados: si los extractos presentan actividad antioxidante se observará la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

7.3.6. Actividad antioxidante total por medio del reactivo (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) DPPH (técnica macrométrica) (Lima, 2003)

- Se prepara el extracto a ensayar pesando aproximadamente 0.1 g de extracto seco, luego se procede a diluirlo en 5 mL de metanol, y

finalmente se agita vigorosamente hasta diluir completamente el extracto.

a. Preparación de los tubos de reacción: Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran las sustancias contenidas en el agua del chorro. Los tubos se recubren completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz. Se prepara una serie de tubos que contienen los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Blanco Control	Control	Blanco de ensayo	Ensayo
Buffer de acetatos	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Metanol	2 ml	1.5 ml	1.9 ml	1.4 ml
Solución de DPPH	-	0.5 ml	-	0.5 ml
Muestra	-	-	0.1 ml	0.1 ml

Los tubos preparados de esta forma se agitan en un vortex durante 30 segundos y luego se incuban a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se leen a una longitud de onda de 517nm. Siempre debe leerse la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo. Realizar este ensayo en duplicado.

b. Preparación de la curva de lectura: Se realiza una serie de diluciones del extracto de la siguiente forma, conservando siempre las mismas proporciones:

Extracto	Metanol	Dilución
1	4	0.2
2	3	0.4
3	2	0.6
4	1	0.8
5	0	1.0

Las mediciones de cada una de estas diluciones se realiza siguiendo el paso anterior en el que se cita como se preparan los tubos de reacción. Cada dilución corresponde a una muestra. Realizar cada uno de los ensayos de las diluciones en duplicado.

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100$$

$$\text{Absorbancia del control} = \text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia blanco}$$

$$\text{Absorbancia del ensayo} = \text{Absorbancia ensayo} - \text{Abs. blanco respectivo}$$

Luego con los valores de % de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concertación aproximada (X) se procede a realizar la regresión lineal y calcular el valor de r^2 , el cual debe ser preferiblemente lo mas cercano a 1 para tomar como valida la curva realizada, de lo contrario se deberá realizar nuevamente el ensayo, hasta obtener un valor de r^2 adecuado.

Realizar los siguientes cálculos para obtener la actividad antioxidante total que se expresa como miligramos (concentración inhibitoria media CI_{50}):

Para extractos secos

$$CI_{50} = \frac{50\% - Pendiente}{Intersecto}$$

$$mg \text{ materia vegetal seca} = \frac{\left(\frac{\text{peso alícuota}}{\text{ml reconstitución}}\right) * 1000}{1} * CI_{50}$$

$$mg \text{ de extracto} = \frac{mg \text{ materia vegetal seca}}{Dilución}$$

$$mg \text{ de extracto seco} = mg \text{ extracto} - \left[\left(\frac{mg \text{ extracto}}{100}\right) * \% \text{ Humedad}\right]$$

7.3.7. Tamizaje Fitoquímico a través de ensayos macro y semimicro (Domínguez, 1985; Medinilla, 2010; Solís, 2005; Trease y Evans, 1991; Wagner, 2001)

7.3.7.1. 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: 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.

7.3.7.2. 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.

7.3.7.3. 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).

7.3.7.4. Investigación de aceites volátiles

- Cromatografía en capa fina:
 - Método A: Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano agitando por 15 minutos. Filtrar y evaporar en baño maría (60°C) a sequedad.
Disolver en 1 mL de tolueno y aplicar 20-50 µL en cromatoplaça 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 5µL (1:10) en cromatoplaça de silicagel 60 F₂₅₄.

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

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

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

7.4. Diseño de la investigación

Se compararon dos especies de laurel de marca comercial: para la especie *Litsea glaucescens* HBK usandose la marca Sasson y para la especie *Litsea guatemalensis* Mez la marca Quinfica.

7.4.1. Evaluación de actividad antibacteriana: se hizo un análisis de distribución binomial, en el cual se analizó cada especie de laurel de manera independiente. Para este ensayo se realizaron cinco réplicas para cada especie y cada uno de sus extractos, de acuerdo a la tabla de la distribución binomial para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

7.4.1.1. Análisis de resultados: en base a la Prueba de Hipótesis Binomial, donde p es la frecuencia de éxito, se analizó cada extracto (hexánico, clorofórmico y de acetato de etilo) de cada una de las especies de laureles:

Ho: $p \leq 0.5$ (no hay efecto significativo)

Ha: $p > 0.5$ (si hay efecto significativo)

Para rechazar Ho, se espera que las cinco replicas sean éxito

7.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante: se hizo un experimento con todos los extractos de las dos especies de laurel. Para cada extracto se hizo un análisis de regresión lineal, con una curva de “dosis – respuesta”. Dentro de esta regresión se analizó una ecuación, se determinó un coeficiente de determinación (r^2) el cual debe ser lo más cercano a 1 para tomar como válida la curva realizada. Así mismo se calcularon los intervalos de confianza para cada CI_{50} . Se realizaron tres repeticiones para cada extracto.

8. Resultados

8.1. Obtención de material vegetal y prueba de mejor solvente para percolación: En la tabla # 1 se puede observar la procedencia del material vegetal y la parte utilizada para los ensayos realizados. En la siguiente tabla (#2) se detallan los resultados obtenidos con los diferentes grados alcohólicos en la prueba de mejor solvente.

Tabla # 1: Obtención del material vegetal utilizado

Nombre científico	Nombre común	Marca utilizada	Cantidad	Parte utilizada	Estado de la droga
<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	Quinfica	1 lb	Hoja entera	Seco
<i>Litsea glaucescens</i>		Sasson			Seco

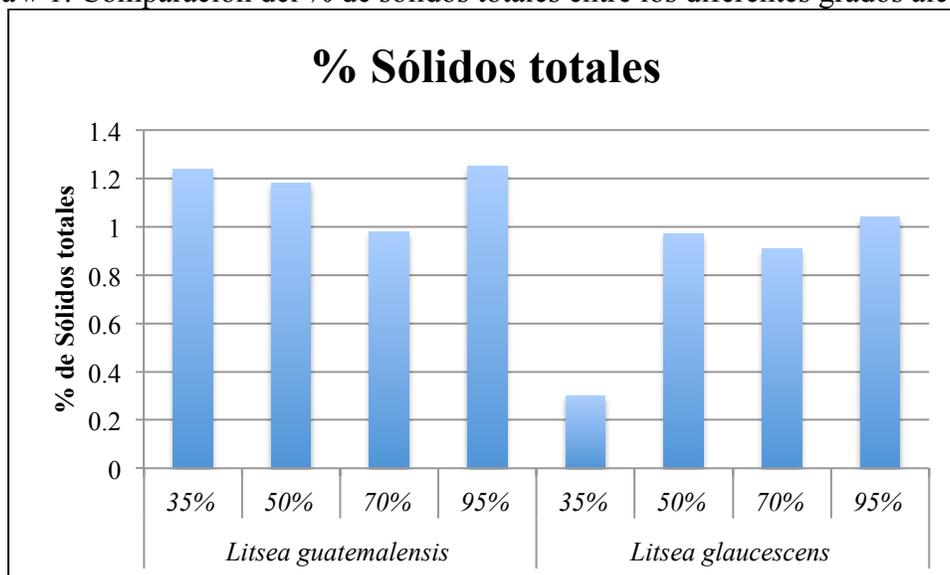
Fuente: Datos experimentales. (lb) = libras.

Tabla # 2: Prueba del mejor solvente

Especie	Grado alcohólico			
	35%	50%	70%	95%
<i>Litsea guatemalensis</i>	1.24%	1.18%	0.98%	1.25%
<i>Litsea glaucescens</i>	0.30%	0.97%	0.91%	1.04%

Fuente: Datos experimentales. (%) = porcentaje.

Gráfica # 1: Comparación del % de sólidos totales entre los diferentes grados alcohólicos



Fuente: Datos experimentales

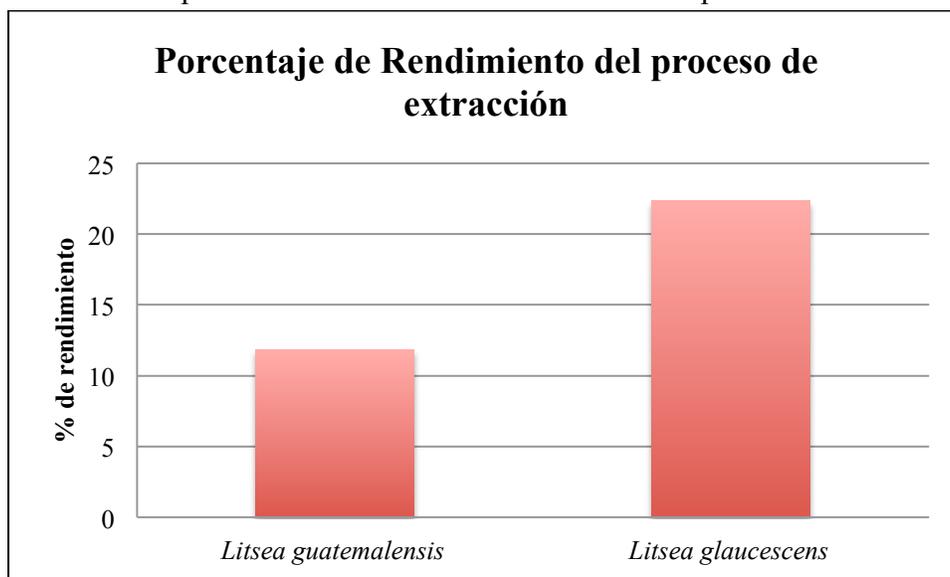
8.2. Obtención de extractos por percolación y concentración por medio de evaporador rotatorio: En la tabla # 3 se observa la cantidad de material vegetal empleado para la realización de cada extracto, la humedad de cada planta al momento de realizar la percolación, los sólidos totales obtenidos con el mejor solvente que fue el alcohol al 95%, la cantidad de extracto seco obtenido expresado en gramos y el porcentaje de rendimiento final de esta extracción. En la gráfica # 2 se puede observar la comparación del rendimiento de los extractos obtenidos para cada especie.

Tabla # 3: Proceso de extracción y concentración de extractos de laurel

Nombre científico	Nombre común	Material vegetal (g)	Humedad en material vegetal (%)	Solvente (mL)	Sólidos totales (%)	Extracto seco (g)	Rendimiento de extracción (%)
<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	200.1	10.7	2000 mL de etanol al 95%	1.25	23.6489	11.818
<i>Litsea glaucescens</i>	Laurel	200.0	10.3		1.04	44.6878	22.343

Fuente: Datos experimentales. (g) = gramos, (%) = porcentaje, (mL) = mililitros. (Ver fotografía de proceso en anexo 4-6)

Gráfica # 2: Comparación del rendimiento entre las dos especies con etanol al 95%



Fuente: Datos experimentales

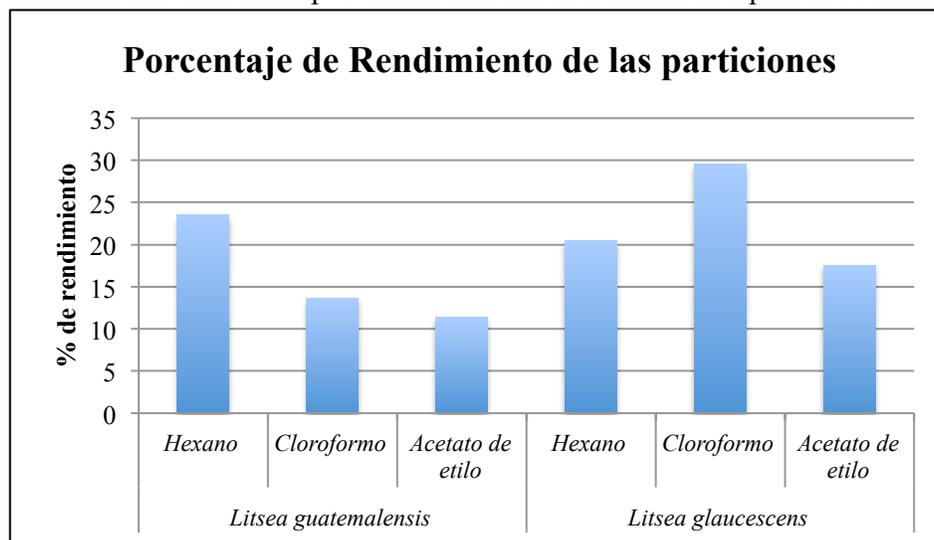
8.3. Fraccionamiento bioguiado: en la tabla # 4 se observa el procedimiento de fraccionamiento bioguiado que se utilizó para cada planta. Se inició la extracción con el solvente más apolar, hexano, y luego se siguió con cloroformo, medianamente polar, y se terminó con acetato de etilo, siendo el solvente más polar.

Tabla # 4: Fraccionamiento bioguiado para cada especie de laurel

<i>Litsea guatemalensis</i> (21.4398 g de extracto etanólico en 100 mL de etanol al 95%)		
Partición	Peso extracto seco	Porcentaje de rendimiento
Partición hexánica	5.0379 g	23.49%
Partición clorofórmica	2.9266 g	13.65%
Partición de acetato de etilo	2.4381 g	11.37%
<i>Litsea glaucescens</i> (21.1087 g de extracto etanólico en 100 mL de etanol al 95%)		
Partición	Peso extracto seco	Porcentaje de rendimiento
Partición hexánica	4.3157 g	20.44%
Partición clorofórmica	6.2476 g	29.59%
Partición de acetato de etilo	3.7020 g	17.53%

Fuente: Datos experimentales. (g) = gramos, (mL) = mililitros, (%) = porcentaje.
(Ver fotografía de proceso en anexo 7)

Gráfica # 3: Comparación de extractos de diferente polaridad



Fuente: Datos experimentales

8.4. Tamizaje antibacteriano: en la tabla # 5 y 7 se muestra el tamizaje antibacteriano que se realizó con los diferentes extractos de cada laurel. Se efectuaron 5 réplicas de acuerdo a la tabla de la distribución binomial para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Los resultados que se observan como positivos tienen efecto significativo (las cinco réplicas fueron consideradas como éxito), habiendo rechazado la hipótesis nula (ver inciso 7.4.1.1.). También se observan los resultados de la concentración inhibitoria mínima CIM (tabla # 6 y 5) para las bacterias y la levadura sensibles a los extractos estudiados.

Tabla # 5: Tamizaje antibacteriano para cada extracto de laurel a 1 mg/mL

Extractos		Bacterias					
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomona aureginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	-	-	+	+	-	-
	Cloroformo	-	-	+	+	-	-
	Acetato de etilo	-	-	+	-	-	-
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	-	-	+	+	-	-
	Cloroformo	-	-	+	+	-	-
	Acetato de etilo	-	-	+	+	-	-

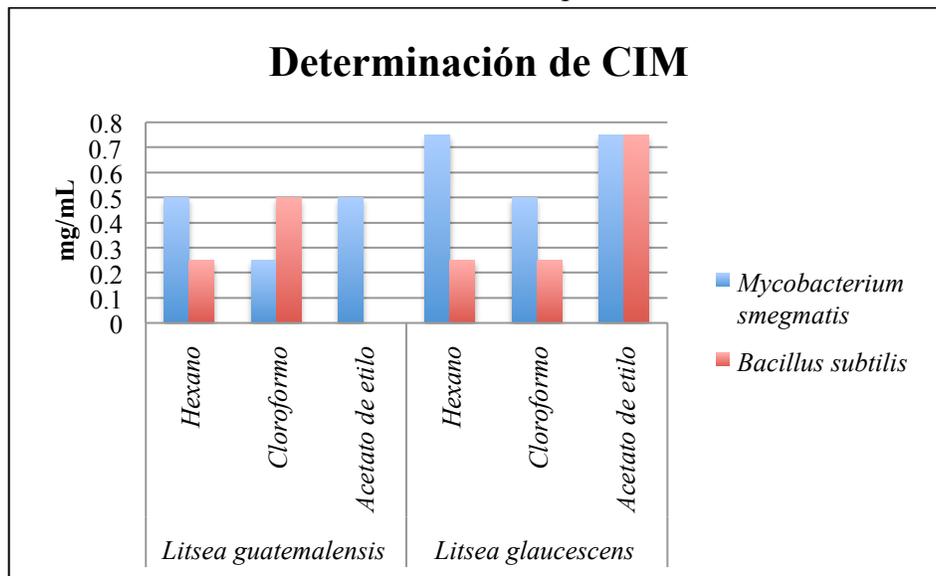
Fuente: Datos experimentales. (+) Inhibición del crecimiento de la bacteria, (-) Crecimiento de la bacteria. (Ver fotografía de proceso en anexo 8)

Tabla # 6: Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima CIM

Extracto		Batería de Bacterias	
		<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	0.50 mg/mL	0.25 mg/mL
	Cloroformo	0.25 mg/mL	0.50 mg/mL
	Acetato de etilo	0.50 mg/mL	> 1 mg/mL
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	0.75 mg/mL	0.25 mg/mL
	Cloroformo	0.50 mg/mL	0.25 mg/mL
	Acetato de etilo	0.75 mg/mL	0.75 mg/mL

Fuente: Datos experimentales.

Gráfica # 4: Determinación de CIM para bacterias sensibles



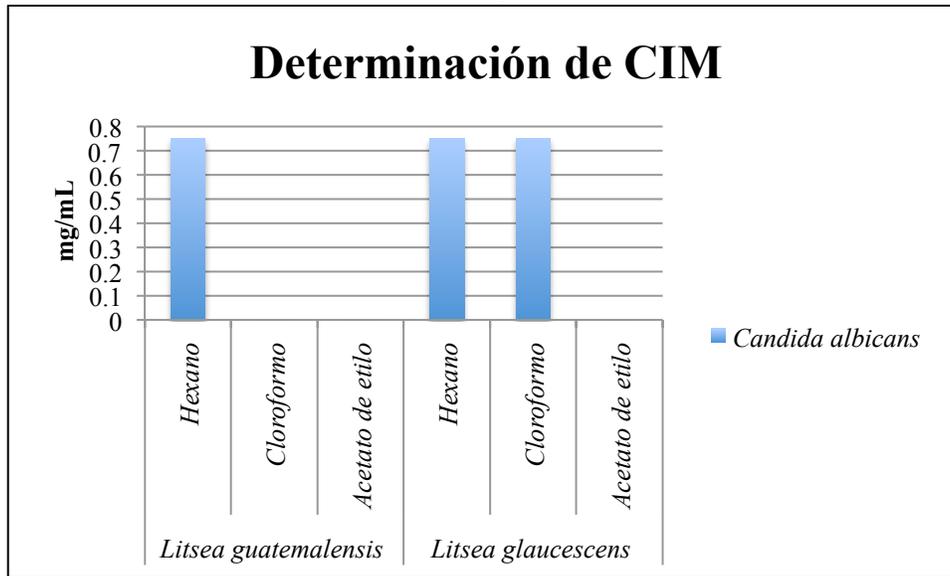
Fuente: Datos experimentales

Tabla # 7: Tamizaje antilevadura a 1 mg/mL y determinación de CIM para cada extracto

Extractos		Levadura	
		<i>Candida albicans</i>	CIM
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	+	0.75 mg/mL
	Cloroformo	-	-
	Acetato de etilo	-	-
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	+	0.75 mg/mL
	Cloroformo	+	0.75 mg/mL
	Acetato de etilo	-	-

Fuente: Datos experimentales. (+) Inhibición del crecimiento de levadura, (-) Crecimiento de la levadura. (Ver fotografía de proceso en anexo 8)

Gráfica # 5: Determinación de CIM para la levadura *Candida albicans*



Fuente: Datos experimentales

8.45 Determinación de la actividad antioxidante: La tabla # 8 muestra los resultados cualitativos de la cromatografía en capa fina CCF de la actividad antioxidante. Los resultados cuantitativos por medio del método de Difenilpicrilhidrazil DPPH se pueden observar en la tabla # 9 y se puede observar la comparación de ellos en la gráfica # 6.

Tabla # 8: Determinación de actividad antioxidante por medio de CCF

Especie	Extracto	Intensidad actividad antioxidante	Resultado
Estándares	Rutina	++++	Positivo
	β - Caroteno	+	Positivo
	TBHQ	++	Positivo
	Quercetina	+++	Positivo
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexánico	+	Positivo
	Clorofórmico	++	Positivo
	Acetato de etilo	++++	Positivo
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexánico	++	Positivo
	Clorofórmico	++++	Positivo
	Acetato de etilo	++++	Positivo

Fuente: Datos experimentales. (TBHQ) = ter-butil-hidroxi-quinona. (Ver fotografía de la cromatografía en anexo 9)

Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27)

Detección: reactivo de Difenilpicrilhidrazil (DPPH)

Tabla # 9: Determinación de la actividad antioxidante total por medio del reactivo DPPH*

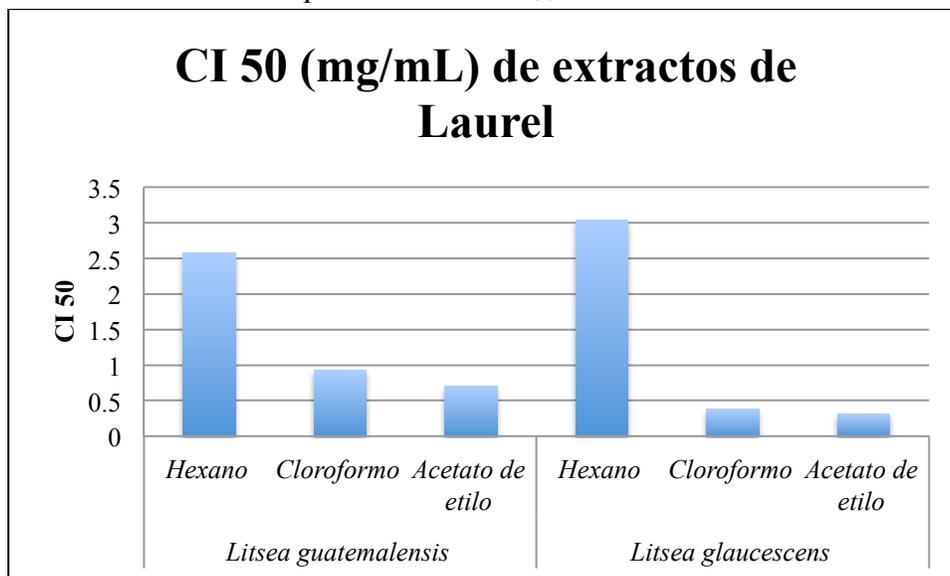
Planta	Extracto	Peso alícuota (g)	Volumen reconstitución (mL)	Factor de dilución	Porcentaje de inhibición (%)	Actividad antioxidante total expresada como CI ₅₀ (mg/mL)		
						mg extracto seco**	Valor mínimo	Valor máximo
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	0.4019	20	1:5	72.62	2.5815 ± 0.0500	2.5315	2.6315
	Cloroformo	0.4581	20	0.3:5	66.23	0.9272 ± 0.0092	0.9180	0.9364
	Acetato de etilo	0.4030	20	0.25:5	69.94	0.6985 ± 0.0159	0.6826	0.7144
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	0.4208	20	1:5	67.38	3.0331 ± 0.0550	2.9781	3.0881
	Cloroformo	0.4108	20	0.12:5	65.45	0.3768 ± 0.0021	0.3747	0.3789
	Acetato de etilo	0.4099	20	0.1:5	64.69	0.3093 ± 0.0057	0.3036	0.3150
Estándar	Vitamina C	0.020	10	0.008	67.40	0.01285		
	Vitamina E	0.010	5	0.18	65.45	0.2798		
	Rutina	0.040	20	0.012	65.57	0.02623		
	Quercetina	0.010	5	0.025	65.37	0.041146		
	TBHQ	0.010	5	0.08	68.71	0.1200		

Fuente: Datos experimentales. (g) = gramos, (mL) = mililitros, (%) = porcentaje, (CI₅₀) = Concentración inhibitoria media. (TBHQ) = ter-butil-hidroxi-quinona. (Ver fotografías de curva y gráficas en anexo 10).

*DPPH = Difenilpicrilhidrazil

**Promedio ± Desviación Estándar

Gráfica # 6: Comparación de las CI₅₀ de los diferentes extractos



Fuente: Datos experimentales

8.6. Caracterización química: En las siguientes tablas se puede observar el tamizaje fitoquímico de los metabolitos característicos, presentes en ambas especies, realizado en las diferentes fracciones. Para este se utilizaron ensayos macrométricos y cromatografías en capa fina.

Tabla # 10: Determinación de flavonoides por medio de cromatografía en capa fina

Planta	Extracto	No. banda	Color UV	Rf	Resultado	
Estándar	Quercetina – Rutina	1	Naranja	0.50	Estándar	
		2	Naranja	0.88		
	Ácido Clorogénico	1	Verde	0.61		
	Rutina	1	Naranja	0.47		
	Quercetina	1	Naranja	0.90		
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	1	Rojo	0.43	Positivo	
	Cloroformo	1	Lila	0.50	Positivo	
		2	Verde	0.61		
		3	Naranja	0.74		
		4	Naranja	0.83		
		5	Azul	0.93		
	Acetato de etilo	1	Lila	0.48	Positivo	
		2	Verde	0.61		
		3	Naranja	0.75		
		4	Naranja	0.84		
		5	Azul	0.90		
	<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	1	Lila	0.50	Positivo
			2	Naranja	0.70	
3			Naranja	0.77		
4			Naranja	0.84		
Cloroformo		1	Lila	0.48	Positivo	
		2	Verde	0.61		
		3	Naranja	0.74		
		4	Naranja	0.83		
		5	Naranja	0.85		
Acetato de etilo		1	Lila	0.47	Positivo	
		2	Verde	0.61		
		3	Naranja	0.74		
		4	Naranja	0.78		
		5	Azul	0.95		

Fuente: Datos experimentales. (Rf) = factor de retención. (Ver fotografía de la cromatografía en anexo 11)

Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27)

Detección: reactivo de Productos Naturales (NP/PEG)

Tabla # 11: Determinación de flavonoides mediante prueba macrométrica

Planta	Extracto	Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄	Cloruro férrico FeCl ₃	Ácido clorhídrico (HCl) + Calor	Magnésio metálico + HCl	Resultado	Coloración esperada
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	Aqua	Azul oscuro	Azul	Azul verdoso	Positivo	Amarillo a rojo, rojo a magenta, rojo, magenta, violeta, azul, amarillo, sin cambio de coloración
	Cloroformo	Amarillo	Azul oscuro	Café	Amarillo	Positivo	
	Acetato de etilo	Rojo tinto	Azul oscuro	Amarillo	Amarillo	Positivo	
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	Aqua	Amarillo	Azul	Azul	Positivo	
	Cloroformo	Rojo ladrillo	Azul	Sin cambio	Amarillo	Positivo	
	Acetato de etilo	Rojo tinto	Azul	Amarillo	Amarillo	Positivo	

Fuente: Datos experimentales

Tabla # 12: Determinación de cumarinas mediante prueba macrométrica

Planta	Extracto	Fluorescencia	Resultado
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	Azul	Positivo
	Cloroformo	Azul	Positivo
	Acetato de etilo	Verde	Positivo
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	Azul	Positivo
	Cloroformo	Azul	Positivo
	Acetato de etilo	Azul	Positivo

Fuente: Datos experimentales. (Ver fotografía de la cromatografía en anexo 12)

Tabla # 13: Determinación de cumarinas por medio de cromatografía en capa fina

Planta	Extracto	No. banda	Color UV	Rf	Resultado
Estándar	Cumarinas 1%	1	Amarilla	0.39	Estándar
	Ácido p-cumárico 1%	1	Azul	0.09	
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	1	Azul	0.07	Positivo
		2	Amarillo	0.35	
	Cloroformo	1	Azul	0.07	Positivo
	Acetato de etilo	1	Azul	0.09	Positivo
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	1	Azul	0.07	Positivo
	Cloroformo	1	Azul	0.09	Positivo
	Acetato de etilo	1	Azul	0.09	Positivo

Fuente: Datos experimentales. (Rf) = factor de retención. (Ver fotografía de la cromatografía en anexo 13)

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

Detección: hidróxido de potasio al 10%

Tabla # 14: Investigación de saponinas por medio de prueba de espuma

Planta	Extracto	Presencia de espuma (cm)	Resultado
Controles	Control de saponinas (0.5%)	2.0	+
	Agua	0	-
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	0.2	+
	Cloroformo	0.7	++
	Acetato de etilo	1.0	+++
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	0.3	+
	Cloroformo	0.8	++
	Acetato de etilo	0.9	+++

Fuente: Datos experimentales. (cm) = centímetro. (Ver fotografía en anexo 14)

Tabla # 15: Determinación de saponinas por medio de cromatografía en capa fina

Planta	Extracto	No. banda	Color Visible	Rf	Resultado
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	1	Rojo	0.13	Positivo
		2	Verde	0.17	
		3	Verde	0.21	
		4	Azul	0.31	
		5	Verde	0.39	
		6	Azul	0.54	
		7	Morado	0.59	
		8	Lila	0.71	
		9	Morado	0.79	
		10	Morado	0.87	
		11	Violeta	0.93	
	Cloroformo	1	Rojo	0.13	Positivo
		2	Azul	0.16	
		3	Morado	0.21	
		4	Azul	0.30	
		5	Verde	0.34	
		6	Azul	0.53	
		7	Morado	0.77	
		8	Azul	0.87	
		9	Morado	0.93	
Acetato de etilo	1	Verde	0.19	Positivo	
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	1	Verde	0.19	Positivo
		2	Morado	0.29	
		3	Verde	0.34	
		4	Morado	0.63	
		5	Lila	0.70	
		6	Morado	0.77	
		7	Morado	0.88	
		8	Violeta	0.93	
	Cloroformo	1	Verde	0.19	Positivo
	Acetato de etilo	1	Verde	0.19	Positivo
Estándar	Saponinas 0.1%	1	Azul	0.45	Estándar

Fuente: Datos experimentales. (Rf) = factor de retención. (Ver fotografía de la cromatografía en anexo 15)

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

Detección: vainillina – ácido sulfúrico

Tabla # 16: Investigación de aceites volátiles por medio de cromatografía en capa fina

Planta	Extracto	No. banda	Color Visible	Rf	Resultado
<i>Litsea guatemalensis</i>	Hexano	1	Amarillo	0.18	Positivo
		2	Verde	0.22	
		3	Rosado	0.26	
		4	Verde	0.32	
		5	Verde	0.40	
		6	Rojo	0.47	
		7	Rosado	0.56	
		8	Amarillo	0.62	
		9	Rosado	0.74	
		10	Azul	0.87	
		11	Rojo	0.96	
	Cloroformo	1	Amarillo	0.18	Positivo
		2	Verde	0.21	
		3	Rosado	0.25	
		4	Verde	0.32	
		5	Rosado	0.46	
		6	Azul	0.87	
Acetato de etilo	0	–	–	Negativo	
<i>Litsea glaucescens</i>	Hexano	1	Verde	0.19	Positivo
		2	Verde	0.22	
		3	Rosado	0.26	
		4	Verde	0.32	
		5	Rosado	0.35	
		6	Verde	0.38	
		7	Morado	0.53	
		8	Rosado	0.59	
		9	Morado	0.72	
		10	Azul	0.87	
		11	Morado	0.99	
	Cloroformo	1	Amarillo	0.12	Positivo
		2	Verde	0.18	
		3	Azul	0.35	
		4	Azul	0.87	
	Acetato de etilo	0	–	–	Negativo
	Estándar	1,8-Cineol	1	Verde	0.53
Limoneno		1	Morado	0.43	
Eugenol		1	Rosado	0.60	
Carvacrol		1	Azul	0.63	
Terpineol		1	Morado	0.35	
Acetato de linalilo		1	Morado	0.09	

Fuente: Datos experimentales. (Rf) = factor de retención. (Ver fotografía de la cromatografía en anexo 16)

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

Detección: anisaldehído – ácido sulfúrico

9. Discusión

La prueba del mejor solvente sirve para determinar, como su nombre le dice, cuál es el solvente que va a extraer la mayor cantidad de metabolitos secundarios. En las dos especies de laurel se determinó que el alcohol al 95% da un porcentaje mayor de sólidos totales y este es el que se utilizó para hacer el extracto etanólico (ver tablas 1 y 2, gráfica 1). En la tabla 3 y gráfica 2 se observa que, de las dos especies de laurel, *L. glaucescens* tuvo un mejor rendimiento de extracción usando el mismo solvente (etanol al 95%). Al hacer las particiones de cada especie se puede notar que esta misma tuvo mayor rendimiento en dos diferentes fracciones (ver tabla 2), lo cual se puede comparar en la gráfica 3.

Como se observa en la tabla 5, todos los extractos de las dos especies fueron activos contra la bacteria *M. smegmatis*, mientras que para *B. subtilis* fueron todos activos menos el de acetato de etilo de *L. guatemalensis*. Las concentraciones a las que los extractos inhibieron estas bacterias se detallan en la tabla 6 y gráfica 4. En estas se puede apreciar que los extractos de apolares y medianamente polares (hexano y cloroformo) de *L. glaucescens* tienen actividad significativa a concentraciones menores para la bacteria *B. subtilis*, que los de *L. guatemalensis*. De esta última especie se puede decir que los extractos tienen menor actividad biológica, ya que solo dos de ellos presentan actividad antibacteriana. El extracto hexánico si presenta la misma concentración de inhibición que el de *L. glaucescens* pero el clorofórmico necesita una mayor concentración para poder inhibir esta bacteria. Por lo tanto, los extractos apolares para las dos especies y el extracto clorofórmico de *L. glaucescens* son los que presentan mejor actividad contra *B. subtilis*. Así mismo, como se puede ver en la tabla 6 y en la gráfica 4, se necesita de una concentración menor para inhibir la bacteria *M. smegmatis* de los extractos clorofórmicos de ambas especies de laurel, siendo esta partición la más activa para esta bacteria. De las otras particiones se necesitan extractos más concentrados de ambas especies para poder inhibir a la bacteria.

En la tabla 7 se puede observar que las dos especies de laurel presentan fracciones apolares activas contra la levadura *C. albicans*, sin embargo la fracción clorofórmica de *L. glaucescens* presenta también actividad contra esta levadura por lo que hace que esta especie tenga mayor potencia. Al comparar las actividades entre bacterias y levaduras de

ambas especies de laurel, se puede observar que estos extractos poseen mayor actividad contra bacterias que contra levaduras, por lo que se comprueba lo que se reporta en la literatura de que estas especies tienen moderada actividad contra *C. albicans* (Cáceres, 2009)

Se han reportado en estudios anteriores a nivel mundial, que ciertas familias de especies culinarias poseen antioxidantes derivados de compuestos fenólicos; y entre estas se encuentra la familia Lauraceae (Hinneburg, 2005). Es por esto que, de manera cualitativa se puede observar en la tabla 8, la presencia de compuestos antioxidantes por medio de la cromatografía en capa fina. En esta tabla se puede ver que las fracciones polares de las dos especies presentan una actividad mayor que las fracciones apolares; así mismo también se puede observar que la fracción de acetato de etilo de *L. guatemalensis* y la fracción clorofórmica y de acetato de etilo de *L. glaucescens* tienen la misma intensidad de actividad antioxidante que el estándar de rutina y presentan mayor intensidad que los otros estándares (β – Caroteno y Quercetina) incluyendo el estándar sintético ter-butil-hidroxi-quinona (TBHQ). Esta prueba cualitativa puede dar una idea general de que extractos dan una mayor actividad en la prueba cuantitativa.

Como se puede ver en la tabla 9 la mejor actividad antioxidante se encontró en los extractos de acetato de etilo de ambas especies, esto indica que los metabolitos con características polares son los que tienen mejor actividad. Para *L. guatemalensis* se determinó una CI_{50} de 0.6985 mg/mL y para *L. glaucescens* fue de 0.3093 mg/mL; por lo que se puede observar que *L. glaucescens* tiene mejor actividad ya que se necesita menor cantidad de extracto para obtener un 50% de actividad antioxidante. La segunda mejor actividad para ambas especies la poseen los extractos clorofórmicos, en los cuales también predominan características polares. En estas especies también se puede observar que, al igual que en el acetato de etilo, se observa una mejor actividad con *L. guatemalensis* presentando 0.3768 mg/mL de inhibición en comparación de 0.9272 mg/mL de *L. glaucescens*. Al comparar la actividad antioxidante que tuvieron los extractos hexánicos apolares con los polares se determina que, es necesaria una mayor concentración de estos para llegar al efecto deseado; y, entre las dos especies, *L. guatemalensis* tiene una mejor actividad ya que necesita una menor concentración de inhibición. Como anteriormente se expuso, entre las dos especies de laurel

se puede ver una clara diferencia al comparar la concentración inhibitoria media CI_{50} ; y se puede decir que *L. glaucescens* tiene una mayor actividad antioxidante en sus metabolitos polares (ver gráfica 6). Los estándares ensayados tuvieron una mejor actividad que los extractos debido a que la CI_{50} es menor. Los extractos que más se aproximan en concentración al estándar de TBHQ (ter-butil-hidroxi-quinona) son el de clorofórmico y el de acetato de etilo de *L. glaucescens*, pero se necesita aproximadamente el doble de los extractos para llegar a la misma concentración que este estándar.

Los compuestos antioxidantes que se encuentran de manera natural en las plantas son de carácter fenólico (Maestro, 1993). Como se observa en la cromatografía en capa fina, las fracciones polares (acetato de etilo) y medianamente polares (clorofórmica) de las dos especies tienen una mayor cantidad de flavonoides que las particiones apolares. Entre las dos especies se observa la misma cantidad de flavonoides en las particiones polares y medianamente polares pero en *L. glaucescens* hay mayor cantidad de flavonoides en el extracto hexánico que en el de la otra especie. Por regla general, los heterósidos son hidrosolubles (como se puede observar en las fracciones polares); pero hay muchos que poseen escasa hidrosolubilidad, como los rutósidos, y otros que son lipófilos que se encuentran en los tejidos superficiales de hojas (Bruneton, 2001). Estos se pueden extraer con facilidad con solventes apolares como el hexano, explicando las diversas bandas que aparecen en el *L. glaucescens* y la banda del *L. guatemalensis*.

Las cumarinas se caracterizan por tener en su estructura un sistema benzo-alfa-pirona. Los heterósidos de las cumarinas son más o menos solubles en agua (Bruneton, 2001). Debido a esta característica se observa que hay mayor presencia de estos compuestos en la fracción hexánica de *L. guatemalensis*, y una sola cumarina en las fracciones polares y medianamente polares de las dos especies de laurel (ver tabla 13). Una de las bandas de cumarinas de la fracción hexánica de *L. guatemalensis* posee un factor de retención, R_f , muy similar al del estándar de cumarinas, por lo que se puede deducir que esta banda presenta una estructura muy similar a la característica de las cumarinas. Cada una de estas cumarinas dieron resultados positivos en las pruebas macrométricas (ver tabla 12).

Como se observa en la tabla 15, las saponinas predominantes en las dos especies de laureles son aquellas que son solubles en el hexano; debido a que las estructuras generales de estos compuestos son esteroides o de triterpenos (Bruneton, 2001). En *L. guatemalensis* se puede observar una gran cantidad de estos principios en la fracción clorofórmica. Esto posiblemente a los azúcares a los cuales está unida la saponina, creando una parte polar unida a la parte apolar de la molécula y pudiéndose así arrastrar por este tipo de solvente. Como es de esperarse, en las fracciones polares se puede observar solo una saponina en las dos especies debido a las características fisicoquímicas de estos compuestos. Todas estas saponinas cumplieron la prueba de espuma, como se describe en la tabla 14.

Como se indica en la sección 3.8, las dos especies de laurel presentan aceite esencial. Estos presentan una diversidad de componentes que son altamente solubles en los solventes apolares y medianamente polares como el hexano y el cloroformo (Bruneton, 2001). Dentro de los compuestos solubles en hexano se pueden mencionar los monoterpenos, entre ellos los monoterpenos oxigenados y los hidrocarburos monoterpénicos; y dentro de los compuestos solubles en cloroformo se pueden mencionar los sesquiterpenos (Ortiz, 2005). Debido a esta afinidad por los solventes, se puede ver en la tabla 16 que la porción hexánica en *L. guatemalensis* posee 11 componentes, al igual que la de *L. glaucescens*; y que la porción clorofórmica de *L. glaucescens* posee una menor cantidad de compuestos (sólo cuatro), en comparación de la de *L. guatemalensis* que posee seis. Como era de esperarse, en la porción polar no hay presencia de aceites debido a que estos no son afines a esta fase. Los componentes que pueden estar en la fase hexánica de *L. guatemalensis* según Ortiz en su estudio del 2005 son los siguientes: 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol, trans-dihidrocarvona, cis-dihidrocarvona, carvona, l-carvona, borneol, limoneno, α -pineno, γ -terpineno, β - pineno, canfeno, ρ -cimeno. En la fase clorofórmica de esta especie se detectaron los siguientes compuestos: nerolidol, β -cariofileno, cis- α -bisaboleno. En *L. glaucescens* se detectó en el extracto hexánico los siguientes compuestos: 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol, l-carvona, borneol, limoneno, α -pineno, γ -terpineno, β - pineno, canfeno. En la fase clorofórmica de esta especie detectaron los siguientes compuestos: nerolidol, β -cariofileno.

10. Conclusiones

- 10.1. Los extractos que presentan mayor actividad antibacteriana contra *M. smegmatis* son los clorofórmicos para ambas especies, presentando una concentración inhibitoria mínima de 0.25 mg/ml para *L. guatemalensis* y 0.50 mg/ml para *L. glaucescens*.
- 10.2. Los extractos hexánicos de ambas especies y el extracto clorofórmico de *L. glaucescens* son los que presentan una mejor actividad contra *B. subtilis* a una concentración de 0.25 mg/ml.
- 10.3. Los extractos hexánico y clorofórmico de *L. glaucescens* y hexánico de *L. guatemalensis* presentaron actividad contra la levadura *C. albicans* a una concentración inhibitoria de 0.75 mg/ml.
- 10.4. La especie de laurel que presenta mejor actividad contra bacterias y la levadura es *L. glaucescens* teniendo mejor actividad en los extractos hexánico y clorofórmico.
- 10.5. El extracto hexánico de *L. guatemalensis* presentó un CI_{50} de 2.5815 mg/mL, mientras que el extracto clorofórmico y de acetato de etilo presentaron un CI_{50} de 0.9772 mg/mL y de 0.6985 mg/mL, respectivamente.
- 10.6. El extracto hexánico de *L. glaucescens* presentó un CI_{50} de 3.0331 mg/mL, mientras que el extracto clorofórmico y de acetato de etilo presentaron un CI_{50} de 0.3768 mg/mL y de 0.3093 mg/mL, respectivamente.
- 10.7. De todos los extractos ensayados, el extracto de acetato de etilo de *L. glaucescens* presentó actividad antioxidante con un CI_{50} de 0.3093 mg/mL.
- 10.8. El extracto hexánico de *L. guatemalensis* presenta un flavonoide y el de *L. glaucescens* presenta cuatro bandas. Los extractos clorofórmicos y de acetato de etilo de las dos especies presentan cinco bandas de flavonoides cada uno.

- 10.9. El extracto hexánico de *L. guatemalensis* presenta dos bandas de cumarinas, mientras que los demás extractos de esta especie y los tres de *L. glaucescens* presentan únicamente una banda de cumarina.
- 10.10. Los extractos hexánicos y clorofórmicos de *L. guatemalensis* presentan mayor cantidad de saponinas (once y nueve respectivamente) que el extracto de acetato de etilo que presenta una única banda. Para *L. glaucescens*, el extracto hexánico presenta mayor cantidad de saponinas (ocho bandas) que los extractos clorofórmico y de acetato de etilo que presentan una sólo banda cada uno.
- 10.11. Los extractos hexánicos de ambas especies presentan once compuestos de aceite esencial, mientras que el extracto clorofórmico de *L. guatemalensis* presenta seis bandas y el de *L. glaucescens* presenta cuatro bandas. Los extractos de acetato de etilo de las dos especies no presentan ningún compuesto de aceite esencial.

11.Recomendaciones

- 11.1. Dilucidar las estructuras de los compuestos activos de cada fracción de las dos especies estudiadas.
- 11.2. Estudiar diferentes partes de las plantas para determinar si la actividad se encuentra en toda la planta o solo en las hojas.
- 11.3. Complementar el estudio con otros métodos de detección de actividad antibacteriana, como el método por difusión; así mismo como con otros métodos de inhibición de radicales libres para la actividad antioxidante.
- 11.4. Realizar estudios de otras especies del género *Litsea* y compararlos con los resultados de estas dos especies.

12.Referencias

- Alvarez Hernández, A. (1999). Espectro de acción inhibitoria de una infusión de laurel (*Litsea glaucescens*) sobre el crecimiento de microorganismos cariogénicos *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans* in vitro. (Tesis de graduación de Licenciatura). Facultad de Odontología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala
- Anderson, J., *et al.* (1991) A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Anal.* 2: 107-111.
- Cáceres, A; *et al.* (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 62: 195-202
- Bruneton, J. (2001) *Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas Medicinales.* España: Editorial Acribia, S.A.
- Cáceres, A. (1996) *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala.* Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cáceres, A. (2009) *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales.* Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cannell, R. (1998) *Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation.* USA: Human Press, Inc.
- Chariandy, M., *et al.* (1999) Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology.* 64: 265- 270.
- Cox, P., y Balick, M., (1994) The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, June. pp. 82-87.
- CYTED. (1993) *Manual de Técnica de Investigación.* Bogotá, Proyecto X-1.
- Domínguez, X. (1985) *Métodos de Investigación Fitoquímica.* México: Editorial Limusa.
- España, SM., *et al.* (1994) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia.* 65: 273-274.
- Havsteen, B., (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoides. *Pharmacol. Therapeut.* 96:67-202.

- Hernández, R., Gally, M. (1981) Plantas Medicinales. México: Árbol Editorial.
- Hernández Méndez, I. (2007). Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio, de hoja de *Solanum hatwegii* Benth. (Huiz), de hoja de *Litsea guatemalensis* Mez. (Laurel), y de hoja de *Piper jacquemontianum* Kunth. Cordoncillo). (Tesis de graduación de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Hinneburg, I., *et al.* (2006) Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chem. 97:122-129.
- Hirayama, O., *et al.* (1997) Evaluation of antioxidant activity by chemiluminiscence. Anal. Biochem. 247:237-241.
- Imark, C., *et al.* (2001) Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits. Innovat. Food Sci. Emerg. Tech. 1:239-243.
- Jones, S. (1987) Sistemática vegetal. México: McGrawHill.
- Kuklinski, C. (2000) Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega. 515 p.
- Lima, S . (2003) Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*) (Tesis de graduación de Licenciatura). Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- López Salazar, K. (2009). Extracción y caracterización fisicoquímica de la oleorresina de la hoja de laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) a nivel laboratorio, utilizando tres concentraciones de solvente. (Tesis de graduación de Ingeniería Química). Facultad de Ciencias Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Lock, O. (1994). Investigación Fitoquímica. 2a edición. Fondo Editorial. Perú. 300 p.
- Maestro, R., Borja, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Grasas y Aceites: International Journal of Fats and Oils. Vol 4. Fasc. 2: 101 – 106.
- Martínez, M., *et al.* (1997) Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Revista Cubana Plantas Med. 2(1): 12-14.
- Medinilla, B. (2002) Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

- Mitscher, L., *et al.* (1987) A modern look at folkloric use anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 5: 1025-1041.
- Mitscher, L., *et al.* (1972) Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia.* 35: 157-166.
- Molina, R. (2005) Determinación de la actividad biocida del extracto etanólico y sus particiones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata* L. (Jorobté). (Tesis de graduación de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Montero, M. (2007) Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Editorial Ciencias Médicas. España.
- Murphy, M. (1999) Plant drug as antibacterial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12, No. 4, p. 564–582
- Ortiz Quiroa, C. (2005). Obtención y comparación fisicoquímica a nivel de laboratorio del aceite esencial de laurel de dos diferentes especies (*Litsea guatemalensis* Mez. y *Litsea glaucescens* HBK.) colectadas en tres diferentes lugares. (Tesis de graduación de Ingeniería Química). Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Real Farmacopea Española (2002) 2a edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 p.
- Ríos, J., *et al.* (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal of Ethnofarmacoly* 28: 127-149.
- Sandberg, F. (1967) *Pharmacological Screening of Medicinal Plants.* Government, Colombo, Shrilanka.
- Santa Cruz, L. Manual: Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. 92 p.
- Sharapin, N. (2000) *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos.* Santafé de bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247p.
- Solís, P. *et al.* (2005) Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos (OEA/AICD/AE 089/03).
- Trease y Evans. (1991) *Farmacognosia.* México: Interamericana McGraw Hill.

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.

1. Anexos

Anexo No. 1: Clasificación botánica de las especies

Reino	Plantae	Plantae
Subreino	Embryobionta	Embryobionta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Subclase	Magnolidae	Magnolidae
Orden	Laurales	Laurales
Familia	Lauraceae	Lauraceae
Género	Litsea	Litsea
Espécie	<i>Litsea glaucescens</i>	<i>Litsea guatemalensis</i>

Fuente: Herbario BIGU. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.

Anexo No. 2: Dibujo del género *Litsea*



Fuente: <http://www.lookfordiagnosis.com/images.php?term=Litsea&lang=2&from=56>

Anexo No. 3: Fotografías de *Litsea guatemalensis* y *Litsea glaucescens*

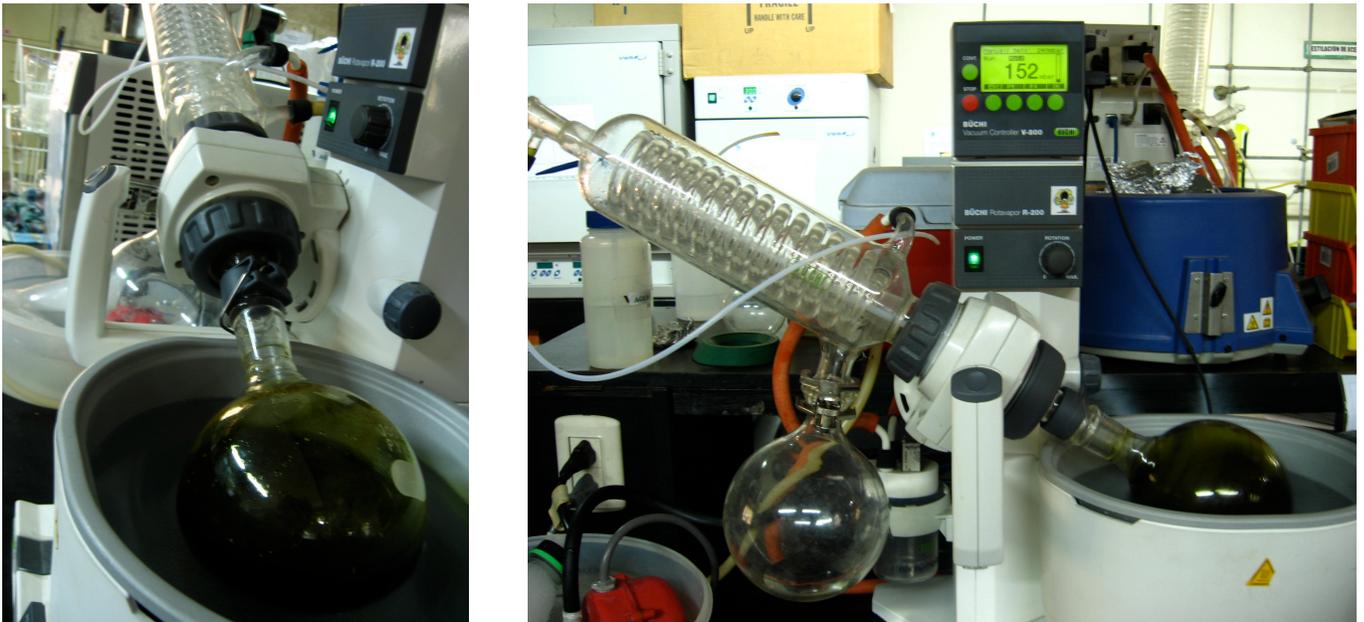


Anexo No. 4: Fotografía del percolador con *Litsea guatemalensis* y *Litsea glaucescens*



Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 5: Concentración por medio de evaporador rotatorio



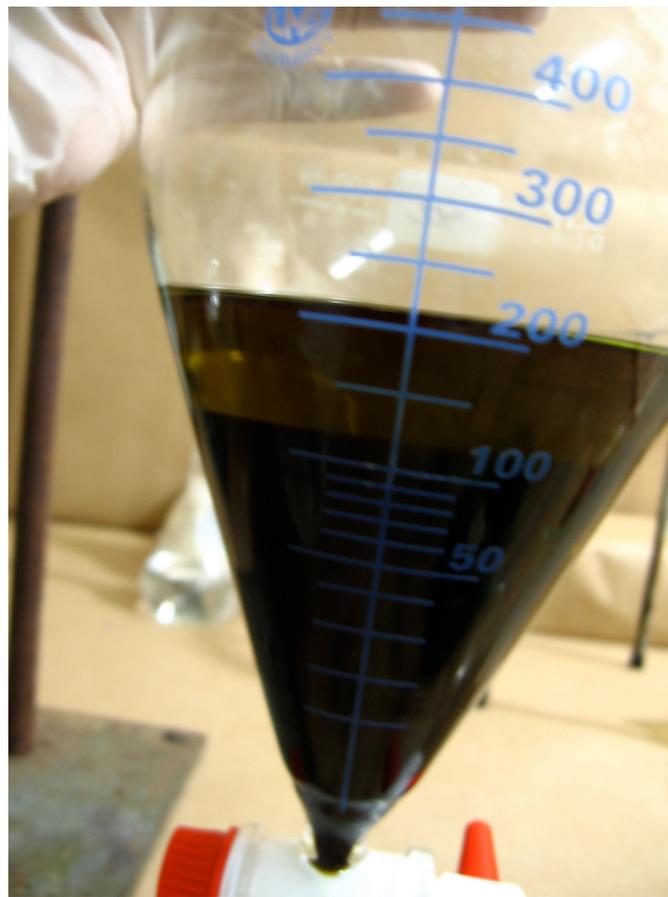
Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 6: Cristalizadores con extracto seco de laurel



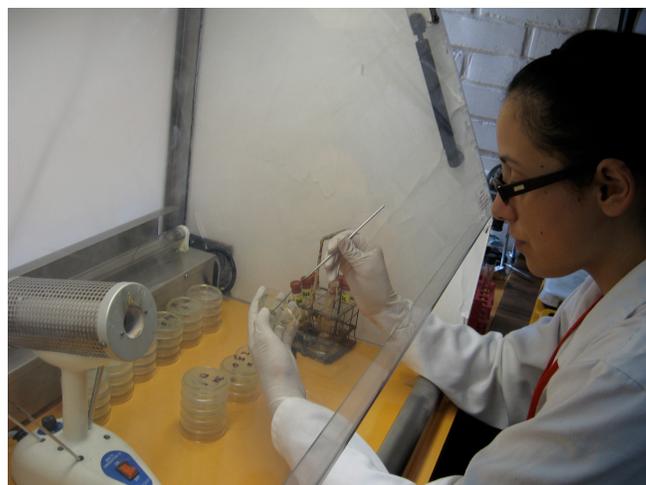
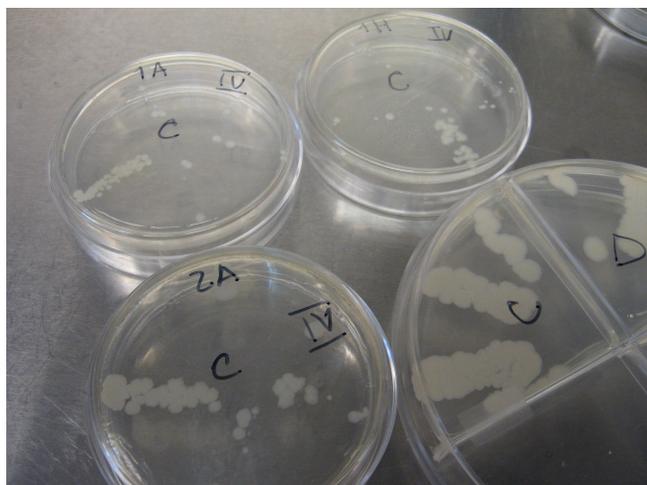
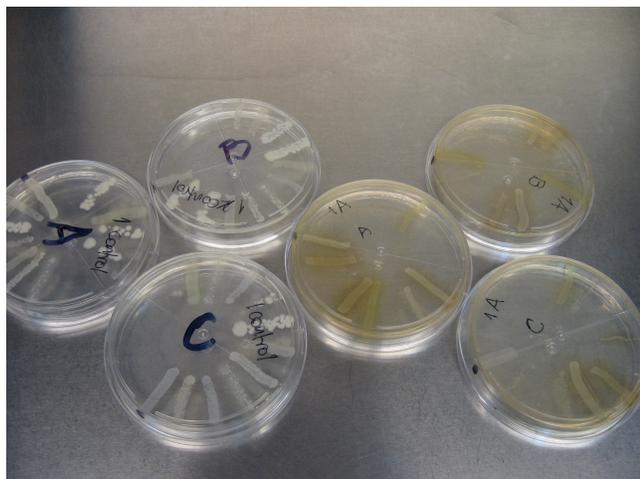
Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 7: Fraccionamiento bioguiado de ambas especies de laurel



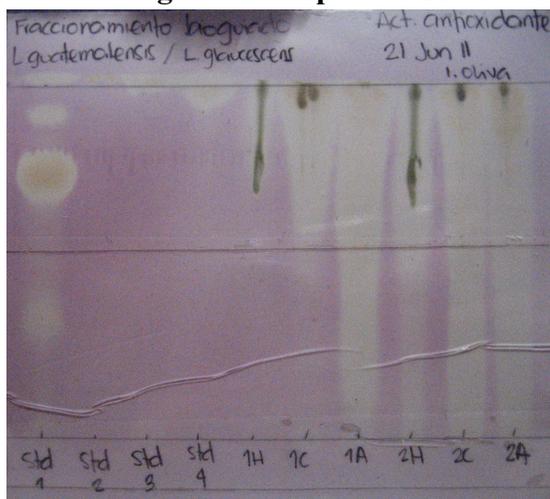
Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 8: Tamizaje antibacteriano



Fuente: Datos experimentales

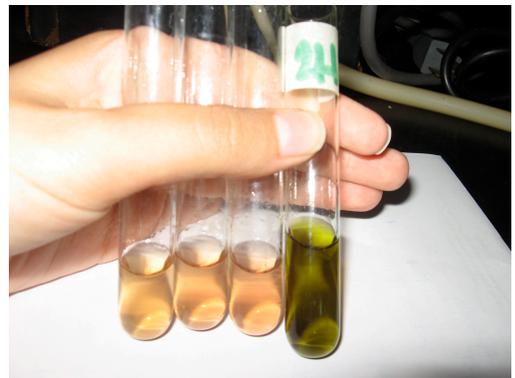
Anexo No. 9: Cromatografía en capa fina de actividad antioxidante



Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 10: Actividad antioxidante por método de DPPH

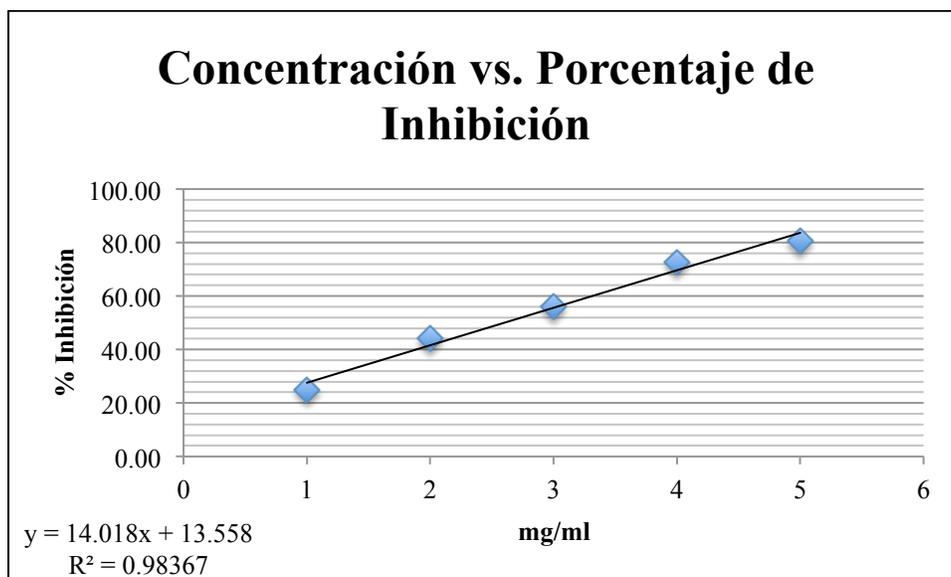
Fotografías de la curva colorimétrica en tubos de ensayo



Fuente: Datos experimentales

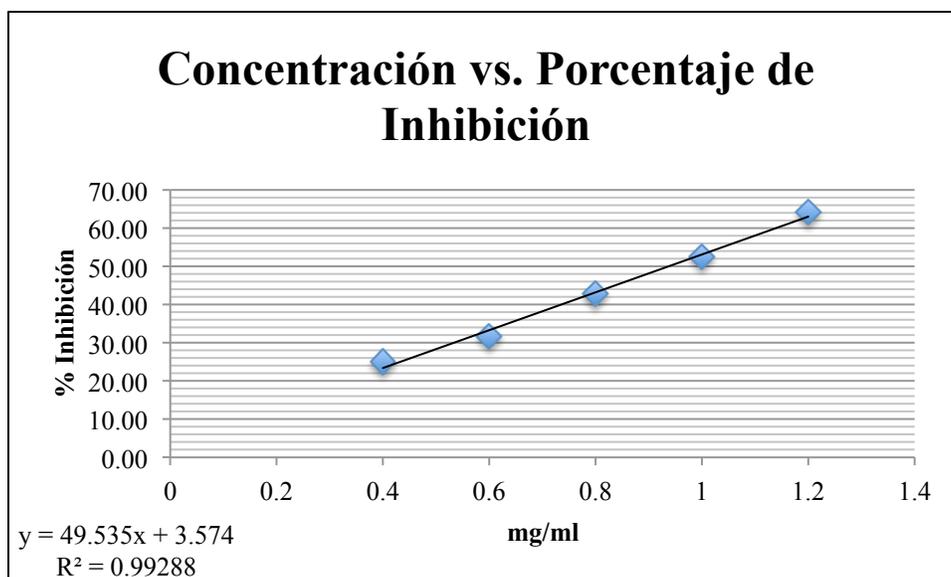
Curvas de calibración para la cuantificación por medio del método de DPPH

10.1 Extracto hexánico de *L. guatemalensis*



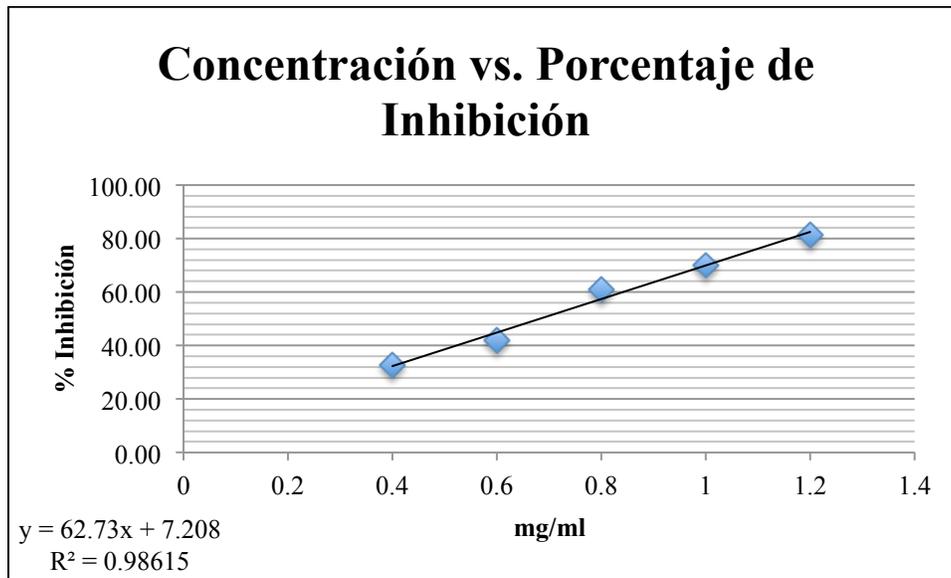
Fuente: Datos experimentales

10.2 Extracto clorofórmico de *L. guatemalensis*



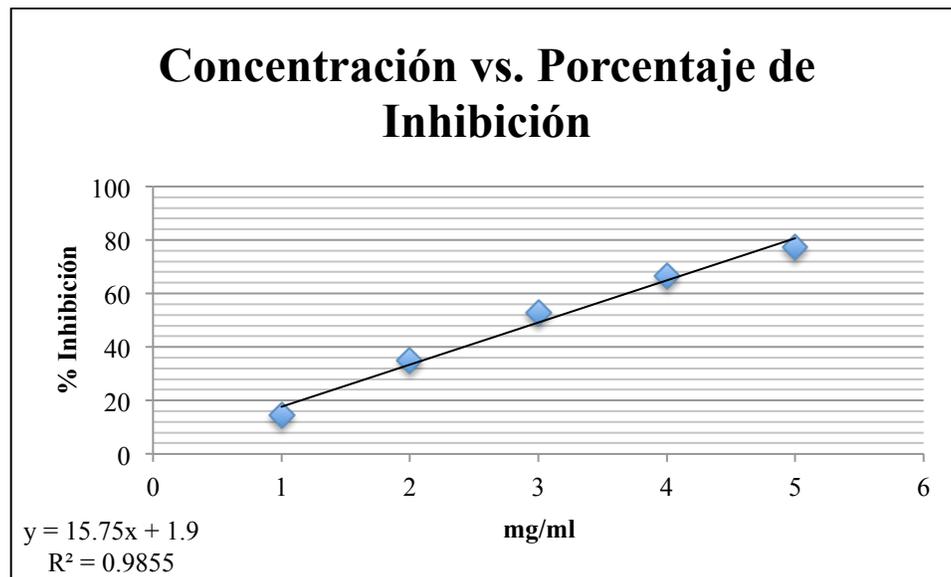
Fuente: Datos experimentales

10.3 Extracto de acetato de etilo de *L. guatemalensis*



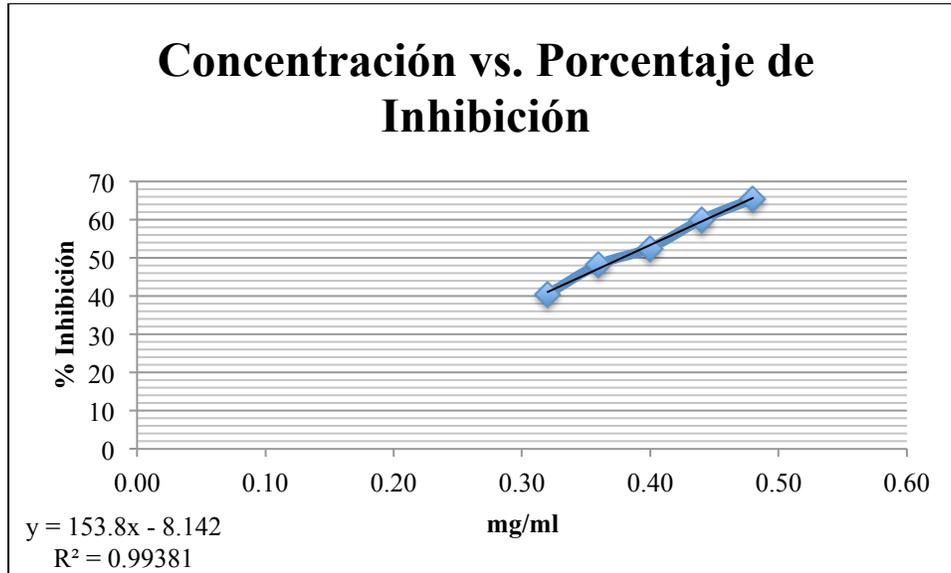
Fuente: Datos experimentales

10.4 Extracto hexánico de *L. glaucescens*



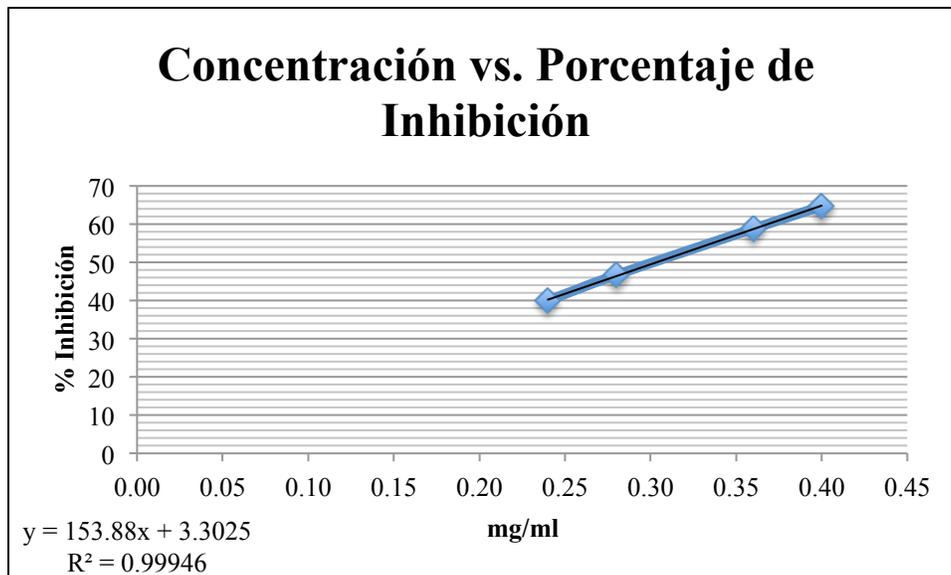
Fuente: Datos experimentales

10.5 Extracto clorofórmico de *L. glaucescens*



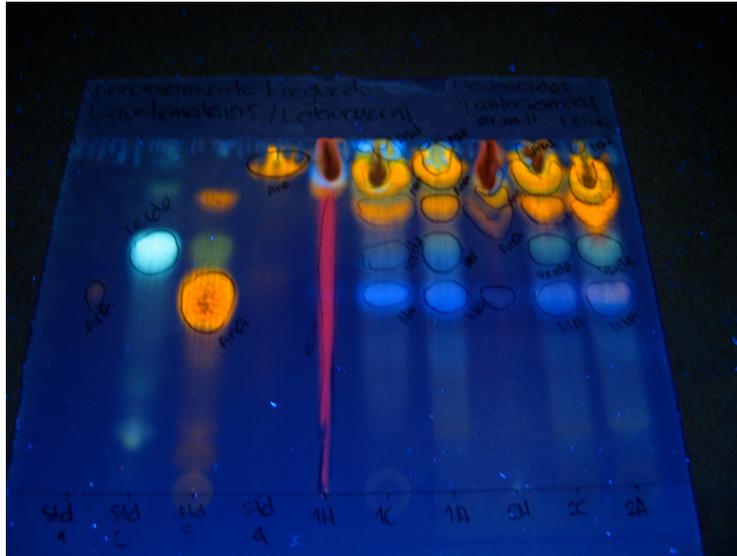
Fuente: Datos experimentales

10.6 Extracto de acetato de etilo de *L. glaucescens*



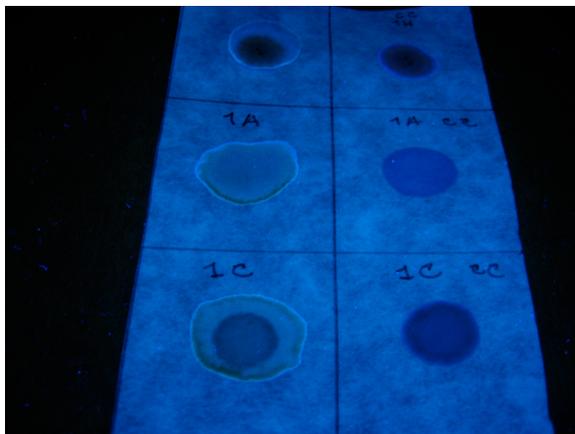
Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 11: Cromatografía en capa fina de flavonoides, longitud de onda larga

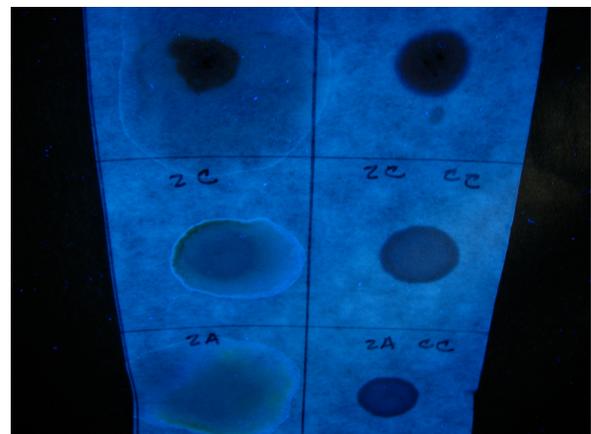


Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 12: Ensayo macrométrico de cumarinas, longitud de onda larga

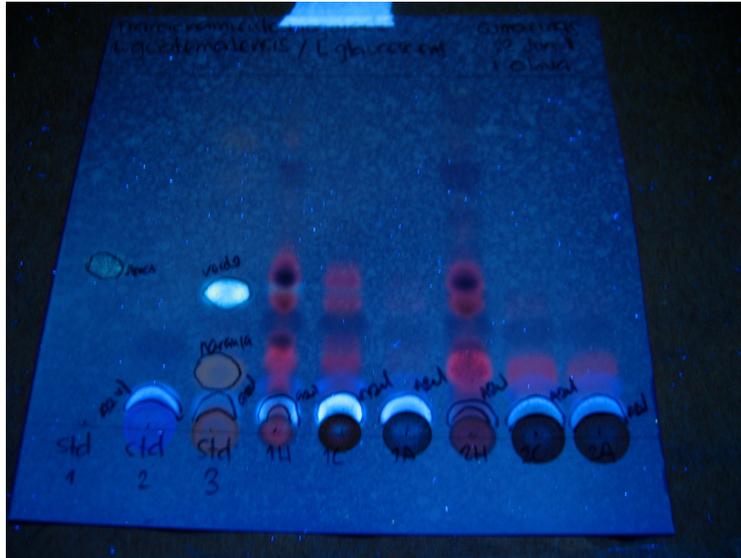


Prueba cumarinas de *L. guatemalensis*



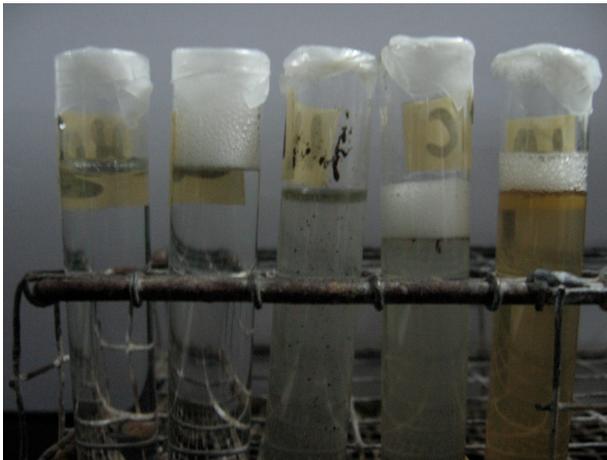
Prueba de cumarinas de *L. glaucescens*

Anexo No. 13: Cromatografía en capa fina de cumarinas

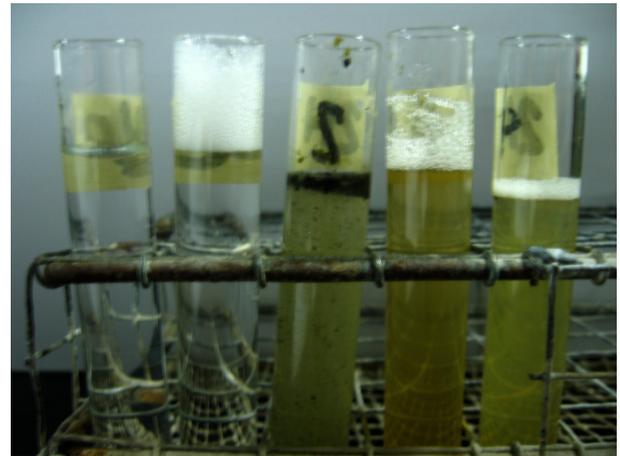


Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 14: Prueba de espuma para saponinas



Prueba de espuma de *L. guatemalensis*



Prueba de espuma de *L. glaucescens*

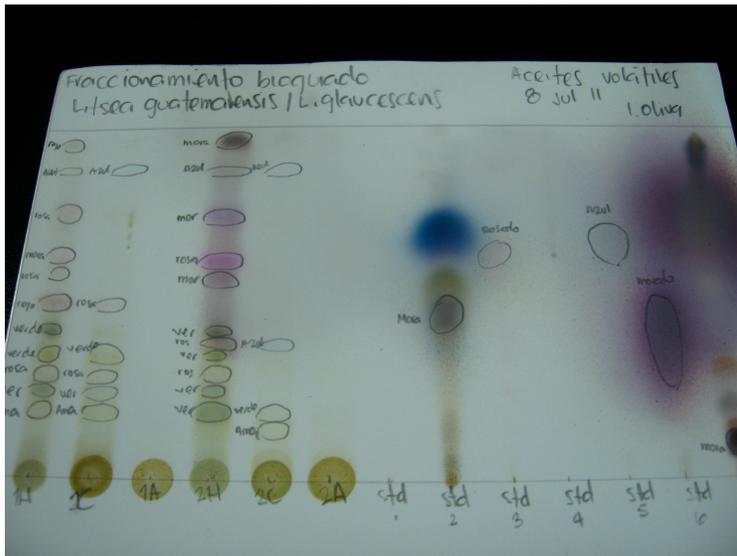
Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 15: Cromatografía en capa de saponinas



Fuente: Datos experimentales

Anexo No. 16: Investigación de aceites volátiles por medio de cromatografía en capa fina



Fuente: Datos experimentales