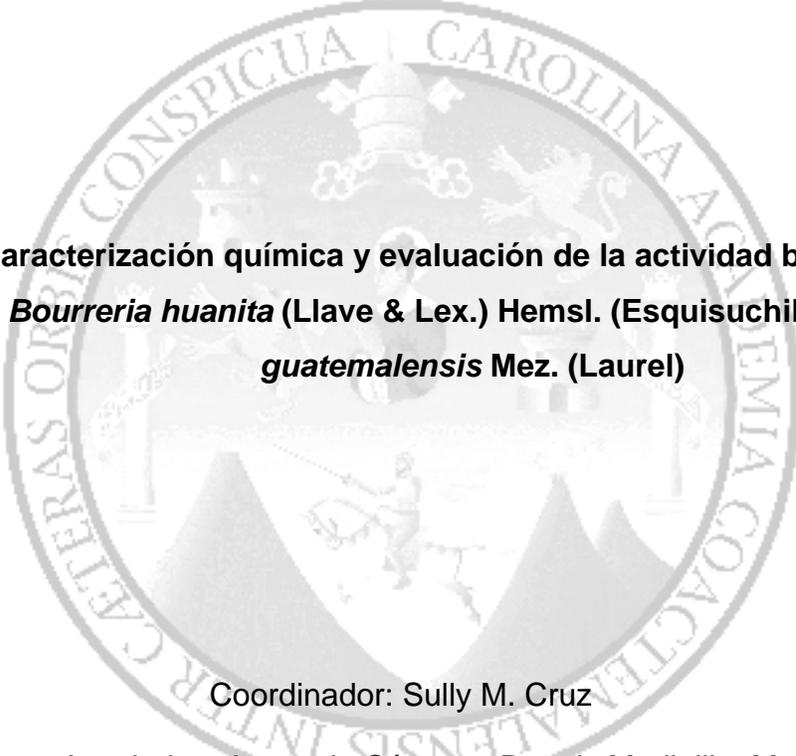


**Universidad de San Carlos de Guatemala**  
**Dirección General de Investigación (DIGI)**  
**Programa Universitario de Ciencias Básicas (PICB)**



**Caracterización química y evaluación de la actividad biológica de**  
***Bourreria huanita* (Llave & Lex.) Hemsl. (Esquisuchil) y *Litsea***  
***guatemalensis* Mez. (Laurel)**

Coordinador: Sully M. Cruz

Investigadores Asociados: Armando Cáceres, Beatriz Medinilla, Maria Eugenia Paredes, Rodolfo Orozco.

Auxiliares de Investigación II: Edna García y Herlinda Letrán.

Febrero – Diciembre 2008.

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**  
**Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB)**  
**Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)**

## INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
4. JUSTIFICACIÓN	9
5. OBJETIVOS	10
6. METODOLOGÍA	11
7. RESULTADOS	22
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
9. CONCLUSIONES	54
10. RECOMENDACIONES	56
11. BIBLIOGRAFÍA	57
12. ANEXOS	60

## INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Determinación de Humedad	22
Tabla No. 2 Determinación de Cenizas	22
Tabla No. 3 Determinación del mejor disolvente	23
Tabla No. 4 Porcentaje de rendimiento de extractos	23
Tabla No. 5 Porcentaje de rendimiento de particiones	24
Tabla No. 6 Porcentajes de rendimientos de aceite esencial de <i>Bourreria huanita</i>	24
Tabla No. 7 Porcentajes de rendimientos de aceite esencial de <i>Litsea guatemalensis</i>	25
Gráfica No. 1 Cromatograma del aceite esencial de <i>L. guatemalensis</i>	26
Tabla No. 8 Composición química del aceite esencial de <i>L. guatemalensis</i>	26
Gráfica No. 2 Cromatograma del aceite esencial de <i>B. huanita</i>	27
Tabla No. 9 Composición química del aceite esencial de <i>B. huanita</i>	27
Tabla No. 10 Prueba de alcaloides	28
Tabla No. 11 Prueba de flavonoides	28
Tabla No. 12 Prueba de antraquinonas	29
Tabla No. 13 Prueba de cardenólidos y bufadienólidos	29
Tabla No. 14 Prueba de esteroides y triterpenoides	29

Tabla No. 15 Prueba de saponinas	30
Tabla No. 16 Prueba de taninos	30
Tabla No. 17 Prueba de glicósidos cianogénicos	30
Tabla No. 18 Prueba de esteroides insaturados	31
Tabla No. 19 Prueba de sesquiterpenlactonas	31
Tabla No. 20 Prueba de cumarinas	31
Tabla No. 21 Cromatografía en capa fina de alcaloides	32
Tabla No. 22 Cromatografía en capa fina de flavonoides y antocianinas	33
Tabla No. 23 Cromatografía en capa fina de saponinas	34
Tabla No. 24 Cromatografía en capa fina de principios amargos	35
Tabla No. 25 Cromatografía en capa fina de cumarinas	37
Tabla No. 26 Cromatografía en capa fina de aceites volátiles en extractos	38
Tabla No. 27 Cromatografía en capa fina del aceite esencial	39
Tabla No. 28 Actividad larvívica en el primer estadio de <i>A. aegypti</i>	40
Tabla No. 29 Actividad larvívica en el segundo estadio de <i>A. aegypti</i>	41
Tabla No. 30 Actividad larvívica en el tercer estadio de <i>A. aegypti</i>	41
Tabla No. 31 Actividad larvívica en el cuarto	41

estadio de *A. aegypti*

Tabla No. 32 Actividad larvicida en el primer  
estadio de *A. albimanus* 42

Tabla No. 33 Actividad larvicida en el  
segundo estadio de *A. albimanus* 42

Tabla No. 34 Actividad larvicida en el tercer  
estadio de *A. albimanus* 42

Tabla No. 35 Actividad larvicida en el cuarto  
estadio de *A. albimanus* 42

Tabla N. 36 Actividad antimicrobiana de  
aceite esencial 43

Tabla No. 37 Actividad antimicrobiana de  
extractos 43

Tabla No. 38 Concentración mínima  
inhibitoria 44

Tabla No. 39 Actividad antifúngica 44

Tabla No. 40 Actividad citotóxica 45

## 1. RESUMEN

La extraordinaria biodiversidad vegetal de la región latinoamericana, especialmente la región mesoamericana y la reducida información técnica científica existente de la flora nativa, sugiere la necesidad de realizar estudios sobre especies vegetales que han sido poco estudiadas y se les atribuye propiedades medicinales, siendo el caso de laurel (*Litsea guatemalensis*) y esquisuchil (*Bourreria huanita*); plantas comúnmente utilizadas de manera tradicional y popular en el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, infecciones gastrointestinales, quemaduras, enfermedades cardíacas y de las cuales hay muy poca información sobre su química y actividad biológica. Por lo que se realizó la caracterización mediante ensayos químicos y biológicos de los extractos vegetales y aceites esencial de la flor de *B. huanita* y hoja de *L. guatemalensis*.

Las muestras fueron colectadas en San Lucas Sacatepéquez, las cuales fueron identificadas por un botánico y se realizaron ensayos morfoanatómicos, organolépticos y fisicoquímicos para evaluar la calidad y pureza de la droga vegetal.

Se realizó la prueba de sólidos totales para seleccionar el mejor disolvente que extrajera la mayor cantidad de los metabolitos secundarios presentes en cada especie, se obtuvo como resultado que el mejor disolvente fue el Etanol al 50% presentando el mayor porcentaje de rendimiento el extracto de las flores de la especie vegetal *B. huanita* (38.1%) y *L. guatemalensis* presentó un rendimiento de 36.8%.

Se extrajo el aceite esencial mediante hidrodestilación utilizando Neoclevenger, presentando el mayor porcentaje de rendimiento las hojas de *L. guatemalensis* (0.70%) el cual presentó nueve constituyentes siendo el compuesto mayoritario 1,8 cineol (61.34%) el cual es de importancia como saborizante, fragancia en cosmética y en medicina se ha utilizado en infecciones respiratoria y en el alivio de la inflamación y dolor.

El aceite de *B. huanita* presentó 30 constituyentes siendo el mayoritario farnesil cetona (8.38%) el cual es de interés en la industria de alimentos, ya que se utiliza como saborizante, se ha empleado en la fabricación de vitamina E, también se puede utilizar como fijador de perfume de flores y se ha utilizado para sintetizar plantas cetona añadido con H.

Se realizaron las particiones líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad (hexano, cloroformo y acetato de etilo) y la partición de *B. huanita* con mayor porcentaje de rendimiento fue la hexánica (4.0%) y para *L. guatemalensis* fue la de acetato de etilo (14.5%).

Mediante el tamizaje fitoquímico se detectaron los metabolitos secundarios presentes en *B. huanita*, que según los ensayos realizados en materia vegetal fueron: Alcaloides, flavonoides y antocianinas, taninos y cumarinas y en *L.*

*guatemalensis* se evidenció la presencia de alcaloides, flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, taninos, cumarinas y saponinas. Los metabolitos secundarios presentes en *B. huanita*, según el tamizaje fitoquímico en extractos etanólicos fueron flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenoides, taninos, cumarinas, saponinas y aceites volátiles y en extractos diclorometánicos los metabolitos detectados fueron esteroides y triterpenoides, cumarinas y aceites volátiles.

Los metabolitos secundarios presentes en *L. guatemalensis*, según el tamizaje fitoquímico realizados en extractos etanólicos fueron flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenoides, taninos, cumarinas y saponinas y en extractos diclorometánicos los metabolitos detectados fueron Esteroides y triterpenoides y cumarinas.

Se realizó la evaluación de la actividad biológica y se determinó que el extracto etanólico de *B. huanita* presentó actividad antibacteriana contra *E. coli* a 0.5 mg/mL y en el extracto etanólico de *L. guatemalensis* contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/mL y contra *S. aureus* y *S. typhi* a 1 mg/mL.

Ninguno de los extractos vegetales evaluados presentó actividad antimicótica, citotóxica y larvicida. Los aceites esenciales de *B. huanita* y *L. guatemalensis*, no presentaron ninguna actividad antibacteriana, antilevadura, antimicótica, citotóxica, y larvicida.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales se han empleado con fines curativos desde hace miles de años. En la actualidad se busca el desarrollo de los productos naturales a través del estudio científico, que permita el aprovechamiento del potencial terapéutico de los extractos vegetales y sustancias activas.

En los últimos 20 años se ha dado un resurgimiento en la investigación de productos naturales, debido a la gran diversidad química y biológica, el cual es una fuente importante para el desarrollo de nuevas moléculas de interés en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia; y la tendencia del mercado hacia lo natural.

Las especies vegetales tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud y sostenimiento de la economía en la mayor parte de la población mundial. Se estima que en el mundo se utilizan unas 10,000 especies vegetales para diversos fines, siendo la mayor parte de ellas utilizadas con fines medicinales.

Guatemala es rica en diversidad biológica y cultural, cuenta con una flora nativa de interés siendo un ejemplo de ello las especies laurel (*L. guatemalensis*) y esquisuchil (*B. huanita*), utilizadas en diversas infecciones gastrointestinales, respiratorias, afecciones nerviosas cardíacas etc, pero se reportan muy pocos estudios que validen el uso popular de dichas especies.

En el presente estudio se realizó la caracterización química y evaluación de la actividad biológica de los aceites esenciales y extractos vegetales de dichas especies obteniendo resultados que contribuyen al estudio de la flor nativa, ya que se detectaron los metabolitos secundarios presentes de interés como es el caso de flavonoides utilizados como antioxidantes; aceites esenciales de amplia aplicación en perfumería, cosmética, medicina; cumarinas de interés por presentar actividad como antimicrobianas, antiespasmódicas, anticoagulantes; taninos como cicatrizantes, antitumorales, antifúngicos; se determinaron parámetros de calidad y pureza en las drogas, como el contenido de cenizas, sólidos totales, determinación de mejor disolvente y determinación de aceite esencial, lo cual permite sentar las bases para el desarrollo de monografías de calidad que puedan estar en un futuro en alguna Farmacopea. Se determinó que las especies presentan una actividad antimicrobiana moderada contra bacterias patógenas, lo cual valida su uso como agentes antiinfecciosos.

Por lo que se espera que el estudio de las especies vegetales nativas permita la valoración, conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y dicha información generada pueda ser aprovechada por los diferentes sectores de la agroindustria, académicos y población en general.

### 3. ANTECEDENTES

En Mesoamérica, el uso de una gran cantidad de plantas es empleado para conservar o restituir la salud. En la mayoría de los casos, el uso de estas con fines curativos se fundamenta en el conocimiento empírico. El conocimiento de las plantas medicinales, es el proceso cultural de una mezcla de diferentes grupos, que han influenciado una rica y variada medicina tradicional, conformando de esta manera la medicina popular.

En América Latina existe una separación muy drástica en el aprovechamiento de plantas medicinales y aromáticas entre la población rural y urbana. No es costumbre reconocer el valor real de un producto natural y por la situación económica precaria de grandes partes de la población falta posibilidades reales en cuanto a la compra de productos con valor agregado y origen certificado. Este problema central ha provocado una polarización entre aspectos económicos y ecológicos que se encuentran en un círculo vicioso, se necesita mucho más intercambios prácticos entre los interesados en el manejo y el cultivo de plantas medicinales y/o aromáticas, por esto faltan conocimientos amplios en cuanto a los requisitos obligatorios y facultativos en un desarrollo sostenible del rubro transcendental, amplio y diverso en las zonas tropicales.

Los puntos de mayor interés son:

- El conocimiento de las condiciones edafo-climáticas y su explotación correcta en conjunto con especies vegetales.
- El manejo adecuado de los cultivos.
- El mantenimiento de la calidad de los productos en pre y postcosecha.
- La validación de nuevos sistemas y la aprobación de normas de calidad que permitan la caracterización e investigación química y farmacológica de los productos naturales.
- Oportunidades y obstáculos para la transformación de los sistemas convencionales existentes a sistemas económicamente, ecológicamente y socialmente sostenibles (Fonegra, 2001).

Para el presente estudio se escogieron dos especies nativas de Guatemala, usadas para el tratamiento de infecciones o afecciones nerviosas y que han demostrado preliminarmente que tienen alguna actividad biológica y su química han sido muy poco estudiada. A continuación se describen las fichas técnicas de las especies escogidas:

#### 3.1 *Litsea guatemalensis* Mez

Familia: Lauraceas

3.1.1 Sinonimias: *Litsea acuminatissima* Lundell, *L. matudau* Lundell; *Tetranthera glaucescens* var. *subsolitaria* Maissn.

3.1.2 Nombres populares: Agua-rel, Laurelillo, Spac-tzé, Sufricalla, Zit-zuch  
Parte utilizada: Hojas

3.1.3 Descripción botánica: El género *Litsea* tiene 100 especies, 12 en América y 3 en Mesoamérica, *L. glaucescens*, *L. guatemalensis* y *L. neesiana*, siendo las últimas dos endémicas de Guatemala (Standley & Steyermark, 1946). La información sobre las especies más comunes en la región se encuentra descrita en el Vademécum Nacional de Plantas Medicinales usadas indistintamente como Laurel (Cáceres, 2006).

*L. glaucescens* es un árbol de 3-12 m de alto, ramas glabras. Hojas coriáceas, peciolo 18 mm de largo, lanceoladas, perinervadas. Inflorescencia en racimos axilares, 4-9 flores unisexuales. Fruto en drupa, negro, 7-9 mm de diámetro, rodeado por una cúpula.

*L. guatemalensis* es un árbol de 6 m de alto, ramas delgadas, caféas. Hojas coriáceas, peciolo 1.5 cm de largo, elíptico-lanceoladas, 8 cm de largo, agudas en la base, lustrosas, glabras. Flores axilares, pedúnculo simple, solitarias, 15 mm de largo, 5-11 flores; brácteas de involucreo deciduo; filamentos glabros.

#### 3.1.4 Hábitat:

*L. glaucescens* es nativo de México y Centro América; se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Huehuetenango, Quetzaltenango, San Marcos y Zacapa.

*L. guatemalensis* es endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1,500-3,150 msnm; descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá.

3.1.5 Obtención: Se recolecta en los campos de crecimiento silvestre en regiones frías y montañosas del Altiplano del país. Es frecuente en el país, pero raramente se encuentra en forma abundante en una localidad determinada. Se recomienda su conservación y manejo en las regiones de crecimiento silvestre. Se propaga por semilla, no existen cultivos establecidos en el país. Florea de febrero a junio, las hojas y flores se colectan hacia finales de la floración y se secan a la sombra.

3.1.6 Usos y propiedades medicinales: Ambas especies se usan indistintamente como si fuera el Laurel Europeo (*Laurus nobilis* L.), el cual fue usado por griegos y romanos desde la antigüedad. Las especies nativas se mencionan en Hernández como medicina del viento o *Ecapátli*, se aplican oralmente y en baños para diversas afecciones digestivas y femeninas (Argueta *et al.*, 1994) y aplicadas en sahumeros se usan para tratar la parálisis, aliviar el cansancio y la epilepsia de los niños (Tucker *et al.*, 1992), extendiéndose su uso oral y tópico hasta El Salvador (Mena, 1994) y Honduras (House *et al.*, 1995).

El cocimiento o infusión de hojas por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias y gastrointestinales (cólico), carencia de leche en la madre e hinchazón (García-Alvarado *et al.*, 2001; Cáceres, 2006).

Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia; en sahumeros se usa para parálisis y en gargarismos para la inflamación de la garganta.

Se le atribuye propiedad aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espasmolítica, febrífuga y pectoral. Las hojas tienen un amplio uso como condimento.

Farmacología experimental y clínica: La tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra *C. albicans*, *E. floccosum* y *M. canis*. El extracto etanólico presenta actividad insecticida contra hormigas.

El extracto etanólico de la corteza seca de *L. glaucescens* tiene actividad contra *A. salina* (160 ppm). La infusión de las hojas no tiene actividad espasmolítica en duodeno aislado de rata (Cáceres, 2006).

Hernández (2007) realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria de las infusiones al 10% a dosis de 750 y 1000 mg/Kg determinando que no presentó dicha actividad.

3.1.7 Composición química: En la revisión de literatura en *Chemical Abstracts* y NAPRALERT se encontró poca información sobre la composición química de las dos especies nativas del país. Por su olor característico similar a *L. nobilis*, se supone que tiene un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoleico.

El tamizaje fitoquímico de *L. guatemalensis* indica en las hojas la presencia de alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, quercitina, estilbina, taraxon y aceite esencial que contiene limoneno y citral.

El aceite esencial de *L. glaucescens* contiene 1,8-cineol (22%), sabineno (13%), terpineno-4-ol (10%),  $\gamma$ -terpineno (9%), acetato de  $\alpha$ -terpinilo (7%), acetato de nerilo (7%),  $\alpha$ -pineno (5%), sabineno y  $\beta$ -pineno (4%). El extracto etanólico de la corteza contiene flavanonas (pinostrobrina, pinocembrina y dihidrochalconas). El aceite esencial de *L. guatemalensis* contiene 1,8-cineol (26%),  $\alpha$ -terpineol (14%), linalol (10%), terpinen-4-ol (6%) y 70 compuestos más (Vallverdú C, *et al.*, 2005).

El aceite esencial de ambas especies 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.

El análisis proximal de las hojas de *L. guatemalensis* indica que contiene 329 cal, 8% de agua, 13.7% de proteínas, 7% de grasas, 66% de carbohidratos, 23.7% de fibra, 4.9% de ceniza, 803  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de calcio, 114  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de fósforo, 15  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de hierro, 8300  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de caroteno, 0.10  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de tiamina, 0.65  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de riboflavina, 2.5  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de niacina (Duke & Atchley, 1986)

3.1.8 Toxicología: En la revisión de literatura no se encontraron referencias sobre la toxicidad de las especies nativas.

3.1.9 Contraindicaciones: No prescribir el aceite esencial durante el embarazo, ni en pacientes con gastritis, colitis y úlcera péptica.

3.1.10 Precauciones y reacciones adversas: El aceite puede producir dermatitis de contacto y fenómenos de fotosensibilización, en altas dosis puede ser tóxico al SNC.

3.1.11 Indicaciones terapéuticas: Ninguna de las dos especies nativas son de uso oficial, por lo que no se encuentran en ninguna farmacopea. Por su similitud organoléptica con *L. nobilis* y su uso popular en alimentación y medicina, está indicado su uso en el tratamiento de anorexia, digestión lenta, espasmo gastrointestinal, meteorismo y bronquitis crónica.

Para su uso tópico se recomienda la decocción en el tratamiento de estomatitis, faringitis y sinusitis, también puede ser usada como colutorio, gargarismo o compresa; en alcoholato o pomada se usa como antirreumático, pediculicida y parasiticida.

## **3.2 *Bourreria huanita* (Llave & Lex) Hemsl. Familia: Boragináceas**

### 3.2.1 Sinonimias:

*Bourreria formosa* Hemsl., *Morelosia huanita* Llave & Lex., *B. grandiflora* Bertol. Fl., *B. acimoides*

3.2.2 Nombres comunes: Esquisuchil, Esquisucha, oreja de león o árbol del Hermano Pedro (Aguilar, 1982)

3.2.3 Descripción botánica: Árbol esencialmente glabro, hojas con peciolo de 1-3 cm de largo, las hojas glabras o con escasos pelos cortos en los peciolo y costados. Elíptico-oblongas, raramente ovadas, mayormente de 6-12 cm de largo por 3-8 cm de ancho. Obtusas a redondeadas o acuminadas en el ápice, ampliamente redondeadas y algunas veces oblicuas en la base, sus márgenes son enteros y con 7-9 pares de nervios laterales. Cimas de 8 cm de largo y ancho, usualmente muy floreadas, las flores pueden ser sésiles o en pedicelos de 1-6 cm de largo, cáliz campanulado de 6-8 mm de largo, apiculado en el brote, glabro por fuera, blanco y con un tomento corto en el interior, 5 lóbulos de 1.2 mm de largo, triangulares, la corola es blanca de unos 2 cm de longitud, en forma de tubo que apenas excede al cáliz, el limbo es de 2-3 cm de ancho, los estambres son largos y alargados, ovoides y cuando están secos son de unos 12 mm de largo por 17 mm de ancho (Simpson, 1943; Standley & Williams, 1970).

3.2.4 Distribución geográfica: Crece en bosques húmedos a una altura de 2,100 msnm en Guatemala (en los departamentos de Alta Verapaz, El Quiché, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango, Sacatepéquez), México, Honduras, El Salvador y Costa Rica (Aguilar, 1982).

3.2.5 Usos medicinales: En la época contemporánea se ha estudiado que en Antigua Guatemala y pueblos vecinos, se utiliza para calmar dolores, como sedante y relajante, para enfermedades cardíacas (taquicardia y dolor pectoral), afecciones de las vías respiratorias, infecciones gastrointestinales y para problemas de presión arterial. Su uso como sedante también se conoce en Baja Verapaz, la Ciudad capital, Escuintla y Chiquimula (Aguilar, 1982; Standley & Williams, 1970).

3.2.6 Estudios etnobotánicos: No se han realizado estudios previos para determinar la actividad farmacológica de *B. huanita*. En 1991, Flores concluye que dicha especie se utiliza con fines terapéuticos y se utiliza la hoja y la flor; además indica la variabilidad morfológica y las dos formas naturales de reproducción (brotes radiculares y semillas).

3.2.7 Composición química: Según la revisión realizada en NAPRALERT, no se encuentran estudios sobre la composición química. En 2006, Ortiz determinó que el extracto etanólico y sus particiones hexánica y clorofórmica de la flor de *B. huanita* presentaron alcaloides, flavonoides, taninos y aceites esenciales; por lo que presenta metabolitos secundarios que permiten tener una base para continuar con la identificación su composición química

Actividad farmacológica: Según la revisión realizada en NAPRALERT no se encuentran estudios que evidencien dicha actividad.

Ortiz (2006) evaluó la actividad antifúngica contra la fase micelial y levaduriforme de *Sporothrix shenckii* y la fase micelial de *Fonsecaea pedrosoi* del extracto etanólico y particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa de *B. huanita* demostrando que ninguno de los extractos presentaron actividad a una concentración de 1 mg/ml.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los productos naturales, principalmente los de origen vegetal, han sido la principal fuente de agentes terapéuticos, cosméticos, condimentarios y/o alimenticios. La búsqueda de nuevas alternativas, es consecuencia de la necesidad de desarrollar sistemas que brinden mejores oportunidades a las comunidades y población en general en el aprovechamiento de los recursos naturales con que cuenta el país, por lo que resulta de importancia encontrar nuevas opciones y enfocar la investigación en los metabolitos presentes en las plantas autóctonas, siendo el caso de *L. guatemalensis* y *B. huanita*; que son plantas comúnmente utilizadas de manera tradicional y popular en el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, infecciones gastrointestinales, quemaduras, enfermedades cardíacas y de las cuales hay muy poca información sobre su química y actividad biológica.

Con la presente investigación se espera dar continuidad y seguimiento al estudio sobre dichas especies y brindar apoyo a instituciones en los diferentes sectores para que puedan aplicar este conocimiento en el desarrollo de nuevos productos activos, accesibles, seguros y efectivos.

Este trabajo multidisciplinario abarca diferentes sectores, con la finalidad que a mediano plazo, la información obtenida pueda tener un impacto real en la valoración de la biodiversidad regional mesoamericana, cuyo fin es conservar los recursos naturales y a largo plazo en la economía nacional al general empleo rural, y poder industrializar productos competitivos para el mercado nacional e internacional.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General:

5.1.1 Caracterizar mediante ensayos químicos y biológicos los extractos vegetales y aceites esenciales de la flor de *B. huanita* y hoja de *L. guatemalensis*.

### 5.2 Específicos:

5.2.1 Caracterizar mediante ensayos morfoanatómicos, organolépticos y fisicoquímicos la droga vegetal de *B. huanita* y *L. guatemalensis*.

5.2.2. Obtener extractos vegetales y aceites esenciales de *B. huanita* y *L. guatemalensis*.

5.2.3 Determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales de *B. huanita* y *L. guatemalensis*, mediante ensayos macro y semimicro y tamizaje fitoquímico.

5.2.4 Determinar la composición química del aceite esencial de *B. huanita* y *L. guatemalensis*.

5.2.5 Evaluar la actividad biocida de los extractos vegetales y aceites esenciales de *B. huanita* y *L. guatemalensis*.

5.2.6 Revisar la literatura sobre cada una de las especies en estudio a través de las bases de datos como NAPRALERT.

## 6. METODOLOGÍA

**6.1 Selección de las especies:** Mediante criterios etnobotánicos y etnofarmacológicos se seleccionaron dos especies previamente no estudiadas, nativas, de uso tradicional y popular, con una alta probabilidad de presentar actividad biológica significativa o un aceite esencial interesante.

**6.2 Obtención y colecta del material vegetal:** La obtención y colecta del material vegetal se llevó a cabo en San Lucas Sacatepéquez las hojas de *L. guatemalensis* y Finca Belencito, Antigua Guatemala la flor de *B. huanita*, realizando la colecta de material con la colaboración de los productores que le proveen el material al Laboratorio de Productos Naturales Farmaya S.A., el material se identificó por el botánico del Herbario de la Escuela de Biología, se tomó una muestra representativa de 250-500 g de material vegetal por población; de los cuales se llevó a cabo la extracción y pruebas de laboratorio (estudio fitoquímico y ensayos biológicos).

**6.3 Procesamiento y embalaje de las muestras:**

Las muestras fueron procesadas conforme a técnicas convencionales de secado y molienda. El almacenamiento, embalaje y transporte se realizó conforme a los principios botánicos y farmacognósticos generalmente aceptados (WHO, 2003).

**6.4 Estudio del rendimiento y caracterización de aceites esenciales:** La determinación de porcentaje de rendimiento de aceites esenciales de la especie aromática nativa se realizó mediante la extracción por hidrodestilación utilizando un equipo Neoclevenger según la Farmacopea Europea (2001), realizando 6 repeticiones para determinar el porcentaje de rendimiento del aceite esencial (Solis *et al*, 2005; Vila & Reing, 2003). Para la cuantificación se procedió a una caracterización por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, el cual se realizó con la colaboración del Depto. de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

6.4.1 Análisis del aceite esencial por cromatografía de Gases (CG): Utiliza como fase móvil un gas, que suele ser nitrógeno, hidrógeno o helio y como fase estacionaria un líquido muy viscoso retenido sobre un soporte sólido inerte. El equipo empleado se denomina cromatógrafo de gases y consiste en: Una cámara de inyección, una columna cromatográfica (generalmente de tipo capilar) contenida en un horno, cuya temperatura es controlable y programable, un detector y un sistema de adquisición y tratamiento de datos.

Análisis cualitativo: La identificación de los componentes de una muestra mediante CG, se basa en la medida de sus tiempos de retención comparación con los de sustancias ya conocidas.

Las determinaciones cuantitativas por CG se realizan, según cada caso particular, por los métodos habituales, normalización, patrón interno o patrón externo (Bandoni, 2001; Sharapin, 2000, Vila & Reig, 2003).

**6.5 Obtención de extractos:** El material vegetal seco y molido se obtuvo un extracto etanólico siguiendo el siguiente procedimiento:

Se pesan 200 a 500 g de material vegetal y se colocan en un percolador, al cual se le agrega el disolvente extractor y se realiza una percolación con el mismo durante un período de 5 días con recambios periódicos del disolvente hasta que la extracción sea exhaustiva. El extracto así obtenido se concentra a presión reducida a una temperatura inferior a 45 °C en un evaporador rotatorio. El (los) extracto (s) así obtenidos se les determinó la actividad biológica y fueron posteriormente sometidos a una partición líquido-líquido. A los extractos madre y las particiones, se les realizó un tamizaje fitoquímico para determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos (Sharapin, 2000; Solis *et al.*, 2005).

**6.6 Ensayos morfoanatómico y organoléptico:** Entre los caracteres organolépticos se incluyen: color, olor, sabor y textura de la droga (Kuklinski, 2000; Trease & Evans, 1991; Vila & Reing, 2003; Solis *et al.*, 2005).

**6.7 Determinación de cenizas:** Las cenizas dan idea del contenido en materia mineral de una droga, el cual suele hallarse alrededor de un 5% (Solis *et al.*, 2005; Vila & Reing, 2003).

6.7.1 Método según la Farmacopea Europea:

- Ignicionar un crisol por 30 min, enfriar en un desecador y pesar.
- Pesar 1 g del material vegetal sobre el crisol previamente seco y secar de 100-105 °C por una hora e incinerar hasta peso constante en una mufla con temperatura entre 575 y 625 °C.
- Si luego de una prolongada incineración no se logra obtener una ceniza libre de carbón, disolver en agua caliente, filtrar a través de papel filtro libre de ceniza e incinerar el residuo junto con el papel filtro.
- Combinar el filtrado con la ceniza y cuidadosamente evaporar a sequedad e incinerar hasta peso constante.
- Dejar enfriar el crisol y pesar. Determinar el porcentaje de cenizas obtenidas.

**6.8 Caracterización Química:** En el caso de extractos crudos, se procede a su caracterización (determinar su perfil químico o "huella digital") para lo cual se deben utilizar las técnicas convencionales de selección Fitoquímica (tamizaje fitoquímico a escala semimicro) en combinación con técnicas de cromatografía en capa fina. Las pruebas de tamizaje químico se fundamentan en la reacción selectiva de grupos funcionales específicos con reactivos capaces de formar complejos visualizables por el desarrollo de coloraciones características, por la formación de precipitados o bandas fluorescentes. La respuesta reactiva de estándares conocidos de grupos funcionales particulares se utiliza frecuentemente

como medio de comparación (Wagner & Bladt, 1996; Lock, 1994; Solis *et al.*, 2005).

#### 6.8.1 Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: Pesar 1 g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 % (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. (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 % de atropina y papaverina. Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

Cromatografía en capa fina: Pesar 1 g de material vegetal seco y molido, agregar 1 mL de hidróxido de amonio al 10 % (p/v) y extraer con 5 mL de metanol. Colocar en baño de María a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 % en metanol (10 µL).

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

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

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

#### 6.8.2 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 %, 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 %, 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 % (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 F<sub>254</sub>. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05% 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% de difenilboriloxietilamina (NP). Solución 2: solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000 (PEG).

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

### 6.8.3 Investigación de antraquinonas:

Prueba de Bornträger: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80%, 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 prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Prueba de Bortränger modificado: Calentar 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3% 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 cromatoplasma de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Estándar: solución al 0.1 % 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 254 nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%.

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.

#### 6.8.4 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 cromatoplaca de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Utilizar como estándar canela en metanol al 1 %, 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 254 nm 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%. UV-365 nm fluorescencia azul o verde.

#### 6.8.5 Investigación de cardenólicos y bufadienólicos:

Presencia de lactonas insaturadas: Extraer 10 g de material vegetal con 30 mL de etanol o metanol al 80% 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%.

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% 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  $\mu$ L en la cromatoplaaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Estándar digoxina 5 mg/2 mL de metanol (20  $\mu$ L), lanatósido, A,B,C; oleandrin, k-strophanthin.

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 por 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.

6.8.6 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.

6.8.7 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 % con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5 mL y proceder a aplicar 25-40 µL en una cromatoplaqueta de silicagel 60 F<sub>254</sub>. 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).

#### 6.8.8 Investigación de taninos:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 %, 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 % 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% (p/v).

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

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

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

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

#### 6.8.9 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).

#### 6.8.10 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  $\mu\text{L}$  en cromatoplaque de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Método B: Pesar 10-50 g (dependiendo del tipo de droga) de material vegetal y destilar con arrastre de vapor por 1 hora. Recolectar el aceite esencial en xileno. Diluir la solución de aceite en xileno con tolueno 1:5 o si es muy concentrada 1:10 y aplicar 5  $\mu\text{L}$  (1:10) en cromatoplaque de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3  $\mu\text{L}$ ).

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

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

#### 6.8.11 Investigación de esteroides insaturados:

Ensayo macro y semimicro: Extraer 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80 %. 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%. Observar cambios de colores inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un período de una hora.

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

#### 6.8.12 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  $\alpha$  y  $\beta$  insaturada.

Prueba de Baljet:

Preparación de reactivo:

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

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

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

Cromatografía en capa fina:

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

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

## 6.9 Determinación de la bioactividad:

6.9.1 Ensayo contra *Artemia salina* (camarón salino): La *A. salina* es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son sensibles a gran variedad de sustancias, la citotoxicidad de extractos sirve para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, es una prueba útil aunque no es selectiva para ninguna molécula química.

La técnica consiste en la preparación de un medio salino adecuado, la colocación de huevos del crustáceo en dicho medio y su eclosión. Se transfiere la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con medio salino fresco. Se preparan para cada sustancia de prueba 3 niveles de dilución (1000, 500 y 250 µg) y se colocan por triplicado en 9 pozos de la microplaca, haciendo un volumen total por pozo de 100 µL de solución a ensayar. Posteriormente se agregan a cada pozo 100 µL de medio salino conteniendo de 10 a 15 nuplios y 100 µL de medio salino. Se usan 3 pozos como controles negativos los que se preparan en forma similar, utilizando como sustancia de prueba el medio de disolución de los extractos. Después de 24 horas se procede entonces a contar el número de sobrevivientes en cada dilución, del que por diferencia con el valor inicial, se calcula el número de decesos observados. La Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) se calcula mediante una regresión no paramétrica utilizando el programa Finney para Basic. Las larvas del crustáceo son sensibles a muchas sustancias de prueba, con lo que puede determinarse la bioactividad de las mismas. Como prueba de pretamizaje resulta idónea, principalmente en lo referente a la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, citotóxicas, antimicrobianas y/o plaguicidas.

6.9.2 Tamizaje antimicrobiano:

Se evalúa la actividad inhibitoria de un producto, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo y el espectro de inhibición. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de

esta actividad se hace por métodos de dilución, que sirve tanto para el tamizaje como para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir al microorganismo. La CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible en agar (placa), está basado en el descrito por Mitscher *et al.*

Se mide por el crecimiento de bacterias inoculadas en superficie de medios conteniendo moléculas bioactivas. El procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar que consiste en preparar cajas de Agar Muller-Hinton (AMH) con 1.0 mg/mL del extracto (AMH-E). Inocular las bacterias en caldo, incubar 24 horas a 36°C, diluir 1:100 en agua destilada estéril, inocular con estrías por cuadruplicado (error < 0.05) en la superficie de AMH-E e incubar a 36°C por 24 horas. Este procedimiento se aplica a levaduras, pero debe diluirse el inóculo 1:10 e incubar 48 horas. Se evalúa el crecimiento de bacterias (-) o su inhibición (+). Para la CIM se usan diluciones decrecientes (1, 0.5, y 0.25 mg/mL), se consideran positivos los extractos activos a concentraciones <1 mg/mL. El tamizaje debe efectuarse con las siguientes cepas de microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Cryptococcus neoformans* C 13.

#### 6.9.3 Tamizaje antifúngico:

Los procedimientos son similares a los antibacterianos. El crecimiento de hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar.

La actividad antifúngica se evalúa por el crecimiento en medios conteniendo moléculas bioactivas; el procedimiento se basa en el descrito por Brancato & Golding modificado por MacRae *et al.* y adaptado para productos naturales. Consiste en purificar los hongos en Mycosel, inocular en medio de esporulación (Takashio), incubar a 25°C por 21 días, coleccionar las esporas, contarlas, estandarizar suspensiones de  $1 \times 10^5$  esporas/mL y guardar a 4°C. Preparar cajas de agar Sabouraud con 1.0 mg/mL del extracto o fracción; perforar cuatro agujeros de 8 mm de diámetro, inocular 30  $\mu$ L de la suspensión de esporas e incubar, en el caso de *Aspergillus flavus* 24-48 horas y de *Trichophyton rubrum* 21 días. Para la CIM se usa el mismo procedimiento con concentraciones decrecientes. Medir el diámetro (D) del halo de crecimiento en mm y comparar con el control negativo con la fórmula:  $\% = Dm/Dc \times 100$ . Si el % de inhibición es >75% el extracto es activo (+), si es <25% es inactivo (-).

6.9.4 Actividad insecticida: Consiste en evaluar la actividad de los extractos vegetales para matar larvas de insectos de importancia médica en un medio micrométrico líquido, en este estudio de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

### **6.10 Diseño:**

Se realizó un estudio no probabilístico a conveniencia, en el caso de evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó estadística no paramétrica, es decir si se presentaba crecimiento el resultado de la actividad se consideraba negativa y si no la presentaba el resultado de la actividad se consideraba positiva, se realizaron cuatro réplicas por especie y luego se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la actividad bactericida y antifúngica, cuatro réplicas para la concentración letal media (CL50), de la actividad citotóxica y concentración letal (CL100) para la actividad larvicida.

La determinación de los metabolitos secundarios se realizó la medición de Rf comparando con estándares, ensayos macro y semimicro y reacciones de coloración y precipitación.

El análisis del aceite esencial se obtuvo el promedio y la desviación estándar de tres extracciones del aceite, para determinar su rendimiento y la identificación química se realizó de acuerdo a los tiempos de retención y masas de los constituyentes comparados con una base de datos.

## 7. RESULTADOS

Las muestras de *L. guatemalensis* y *B. huanita* fueron colectadas en San Lucas Sacatepéquez en las siguientes coordenadas geográficas 14°35'0'' 90°43'0'', a una altura de 1,500 msnm, con una humedad relativa del 75% y una temperatura promedio de 14-22 °C. Las cuales fueron identificadas por el botánico del herbario de la Escuela de Biología y se identificaron los caracteres organolépticos y morfoanatómicos de cada especie para verificar la identidad de la misma, posteriormente fueron secadas a una temperatura de 40 °C.

### 7.1 Determinación del porcentaje de humedad de *B. huanita* y *L. guatemalensis*:

Se determinó la humedad presente en la droga vegetal como uno de los parámetros fisicoquímicos a evaluar, lo cual nos indica la calidad en el secado, para la cual se utilizó una balanza de humedad programada a una temperatura de 105 °C. El porcentaje de humedad de acuerdo a la especificación de las buenas prácticas debe ser menor al 10% para evitar la contaminación en la droga vegetal.

Tabla No. 1

Droga vegetal	Cantidad (g)	Humedad inicial (%)	Humedad después del secado (%)
<i>B. huanita</i>	450	12.17	8.13
<i>L. guatemalensis</i>	770	9.41	No fue necesario secar la materia vegetal

Fuente: Datos experimentales

### 7.2 Porcentajes de cenizas totales y cenizas ácidas en la especie vegetal *B. huanita* y *L. guatemalensis*:

Se determinó el porcentaje de cenizas, ya que es un parámetro fisicoquímico que indica el contenido mineral y de metales pesados presentes en una droga vegetal. El porcentaje de cenizas totales no debe exceder el 10% y el porcentaje de cenizas ácidas no debe exceder el 5%. De acuerdo a los resultados obtenidos de tres repeticiones se observó mayor cantidad de cenizas totales y ácidas en *B. huanita*.

Tabla No. 2

Droga vegetal	Cenizas totales (%)	Cenizas ácidas (%)
<i>B. huanita</i>	6.69	1.67
<i>L. guatemalensis</i>	3.96	0.63

Fuente: Datos experimentales

### 7.3 Determinación del mejor disolvente de extracción en las especies en estudio *B. huanita* y *L. guatemalensis*:

Se realizó la determinación del mejor disolvente mediante la prueba de sólidos totales utilizando tres concentraciones de etanol (50, 70 y 90%), para utilizarlo en la extracción. Según el porcentaje de sólidos totales obtenidos, se determinó que el mejor solvente de extracción para ambas especies fue etanol al 50%.

**Tabla No. 3**

Droga vegetal	Cantidad (g)	Disolvente	Sólidos totales (%)
<i>B. huanita</i>	2.0	Etanol 50%	<b>1.13</b>
	2.0	Etanol 70 %	0.96
	2.0	Etanol 95%	0.74
<i>L. guatemalensis</i>	2.0	Etanol 50%	<b>2.13</b>
	2.0	Etanol 70 %	2.01
	2.0	Etanol 95%	1.16

Fuente: Datos experimentales

### 7.4 Porcentaje de rendimiento obtenido de extractos diclorometánico y etanólico de *B. huanita* y *L. guatemalensis*:

Se realizó la extracción utilizando la técnica de percolación utilizando un disolvente apolar (diclorometano) y el mejor disolvente etanólico. Se presentó mejor rendimiento en los extractos etanólicos al 50% en ambas especies y en el extracto diclorometánico el mayor porcentaje lo presentó *L. guatemalensis*.

**Tabla No. 4**

Droga vegetal	Peso (g)	Disolvente	Rendimiento (%)
<i>B. huanita</i>	150.0	Diclorometano	1.8
	150.0	Etanol 50%	<b>38.1</b>
<i>L. guatemalensis</i>	200.0	Diclorometano	7.2
	200.0	Etanol 50%	<b>36.8</b>

Fuente: Datos experimentales

### 7.5 Porcentaje de rendimiento de las particiones obtenidas de *B. huanita* y *L. guatemalensis*:

Del extracto etanólico se realizó una partición líquido- líquido utilizando disolventes de polaridad creciente (hexano, cloroformo y acetato de etilo). Se observó en el extracto de *B. huanita* el mayor porcentaje de rendimiento lo presentó la partición hexánica y en el extracto de *L. guatemalensis* lo presentó la partición de acetato de etilo.

**Tabla No. 5**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Partición</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<i>B. huanita</i>	Hexánica	<b>4.0</b>
	Clorofórmica	3.0
	Acetato de Etilo	2.5
<i>L. guatemalensis</i>	Hexánica	4.5
	Clorofórmica	4.5
	Acetato de Etilo	<b>14.5</b>

Fuente: Datos experimentales

### 7.6 Porcentajes de rendimientos obtenidos de la extracción del aceite esencial de *B. huanita*:

Se realizó la extracción del aceite esencial mediante hidrodestilación, utilizando Neoclevenger, según el método de la Farmacopea Europea (2001), para determinar el porcentaje de rendimiento se realizaron 6 repeticiones obteniendo un promedio de  $0.05 \pm 0.02$  %

**Tabla No. 6**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Rendimiento de aceite (%)</b>
<i>B. huanita</i> (recién colectada)	35.3	0.07
<i>B. huanita</i> (1ra. Corrida)	32.0	0.07
<i>B. huanita</i> (2da. Corrida)	31.1	0.04
<i>B. huanita</i> (3ra. Corrida)	32.5	0.08
<i>B. huanita</i> (4ta. Corrida)	35.0	0.03
<i>B. huanita</i> (5ta. Corrida)	35.0	0.03
<i>B. huanita</i> (6ta. Corrida)	35.0	0.04

Fuente: Datos experimentales

### 7.7 Porcentajes de rendimientos obtenidos de la extracción del aceite esencial de *L. guatemalensis*:

El porcentaje de rendimiento obtenido de 6 repeticiones fue de  $0.70 \pm 0.1$  %

**Tabla No. 7**

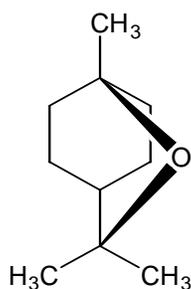
<b>Droga vegetal</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Rendimiento de aceite (%)</b>
<i>L. guatemalensis</i> (1ra. Corrida)	50.0	0.70
<i>L. guatemalensis</i> (2da. Corrida)	50.2	0.63
<i>L. guatemalensis</i> (3ra. Corrida)	50.0	0.71
<i>L. guatemalensis</i> (4ta. Corrida)	50.0	0.53
<i>L. guatemalensis</i> (5ta. Corrida)	50.0	0.77
<i>L. guatemalensis</i> (6ta. Corrida)	50.0	0.83

Fuente: Datos experimentales

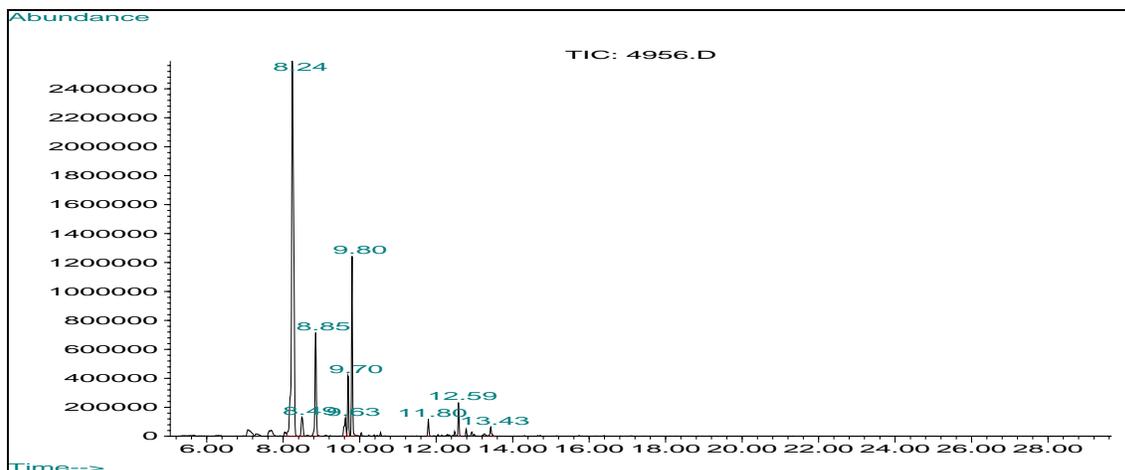
### 7.8 Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases masas:

Se realizó el análisis del aceite esencial utilizando un cromatógrafo de gases masas HP5890 Serie 2 DM 5971A. Columna HP 5 25 m x 0.2 mm de DI, recubierta con un film de 0.33  $\mu\text{m}$ . Se utilizó para la identificación la Librería Wiley 275.1. Tiempo de corrida: 29 min. Temperatura de columna 50 °C. Temperatura del puerto 250 °C. Temperatura del Detector 280 °C. Se inyectaron 2  $\mu\text{l}$  del aceite en 1 mL de Metanol grado HPLC.

En la gráfica No. 1 se observa el cromatograma del aceite esencial de *L. guatemalensis*, del cual se identificaron nueve constituyentes siendo el compuesto mayoritario 1,8 cineol (61.34%).



**Gráfica No. 1**  
**Cromatograma del aceite esencial de *L. guatemalensis***

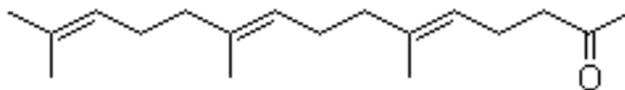


**Tabla No. 8**

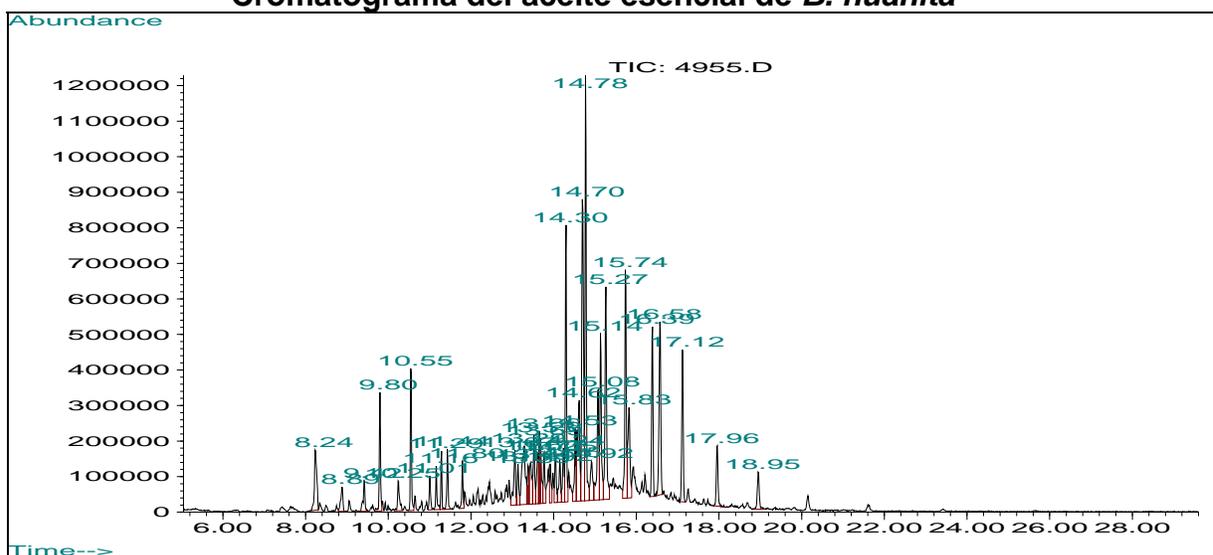
	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Componente identificado</b>	<b>Área %</b>
1	8.24	<b>1,8 cineol</b>	<b>61.34</b>
2	8.50	$\gamma$ - terpineno	2.65
3	8.85	Linalool	10.39
4	9.62	Borneol	2.31
5	9.70	4-terpineol	5.31
6	9.80	$\alpha$ -terpineol	13.43
7	11.80	Trans-cariofileno	1.32
8	12.59	Nerolidol	2.23
9	13.43	Eudesmol	1.03

*Fuente: Datos experimentales*

En la gráfica No. 2 se observa el cromatograma del aceite esencial de *B. huanita*, del cual se identificaron 30 constituyentes siendo el mayoritario farnesil cetona (8.38%).



**Gráfica No. 2**  
**Cromatograma del aceite esencial de *B. huanita***



**Tabla No. 9**

	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Componente identificado</b>	<b>Área %</b>
1	8.24	1,8 cineol	2.30
2	8.89	Nonanal	0.85
3	9.42	Nonenal	0.94
4	9.80	$\alpha$ - terpineol	2.32
5	10.55	5 metil-2-(1metiletileno) fenol	2.75
6	11.44	Metil-eugenol	1.22
7	13.06	1-butilheptil benceno	1.71
8	13.14	1-propiloctil benceno	1.00
9	13.29	1-etilnonil benceno	3.39
10	13.39	$\beta$ -bisaboleno	0.91
11	13.65	1-pentilheptil benceno	1.40
12	13.69	1, butiloctil benceno	1.40
13	13.77	1-propilnonil benceno	1.24
14	14.05	Benzoato de bencilo	1.27
15	14.25	1-pentiloctil benceno	1.31
16	14.30	6,10 dimetil 2-undecanona	5.29
17	14.53	Ácido bis 1,2 bencendicarboxílico	1.63
18	14.62	2-pentadecanona	4.06
19	14.71	Ácido 2 hidroxifenileno benzoico,	8.37
20	14.78	<b>farnesil cetona</b>	<b>8.38</b>
21	14.92	Ácido hexadecanoico	1.54
22	15.08	Heptadecano	4.02

23	15.26	$\beta$ -feniletilsalicilato	5.60
24	15.75	Heneicosano	5.20
25	15.83	2-Nonadecanona	3.25
26	16.39	Docosano	3.57
27	16.58	Ácido linoleico	5.00
28	17.12	n-eicosano	3.43
29	17.96	tetracosano	1.67
30	18.96	pentacosano	1.23

Fuente: Datos experimentales

### 7.9 Resultados de pruebas macro y semi micro de *B. huanita* y *L. guatemalensis*:

Se realizó el tamizaje fitoquímico mediante ensayos macro y semi micro, utilizando diversas pruebas preliminares de coloración y precipitación tanto en la materia vegetal, como en los extractos etanólicos y diclorometánicos de las especies en estudio, para la identificación de los metabolitos secundarios, los cuales fueron confirmados mediante cromatografía en capa fina:

**Tabla No. 10**  
**Prueba de alcaloides**

Droga vegetal	Extracto	Mayer	Dragendorf	Wagner	Resultado
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(+)	(+)	(-)	Positivo
	etanólico	(-)	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(+)	(+)	(+)	Positivo
	etanólico	(-)	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	(-)	Negativo

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No. 11**  
**Prueba de flavonoides y antocianinas**

Droga vegetal	Extracto	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [ ]	FeCl <sub>3</sub> 10%	HCl + $\Delta$	Magnesio + HCl	Álcali	Resultado
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Positivo
	etanólico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Positivo
	diclorometánico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Positivo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Positivo
	etanólico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Positivo
	diclorometánico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Positivo

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No. 12**  
**Prueba de antraquinonas**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Bornträger</b>	<b>Bornträger modificado</b>	<b>Resultado</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(-)	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	Negativo

*Fuente: Datos experimentales*

**Tabla No. 13**  
**Prueba de cardenólidos y bufadienólidos**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Lactonas insaturadas</b>	<b>Azúcares 2-desoxigenadas</b>	<b>Resultado</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(-)	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	Negativo

*Fuente: Datos experimentales*

**Tabla No. 14**  
**Prueba de esteroides y triterpenoides**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Lieberman-Burchard</b>	<b>Carr-Price</b>	<b>Resultados</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	(-)	negativo
	etanólico	(-)	(-)	negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(-)	(-)	negativo
	etanólico	(+)	(+)	Positivo
	diclorometánico	(+)	(+)	Positivo

*Fuente: Datos experimentales*

**Tabla No. 15**  
**Prueba de saponinas**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Prueba de espuma</b>	<b>Resultados</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	Negativo
	etanólico	(+)	Positivo
	diclorometánico	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(+)	Positivo
	etanólico	(+)	Positivo
	diclorometánico	(-)	Negativo

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No. 16**  
**Prueba de taninos**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Gelatina 1%</b>	<b>Gelatina-sal</b>	<b>FeCl<sub>3</sub> 10%</b>	<b>Resultados</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	(-)	(+)	Positivo
	etanólico	(+)	(+)	(+)	Positivo
	diclorometánico	(-)	(-)	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(+)	(+)	(+)	Positivo
	etanólico	(+)	(+)	(+)	Positivo
	diclorometánico	(-)	(-)	(-)	Negativo

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No. 17**  
**Prueba de glicósidos cianogénicos**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Prueba de Guignard</b>	<b>Resultados</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	Negativo

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No. 18**  
**Prueba de esteroides insaturados**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Anhídrido acético + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Resultados</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	<b>(+)</b>	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	(-)	(-)	Negativo
	etanólico	(-)	(-)	Negativo
	diclorometánico	(-)	(-)	Negativo

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No. 19**  
**Prueba de sesquiterpenlactonas**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Legal</b>	<b>Baljet</b>	<b>Resultados</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	(-)	(-)	Negativo
	etanólico	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	Positivo
	diclorometánico	(-)	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	Positivo
	etanólico	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	Positivo
	diclorometánico	(-)	(-)	Negativo

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No. 20**  
**Prueba de cumarinas**

<b>Droga vegetal</b>	<b>Extracto</b>	<b>Fluorescencia con KOH 0.5N</b>	<b>Resultado</b>
<i>B. huanita</i>	materia vegetal	<b>(+)</b>	Positivo
	etanólico	<b>(+)</b>	Positivo
	diclorometánico	(-)	Negativo
<i>L. guatemalensis</i>	materia vegetal	<b>(+)</b>	Positivo
	etanólico	<b>(+)</b>	Positivo
	diclorometánico	<b>(+)</b>	Positivo

Fuente: Datos experimentales

**7.10 Resultados de la cromatografía en capa fina de *B. huanita* y *L. guatemalensis*:**

Para confirmar la presencia de los metabolitos secundarios se realizó la cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos, diclorometánicos y particiones hexánica, cloroformica y acetato de etilo de las especies en estudio.

**Tabla No. 21**  
**Cromatografía en Capa Fina de Alcaloides**

<b>Especie Vegetal</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Rf</b>	<b>Color bandas</b>	<b>Estándar con el que coincide</b>
<b><i>B. huanita</i></b>	Etanol 50%	No se observó ninguna banda		
	Diclorometano	No se observó ninguna banda		
	Hexano	No se observó ninguna banda		
	Cloroformo	No se observó ninguna banda		
	Acetato de Etilo	No se observó ninguna banda		
	Última fracción etanólica	No se observó ninguna banda		
<b><i>L. guatemalensis</i></b>	Etanol 50%	0.11	Naranja	-----
		0.44	Naranja	-----
		0.73	Verde-Café	-----
		0.76	Café	-----
	Diclorometano	0.11	Naranja	-----
		0.44	Naranja	-----
		0.56	Naranja	Papaverina
		0.88	Verde-Café	-----
		0.92	Café	-----
		0.99	Naranja	-----
	Hexano	0.11	Naranja	-----
		0.44	Naranja	-----
		0.73	Verde-Café	-----
		0.76	Café	-----
	Cloroformo	0.11	Naranja	-----
		0.73	Verde-Café	-----
		0.76	Café	-----
	Acetato de Etilo	No se observó ninguna banda		
	Última fracción etanólica	No se observó ninguna banda		
	<b>Estándares</b>	Atropina	0.29	-----
Papaverina		0.56	-----	

Fuente: Datos experimentales

Fase Móvil: Tolueno-Acetato de Etilo-Dietilamina  
Revelador: Dragendorff

**Tabla No. 22**  
**Cromatografía en Capa Fina de Flavonoides y Antocianinas**

<b>Especie Vegetal</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Rf</b>	<b>Color bandas</b>	<b>Estándar con el que coincide</b>
<b><i>B. huanita</i></b>	Etanólico al 50%	0.47	Azul	-----
		0.57	Naranja	Rutina
		0.67	Azul	-----
		0.81	Verde amarillo	Ácido Clorogénico
		0.93	Verde aqua	Ácido Caféico
	Diclorometano	no se observó ninguna banda		
	Hexano	no se observó ninguna banda		
	Cloroformo	0.53	Naranja	-----
		0.67	Naranja	Rutina
		0.81	Verde aqua	-----
		0.93	Verde amarillo	Kaempferol
	Acetato de Etilo	0.47	Amarillo	-----
		0.60	Naranja	-----
		0.67	Naranja	Rutina
		0.81	Verde amarillo	Ácido Clorogénico
		0.93	Verde aqua	Ác. Cafeico
	Última fracción etanólica	0.40	Amarillo	-----
		0.50	Naranja	-----
		0.57	Azul	-----
0.67		Naranja	Rutina	
0.79		Naranja	-----	
<b><i>L. guatemalensis</i></b>	Etanólico al 50%	0.47	Verde	-----
		0.57	Azul	-----
		0.71	Naranja	-----
		0.81	Naranja	-----
	Diclorometano	no se observó ninguna banda		
	Hexano	no se observó ninguna banda		
	Cloroformo	0.57	Verde	-----
		0.67	Naranja	Rutina
		0.79	Naranja	-----

	Acetato de Etilo	0.67	Naranja	Rutina
		0.79	Naranja	-----
	Última fracción etanólica	0.47	Verde aqua	-----
		0.53	Azul	-----
<b>Estándares</b>	Rutina	0.57	Naranja	
		0.67	Naranja	
	Ácido Clorogénico	0.53	Verde aqua	
		0.79	Verde amarillo	
	Kaempferol	0.93	Amarillo	
	Ácido Caféico	0.93	Verde aqua	

Fuente: Datos experimentales

Fase Móvil: n-butanol-Ácido Acético-Agua  
Revelador: PN / PEG

**Tabla No. 23**  
**Cromatografía en Capa Fina de Saponinas**

Espece Vegetal	Disolvente	Rf	Color bandas	Estándar con el que coincide
<b>B. huanita</b>	Etanol al 50%	0.30	Café	-----
		0.48	Amarillo	-----
		0.68	Amarillo	-----
		0.85	Amarillo	-----
		0.96	Violeta	Saponinas
	Diclorometano	0.96	Violeta	Saponinas
	Hexano	0.30	Amarillo	-----
		0.55	Violeta	-----
		0.79	Violeta	-----
		0.96	Violeta	Saponinas
	Cloroformo	0.30	Violeta	-----
		0.79	Violeta	-----
		0.96	Amarillo-Café	-----
	Acetato de Etilo	0.30	Violeta	-----
		0.55	Violeta	-----
		0.68	Amarillo	-----
		0.85	Amarillo Café	-----
		0.96	Violeta	Saponinas
Última Fracción Etanólica	0.30	Café	-----	
	0.48	Amarillo	-----	

		0.68	Amarillo	-----
<i>L. guatemalensis</i>	Etanol al 50%	0.30	Café	-----
		0.62	Violeta	-----
		0.79	Amarillo	-----
		0.85	Violeta	-----
		0.96	Violeta	Saponinas
	Diclorometano	0.96	Violeta	Saponinas
	Hexano	0.62	Violeta	-----
		0.85	Violeta	-----
		0.96	Violeta	Saponinas
	Cloroformo	0.62	Violeta	-----
		0.96	Violeta	Saponinas
		0.62	Violeta	-----
	Acetato de Etilo	0.79	Amarillo	-----
		0.85	Violeta	-----
		0.96	Violeta	Saponinas
Última Fracción Etanólica	0.30	Café	-----	
	0.62	Violeta		
	0.96	Violeta	Saponinas	
<b>Estándares</b>	Saponinas al 0.1%	0.96	Violeta	
	Saponinas al 0.25%	0.96	Violeta	
	Saponinas al 0.50%	0.96	Violeta	

Fuente: Datos experimentales

Fase Móvil: n-Butanol-Ácido Acético-Agua  
Revelador: Vainillina-Ácido Sulfúrico

**Tabla No. 24**  
**Cromatografía en Capa Fina de Principios Amargos**

Espece Vegetal	Disolvente	Rf	Color bandas	Estándar con el que coincide
<i>B. huanita</i>	Etanol al 50%	0.10	Violeta	<i>Neurolaena lobata</i>
		0.63	Café Rojo	-----
		0.92	Café	-----
	Diclorometano	0.87	Café	-----
	Hexano	0.07	Violeta	-----
		0.52	Violeta	-----
0.61		Café Rojo	-----	

		0.87	Café Rojo	-----
	Cloroformo	0.17	Café	-----
		0.87	Violeta	<i>N. lobata</i>
	Acetato de Etilo	0.87	Violeta	<i>N. lobata</i>
	Última Fracción Etanólica	0.87	Violeta	<i>N. lobata</i>
<b><i>L. guatemalensis</i></b>	Etanol al 50%	0.07	Verde	-----
		0.10	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.20	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.38	Violeta	<i>N. lobata</i>
		0.46	Café Rojo	-----
		0.52	Café Rojo	-----
		0.73	Café Rojo	-----
		0.80	Verde	<i>N. lobata</i>
	0.87	Verde	-----	
	Diclorometano	0.10	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.20	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.35	Violeta	-----
		0.49	Café Rojo	-----
		0.73	Café	-----
		0.90	Verde	-----
	Hexano	0.10	Verde	-----
		0.20	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.38	Violeta	<i>N. lobata</i>
		0.49	Café Rojo	-----
		0.52	Café Rojo	-----
		0.73	Café Rojo	-----
		0.80	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.87	Verde	-----
	Cloroformo	0.07	Verde	-----
		0.10	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.20	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.38	Violeta	<i>N. lobata</i>
		0.52	Café Rojo	-----
		0.80	Verde	<i>N. lobata</i>
		0.87	Verde	-----
	Acetato de Etilo	0.87	Violeta	<i>N. lobata</i>
	Última Fracción	0.87	Violeta	<i>N. lobata</i>

	Etanólica			
<b>Estándares</b>	<i>Neurolaena lobata</i>	0.10	Verde	
		0.20	Amarilla	
		0.38	Azul	
		0.80	Verde	
		0.87	Violeta	

Fuente: Datos experimentales

Fase Móvil: Cloroformo-Metanol  
Revelador: Anisaldehído-Ácido Sulfúrico

**Tabla No. 25**  
**Cromatografía en Capa Fina de Cumarinas**

Espece Vegetal	Disolvente	Rf	Color bandas	Estándar con el que coincide
<b>B. huanita</b>	Etanol al 50%	0.36	Verde fluorescente	-----
	Diclorometano	0.36	Azul fluorescente	-----
	Hexano	0.36	Verde fluorescente	-----
	Cloroformo	0.36	Azul fluorescente	-----
	Acetato de Etilo	No se observó ninguna banda		
	Última fracción etanólica	No se observó ninguna banda		
<b>L. guatemalensis</b>	Etanol al 50%	0.07	Verde fluorescente	Umbeliferona
	Diclorometano	0.07	Verde fluorescente	Umbeliferona
	Hexano	0.07	Verde fluorescente	Umbeliferona
	Cloroformo	0.07	Verde fluorescente	Umbeliferona
	Acetato de Etilo	No se observó ninguna banda		
	Última fracción etanólica	No se observó ninguna banda		
<b>Estándares</b>	Ácido p-cumárico	No se observó ninguna banda		
	Umbeliferona	0.07	Azul fluorescente	

Fuente: Datos experimentales

Fase Móvil: Tolueno-Acetato de Etilo  
Revelador: KOH etanólico

**Tabla No. 26**  
**Cromatografía en Capa Fina de Aceites Volátiles en Extractos**

<b>Especie Vegetal</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Rf</b>	<b>Color bandas</b>	<b>Estándar con el que coincide</b>
<b><i>B. huanita</i></b>	Etanol al 50%	0.20	Café	Citral
		0.87	Café	-----
	Diclorometano	0.11	Café	-----
	Hexano	0.21	Café	Citral
		0.31	Café	-----
		0.79	Café	-----
		0.99	Café-Violeta	-----
	Cloroformo	0.11	Café	-----
		0.29	Café-Violeta	-----
	Acetato de Etilo	0.99	Violeta	-----
Última Fracción Etanólica	No se observó ninguna banda			
<b><i>L. guatemalensis</i></b>	Etanol al 50%	0.10	Verde	-----
		0.14	Café	-----
		0.23	Café amarillo	Mezcla
		0.29	Café rojo	-----
		0.37	Violeta	-----
		0.50	Violeta	Citral
		0.79	Café	-----
		0.99	Café rojo	-----
	Diclorometano	0.14	Verde	-----
		0.24	Verde	-----
		0.31	Café	-----
		0.37	Café rojo	-----
		0.43	Café rojo	Mezcla
		0.50	Violeta	Citral
		0.71	Café rojo	-----
		0.99	Café rojo	-----
	Hexano	0.13	Verde	-----
		0.19	Café	-----
		0.24	Café amarillo	-----
		0.31	Café rojo	-----
		0.37	Café rojo	-----
		0.50	Violeta	Citral
		0.61	Café	-----

		0.80	Café	-----
		0.97	Café rojo	-----
	Cloroformo	0.10	Verde	-----
		0.23	Café amarillo	Mezcla
	Acetato de Etilo	No se observó ninguna banda		
Última Fracción Etanólica	No se observó ninguna banda			
<b>Estándares</b>	Mezcla	0.23	Café	
		0.43	Café Violeta	
		0.64	Café	
	Citral	0.21	Café	
		0.50	Café violeta	
		0.76	Café	
	Limoneno	0.27	Café	
		0.34	Café	
		0.40	Café	
		0.46	Café amarillo	
		0.63	Violeta	
	Citronelal	0.36	Café	
		0.57	Café	
		0.76	Café amarillo	
0.86		Café		

Fuente: Datos experimentales

Fase Móvil: Tolueno-Acetato de Etilo  
Revelador: Ácido Sulfúrico-Anisaldehído

**Tabla No. 27**  
**Cromatografía en Capa Fina del aceite esencial de las especies**

Especie Vegetal	Muestra	Rf	Color bandas	Estándar con el que coincide
<b>B. huanita</b>	Aceite esencial	0.23	Café	Mezcla
		0.31	Café Violeta	-----
		0.57	Café Violeta	Citronelal
		0.97	Café	-----
<b>L. guatemalensis</b>	Aceite esencial	0.23	Café Violeta	Mezcla
		0.34	Café	Limoneno
		0.50	Violeta	Citral
		0.97	Violeta	-----

<b>Estándares</b>	Mezcla	0.23	Café	
		0.43	Café Violeta	
		0.64	Café	
	Citral	0.21	Café	
		0.50	Café violeta	
		0.76	Café	
	Limoneno	0.27	Café	
		0.34	Café	
		0.40	Café	
		0.46	Café amarillo	
	Citronelal	0.63	Violeta	
		0.36	Café	
		0.57	Café	
		0.76	Café amarillo	
			0.86	Café

Fuente: Datos experimentales

Fase Móvil: Tolueno-Acetato de Etilo  
Revelador: Ácido Sulfúrico-Anisaldehído

### 7.11 Evaluación de la actividad larvica de *B. huanita* y *L. guatemalensis*:

Se realizó la evaluación de la actividad larvica en los extractos etanólicos y diclorometánicos en cuatro estadios larvarios de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, determinando que ninguno de los extractos presentó actividad insecticida, ya que se considera con actividad cuando se produce la muerte total de las larvas, por lo que la concentración letal 100 es mayor a 1 mg/mL.

**Tabla No. 28**  
**Actividad larvica en el primer estadio de *A. aegypti***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	11*	13*	10*	10*	10*
2		12*	12*	14*	14*
3		11*	12*	10*	10*
4		10*	10*	10*	10*

Fuente: Datos experimentales

\*Larvas evaluadas después de 48 horas de exposición

**Tabla No.29**  
**Actividad larvicida en el segundo estadio de *A. aegypti***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	12*	13*	10*	10*	10*
2		11*	10*	11*	10*
3		14*	11*	10*	14*
4		10*	10*	10*	12*

*Fuente: Datos experimentales*

\*Larvas evaluadas después de 48 horas de exposición

**Tabla No. 30**  
**Actividad larvicida en el tercer estadio de *A. aegypti***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	14*	10*	12*	12*	10*
2		11*	14*	13	12*
3		10*	10*	10*	10*
4		11*	13*	11*	10*

*Fuente: Datos experimentales*

\*Larvas evaluadas después de 48 horas de exposición

**Tabla No. 31**  
**Actividad larvicida en el cuarto estadio de *A. aegypti***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	11*	10*	10*	11*	10*
2		10*	10*	10*	10*
3		10*	10*	10*	10*
4		10*	10*	10*	10*

*Fuente: Datos experimentales*

\*Larvas evaluadas después de 48 horas de exposición.

**Tabla No. 32**  
**Actividad larvica en el primer estadio de *A. albimanus***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	13*	12*	9*	15*	10*
2		11*	13*	13*	14*
3		10*	14*	10*	10*

Fuente: Datos experimentales

\*Larvas evaluadas después de 48 horas de exposición

**Tabla No. 33**  
**Actividad larvica en el segundo estadio de *A. albimanus***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	10*	12*	10*	10*	14*
2		12*	11*	15*	10*
3		14*	13*	13*	13*

Fuente: Datos experimentales

\*Larvas evaluadas después de 48 horas de exposición

**Tabla No. 34**  
**Actividad larvica en el tercer estadio de *A. albimanus***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	12*	12*	14*	10*	13*
2		11*	15*	11*	10*
3		10*	12*	15*	12*

Fuente: Datos experimentales

**Tabla No.35**  
**Actividad larvica en el cuarto estadio de *A. albimanus***

No. de Réplicas	Control	<i>B. huanita</i>		<i>L. guatemalensis</i>	
		Extracto etanólico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto diclorometánico
1	11*	12*	11*	11*	11*
2		13*	12*	12*	10*
3		11*	13*	13*	13*

Fuente: Datos experimentales

\*Larvas evaluadas después de 48 horas de exposición

### 7.12 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *B. huanita* y *L. guatemalensis*

Se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las especies y se determinó que ninguno de los aceites evaluados presentó inhibición del crecimiento antimicrobiano, por lo que se considera inactivo a 10 µL.

**Tabla No. 36**

Muestra	A	B	C	D	E	F	G	H
Aceite esencial de <i>B. huanita</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Aceite esencial de <i>L. guatemalensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Datos experimentales

(+)= Inactividad del extracto frente a bacterias, presentó crecimiento

Microorganismos evaluados

A: *Staphylococcus aureus*, B: *Salmonella typhi*, C: *Mycobacterium smegmatis*, D: *Bacillus subtilis*, E: *Pseudomonas aeruginosa*, F: *Candida albicans*, G: *Saccharomyces cerevisiae*, H: *Escherichia coli*

### 7.13 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos

Se realizó el tamizaje antimicrobiano de los extractos de las especies en estudio contra bacterias y levaduras y se observó en *B. huanita* inhibición del crecimiento microbiano en el extracto diclorometánico contra *B. subtilis*, y el extracto etanólico mostró inhibición contra *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *E. coli*, por lo que se procedió a realizar la concentración mínima inhibitoria para determinar su actividad.

**Tabla No. 37**

Muestra	Extracto	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>B. huanita</i>	Diclorometánico	+	+	+	-	+	+	+	+
	Etanólico	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>L. guatemalensis</i>	Diclorometánico	-	+	+	+	+	-	+	+
	Etanólico	-	-	-	-	-	+	+	+

Fuente: Datos experimentales

(+): Mostró crecimiento microbiano, actividad negativa

(-): No mostró crecimiento microbiano, actividad positiva

A: *Staphylococcus aureus*, B: *Salmonella typhi*, C: *Mycobacterium smegmatis*, D: *Bacillus subtilis*, E: *Pseudomonas aeruginosa*, F: *Candida albicans*, G: *Saccharomyces cerevisiae*, H: *Escherichia coli*

#### 7.14 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM):

Se determinó la CIM de los extractos que habían mostrado actividad en la fase de tamizaje y se observó actividad en el extracto etanólico de *B. huanita* contra *E. coli* a 0.5 mg/mL y en el extracto etanólico de *L. guatemalensis* contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/mL y contra *S. aureus* y *S. typhi* a 1 mg/mL.

**Tabla No. 38**

Muestra	Extracto	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>B. huanita</i>	Diclorometánico	+	+	+	>1	+	+	+	+
	Etanólico	+	+	>1	>1	+	+	+	0.5
<i>L. guatemalensis</i>	Diclorometánico	>1	+	+	+	+	>1	+	+
	Etanólico	1	1	0.25	1	>1	+	+	+

Fuente: Datos experimentales

A: *Staphylococcus aureus*, B: *Salmonella typhi*, C: *Mycobacterium smegmatis*, D: *Bacillus subtilis*, E: *Pseudomonas aeruginosa*, F: *Candida albicans*, G: *Saccharomyces cerevisiae*, H: *Escherichia coli*

#### 7.15 Determinación de la actividad antifúngica contra hongos filamentosos:

Se realizó la evaluación de la actividad antifúngica, observándose que ninguno de los extractos evaluados mostró dicha actividad a 1mg/mL.

**Tabla No. 39**

Muestra	Extracto	A	B	C	D	E	F	G
<i>B. huanita</i>	Diclorometánico	+	+	+	+	+	+	+
	Etanólico	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. guatemalensis</i>	Diclorometánico	+	+	+	+	+	+	+
	Etanólico	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Datos experimentales

(+)= Extracto sin evidencia de inhibición micótica

Microorganismos evaluados:

A. *Trichophyton rubrum*, B. *T. mentagrophyte*, C. *Microsporum canis*, D. *M. gypseum*, E. *Aspergillus flavus*, F. *A. fumigatus*, G. *A. niger*

### 7.16 Evaluación de la actividad citotóxica contra *Artemia salina*:

Se realizó la evaluación de la actividad citotóxica y se observó que ninguno de los extractos mostró citotoxicidad contra *A. salina*, por lo que su DL<sub>50</sub> es mayor a 1 mg/mL

**Tabla No. 40**

<b>Muestra</b>	<b>Extracto</b>	<b>No. de nauplios</b>	<b>No. de nauplios muertos</b>	<b>Citotoxicidad DL<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
<i>B. huanita</i>	Diclorometánico	12	0	>1
	Etanólico	12	0	>1
	Aceite esencial	11	0	>1
<i>L. guatemalensis</i>	Diclorometánico	13	0	>1
	Etanólico	11	0	>1
	Aceite esencial	13	0	>1

*Fuente: Datos experimentales*

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se seleccionaron dos especies nativas de Guatemala para realizar una caracterización química y evaluar la actividad biológica con el fin de validar el uso popular de la flora guatemalteca y contribuir así a enriquecer el estudio fitoquímico; para tal efecto se colectó en San Lucas Sacatepéquez hojas de laurel (*L. guatemalensis*), el cual es endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1,500-3,150 msnm descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa y Sololá; y se colectó en la Finca Belencito, Antigua Guatemala, Sacatepéquez flor de esquisuchil (*B. huanita*), la cual se distribuye en Alta Verapaz, El Quiché, Izabal, Jutiapa, Quetzaltenango y Sacatepéquez; las cuales son especies usadas tradicionalmente en infecciones o afecciones nerviosas y que han demostrado preliminarmente tener alguna actividad biocida y con muy pocos estudios químicos.

Las muestras fueron identificadas por el botánico del herbario de la Escuela de Biología y se identificaron los caracteres organolépticos y morfoanatómicos de cada especie para verificar la identidad de la misma, posteriormente fueron secadas a una temperatura de 40 °C en un horno de convección de aire forzada. Para la caracterización de la materia vegetal es necesario que ésta se encuentre completamente seca, con un porcentaje de humedad menor al 10%, según los estándares de calidad para materia prima establecidos internacionalmente. Por lo que se determinó el porcentaje de humedad en una balanza de humedad para ambas especies.

Las flores de *B. huanita*, presentaron después del secado un porcentaje de humedad de 8.13%. Las hojas de *L. guatemalensis* presentaron un porcentaje de humedad fue de 9.41%.

Uno de los parámetros fisicoquímicos que indica la pureza de una droga vegetal es el porcentaje de cenizas, las cuales revelan la presencia de metales pesados, minerales, arcilla y material orgánico presente en las plantas. Para el ensayo de cenizas totales el porcentaje no debe exceder del 10% y para cenizas ácidas no debe exceder del 5%. Según los resultados obtenidos se puede observar que en ambas especies se presentaron porcentajes dentro de los límites establecidos; *B. huanita* con 6.69% para cenizas totales y 1.67% para cenizas ácidas y *L. guatemalensis* con 3.96% y 0.63% respectivamente.

Para la preparación de los extractos etanólicos fue necesario realizar un ensayo de percolación a pequeña escala para determinar la concentración de etanol más adecuada para extraer la mayor cantidad de metabolitos secundarios de la planta, por medio de la prueba de sólidos totales. El disolvente con mayor porcentaje de sólidos totales, es el más adecuado para extraer la mayoría de los metabolitos de interés en las especies en estudio. Determinándose que el mejor disolvente para ambas especies fue el etanol al 50%, obteniéndose un % de sólidos para *B. huanita* de 1.13% y para *L. guatemalensis* 2.13%. Eso nos indica que dentro de

las especies se presentan mayor cantidad de sustancias polares las cuales se extraen con mezclas hidroalcohólicas.

Se prepararon extractos mediante percolación, ya que es una técnica exhaustiva que permite mayor eficiencia en el proceso extractivo, utilizando como disolventes: Etanol al 50% por ser el mejor disolvente que extrae la mayor cantidad de sólidos totales y diclorometano para extraer las sustancias apolares presentes en dichas especies. En ambas especies el mejor rendimiento se obtuvo con el etanol al 50%; presentándose para *B. huanita* un rendimiento del 38.1% y con *L. guatemalensis* 36.8%. Con el disolvente diclorometano se obtuvieron rendimientos muy bajos para *B. huanita* 1.8% y *L. guatemalensis* 7.2%, confirmándose que las sustancias presentes en mayor cantidad son sustancias de naturaleza polar.

A partir de los extractos etanólicos se realizaron particiones líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente (hexano, cloroformo y acetato de etilo). Se observó en el extracto de *B. huanita* que el mayor porcentaje de rendimiento se obtuvo en la partición hexánica (4.0%), lo cual indica presencia de compuestos apolares y con las hojas de *L. guatemalensis* se obtuvo con acetato de etilo (14.5%), lo cual indica que en su mayoría se presentan sustancias polares.

La extracción de aceites esenciales se realizó mediante la técnica de hidrodestilación utilizando Neoclevenger. Se realizaron seis repeticiones por cada especie vegetal. La especie que reportó mayor porcentaje de rendimiento fueron las hojas de *L. guatemalensis* (0.70%) a diferencia de la flor de *B. huanita* (0.05%).

En el análisis del aceite esencial por cromatografía de gases para *L. guatemalensis* se identificaron nueve constituyentes siendo el compuesto mayoritario 1,8 cineol (61.34%), seguido de  $\alpha$ -terpineol (13.43%) y linalool (10.39%). El cual de acuerdo a la literatura se reportaron más de 70 compuestos presentes en el aceite siendo el mayoritario igualmente el 1,8 cineol aunque en una menor concentración (26%),  $\alpha$ -terpineol (14%), linalool (10%), terpinen-4-ol (6%) (Vallverdú C, *et al.*, 2005). Estas diferencias pueden deberse al lugar y época de colecta, altura, clima, condiciones fenológicas de la planta, los cuales pudieron afectar, así como la columna y tiempo de corrida utilizados en el cromatógrafo de gases. El compuesto 1,8 cineol (eucaliptol) es de importancia como saborizante, fragancia en cosmética y en medicina se ha utilizado en infecciones respiratoria y en el alivio de la inflamación y dolor.

En el aceite esencial de *B. huanita*, se identificaron 30 constituyentes, siendo este el primer reporte para la especie ya que según la revisión de literatura no se había realizado dicho análisis. Como compuesto mayoritario se identificó al farnesil cetona (8.38%), el cual es de interés en la industria de alimentos, ya que se utiliza como saborizante, se ha empleado en la fabricación de vitamina E, también se puede utilizar como fijador de perfume de flores y se ha utilizado para sintetizar plantas cetona añadido con H.

Como parte del tamizaje fitoquímico se realizaron ensayos macro y semi micro donde se evaluó la formación de precipitados y complejos coloreados. En algunos casos, fue necesario realizar una cromatografía en capa fina (CCF) para caracterizar y confirmar los resultados obtenidos en dichos ensayos. Se realizaron ensayos para determinación de: alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas, sesquiterpenlactonas, taninos, esteroides y triterpenoides, glicósidos cianogénicos y esteroides Insaturados.

Los ensayos macro y semi micro se realizaron únicamente en los extractos etanólicos y diclorometánicos de ambas especies; y los que dieron positivo algún metabolito se realizaron las cromatografías en capa fina en los extractos etanólicos, diclorometánicos y las particiones hexánicas, clorofórmicas y de acetato de etilo de ambas especies.

De acuerdo a los resultados obtenidos, únicamente la materia vegetal de ambas especies dio un resultado positivo para el ensayo de alcaloides al agregar los reactivos: Mayer, Dragendorf y Wagner. En cambio los extractos etanólicos y diclorometánicos dieron un resultado negativo. De manera que fue necesario realizar la cromatografía en capa fina para confirmar estos resultados.

En la cromatografía en capa fina para determinación de alcaloides, se observó que únicamente las hojas de *L. guatemalensis* poseen alcaloides dentro de su composición. El Rf de la muestra de extracto diclorometánico de Laurel analizada coincidió con uno de los dos estándares que se utilizaron (papaverina). Las demás bandas observadas para el extracto etanólico y las fracciones obtenidas de *L. guatemalensis* sí presentaron colores característicos de alcaloides pero ninguna coincidió con los estándares. Esto se debe posiblemente a que poseen otro tipo de alcaloides. Es importante resaltar que los alcaloides son sustancias básicas de interés farmacológico, ya que algunos han demostrado actividad antiespasmódica, estimulante, analgésica (atropina); anestésica, sedante (morfina); emética, expectorante, antipirética (emetina); vasoconstrictora, insuficiencia circulatoria (efedrina), hipotensora (reserpina); relajante muscular (papaverina, tubocurarina), reguladores del crecimiento

Las muestras de *B. huanita* no presentaron ninguna banda característica de alcaloides. Los resultados positivos obtenidos en los ensayos macro y semi micro obtenidos en *B. huanita* pudieron haber sido resultado de posibles interferentes, como proteínas o sustancias que reaccionan con las sales, ya que éstos reactivos no son específicos para Alcaloides, son un tipo de prueba presuntiva. Por lo que se realizó la respectiva cromatografía en capa fina para comprobar estos resultados, los cuales fueron negativos.

En el ensayo macro y semi micro para determinación de flavonoides y antocianinas se pudo observar que tanto los extractos etanólicos como los diclorometánicos de ambas especies reportaron resultados positivos para dicha prueba, obteniéndose cambios característicos de coloración al agregar cada uno de los reactivos: Ácido Sulfúrico concentrado, cloruro férrico al 10%, ácido

clorhídrico más aplicación de calor, magnesio más ácido Clorhídrico concentrado e hidróxido de potasio.

Al realizar la cromatografía en capa fina se observaron varias bandas características de flavonoides que coincidieron en su Rf con uno o varios de los estándares utilizados (rutina, ácido clorogénico, ácido cafeico y kaempferol). Esto indica que las muestras presentan posiblemente dichos flavonoides dentro de su composición. Únicamente los extractos diclorometánicos y las fracciones hexánicas de ambas especies no reportaron ninguna banda característica de flavonoides. Esto posiblemente debido a que las estructuras glicosídicas de dichos metabolitos son de naturaleza polar, por lo que no fueron extraídos en disolventes apolares. Los flavonoides han demostrado ser antihemorrágicos, antiarrítmicos, protectores de la pared vascular o capilar, antiinflamatorios, antirradicales libres, antihepatotóxicos, antibacterianos, antivíricos, antifúngicos, diuréticos y antiurémicos, antiespasmódicos.

Se observaron los resultados de los ensayos macro y semi micro para determinación de antraquinonas y cardenólidos y bufadienólidos respectivamente. Ninguna de las especies en estudio reportó resultados positivos en materia vegetal, extractos etanólicos y diclorometánicos al agregar los reactivos, ya que no se observaron cambios de coloración o precipitación característicos.

En el ensayo macro y semi micro para determinación de esteroides y triterpenoides se pudo observar que *B. huanita* no presentó ningún cambio de coloración o precipitación característicos. Sin embargo en el extracto etanólico y diclorometánico de hojas *L. guatemalensis* si se observaron cambios característicos de esteroides y triterpenoides.

Se determinó en los ensayos macro y semi micro que el extracto etanólico de *B. huanita* presentó un poco de formación de espuma característica de saponinas en la prueba de espuma. En la materia vegetal y en el extracto diclorometánico de dicha especie no se observó ninguna formación de espuma. En cambio en *L. guatemalensis* se observó formación de espuma en la materia vegetal y en el extracto etanólico. La formación de espuma que se observó en *L. guatemalensis* fue mayor que el observado en *B. huanita*.

La presencia de saponinas se confirmó mediante la cromatografía en capa fina, ya que la prueba de espuma es un ensayo preliminar para determinar saponinas. Al realizar la respectiva CCF, se observó que muchas de las bandas obtenidas son características de saponinas (bandas color violeta, amarillo, verde, azul fluorescente bajo luz U.V.). La mayoría de las bandas observadas no coincidieron con el estándar de Saponinas al 0.1%, 0.50% y 0.25%. Esto demuestra que posiblemente si hay presencia de saponinas dentro de la composición de las muestras, pero son de otro tipo de saponina.

Las saponinas se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa, por lo que se consideran tensioactivos naturales, presentan una acción irritante de las células a nivel pulmonar producen un

aumento de las secreciones efecto expectorante y antitusivo; a nivel renal aumentan la circulación sanguínea aumento la filtración glomerular presentando un efecto diurético; lisan los hematíes, tienen un efecto antiedematoso y antiinflamatorio, algunas han demostrado acción adaptógena (antiestrés), además de efecto antimicrobiano, antivírico, antimicótico. En la industria se utilizan como agentes espumantes y emulgentes; precursores por hemisíntesis de fármacos (hormonas sexuales, glucocorticoides)

Se observó que la materia vegetal y el extracto etanólico tanto de *B. huanita* como de *L. guatemalensis* presentaron taninos dentro de su composición, siendo éste posiblemente del tipo catecol para ambas especies. Estos compuestos fenólicos se encuentran frecuentemente formando glicósidos. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, siendo detectados así por el intenso color negro-azulado (para el pirogalol) o grisáceo-negro (para el catecol) al agregar una solución acuosa o alcohólica de cloruro férrico al 1%. Es por esta razón que no se logró la extracción de estos metabolitos con diclorometano.

Los taninos presentan la capacidad de forman complejos (son agentes quelantes) con metales pesados (Cu, Hg, Pb, Sñ, Zn) utilizados en intoxicaciones. Muestran propiedades redox, se oxidan con facilidad, en medio ácido y pueden actuar como reductores. Tienen la capacidad de precipitar otras macromoléculas mostrando un efecto astringente. Se han utilizado en el curtido de piel.

Otras actividades reportadas son antisépticos (bactericida y bacteriostática), antifúngico, protectores impermeabilizan la piel y la protegen de los agentes externos, favorecen la regeneración (reepitelizantes y tienen poder analgésico, acción hemostática. Los taninos condensados son protectores de la pared venosa y hemostáticos y se usan en supositorios antihemorroidales. Efecto hipocolesterolémico, disminuyen los niveles de colesterol en sangre y aumentan el metabolismo.

Se determinó que la flor de *B. huanita* y las hojas de *L. guatemalensis* (materia vegetal, extracto etanólico y diclorometánico) no presentaron glicósidos cianogénicos y esteroides insaturados dentro de su composición, según los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación.

En el ensayo macro y semi micro para determinación de sesquiterpenlactonas (principios amargos) se obtuvieron resultados positivos con ambas especies; en el extracto etanólico de *B. huanita* y en materia vegetal y extracto etanólico de *L. guatemalensis*. Por lo que fue necesario realizar la cromatografía en capa fina para confirmar dichos resultados. Se determinó que todas las muestras (extractos y fracciones) que se corrieron de ambas especies presentan principios amargos dentro de su composición. La mayoría de las bandas presentaron coloraciones y Rf similares a las bandas que presenta el estándar de *Neurolaena lobata*. Las demás bandas que no coinciden con el estándar indican que las muestras poseen principios amargos de otro tipo dentro de su composición.

Las sesquiterpenlactonas son sustancias amargas que han presentado acción antitumoral, citotóxica, (molefantina, allamandina, ambrosia); analgésica

(helenalina); inhibidores del crecimiento (alantolactona); antimalárica (neurolenina, lobatina presentes en *N. lobata*).

Según los ensayos macro y semi micro para determinación de cumarinas, tanto *B. huanita* como *L. guatemalensis* presentaron fluorescencia al agregar el reactivo de hidróxido de potasio etanólico a las muestras de materia vegetal y extractos etanólicos. Según los resultados de la cromatografía en capa fina para determinación de cumarinas, se pudo observar bandas características de cumarinas únicamente para los extractos y fracciones de *L. guatemalensis*, ya éstas coincidieron con uno de los estándares que se corrieron: umbeliferona, por lo que se puede considerar la posibilidad de que las dichas muestras contengan este tipo de cumarinas. En cambio, ninguna de las muestras (extractos y fracciones) de *B. huanita* presentaron bandas características de cumarinas; esto debido posiblemente a que no poseen dicho metabolito dentro de su composición o que lo poseen en muy poca cantidad.

Las cumarinas se caracterizan por presentar una acción vitamínica P, es decir disminuye la permeabilidad capilar y refuerzan los capilares, tónicos venosos (venotónicos); algunas son fotosensibilizadoras (furanocumarinas); antiinflamatorios, antiespasmódicos (7-metoxi cumarina- presente en el Pericón), vasodilatadores coronarios; ligero efecto hipnótico, sedantes y anticoagulantes (dicumarol).

Como parte del tamizaje fitoquímico de aceites esenciales para *B. huanita* y *L. guatemalensis* se realizaron las respectivas cromatografías en capa fina de los extractos obtenidos por percolación con etanol al 50% y con diclorometano.

Así también se realizó cromatografía en capa fina de los aceites obtenidos previamente por hidrodestilación con Neoclevenger.

Todas las muestras analizadas para ambas especies (extractos y fracciones) presentaron aceites esenciales dentro de su composición. La mayoría de las bandas observadas, se obtuvieron con el disolvente diclorometano y en la fracción hexánica. Esto debido a que son solventes apolares mucho más afines a los aceites volátiles. La especie vegetal con más variedad y cantidad de aceites volátiles detectados en CCF es *L. guatemalensis*, a diferencia de *B. huanita* que presentó pocas bandas.

De las muestras de *B. huanita* analizadas, únicamente el extracto etanólico y la fracción hexánica coincidieron en una de las bandas con uno de los estándares que se utilizaron (cital). De las muestras de *L. guatemalensis*, únicamente el extracto etanólico, el diclorometanico, la fracción hexánica y la fracción clorofórmica coincidieron con el estándar cital.

Los aceites esenciales analizados por CCF mostraron cuatro bandas características para *B. huanita* las cuales coincidieron con el estándar de mezcla de aceites y el estándar de citronelal. En el aceite de *L. guatemalensis* se

observaron también cuatro bandas características, las cuales coincidieron con el estándar de mezcla de aceites, el estándar limoneno y el citronelal.

Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en perfumería, saborizantes y en medicina (carminativos, analgésico, expectorante, sedantes). Cada uno de los componentes aislados puede también tener una aplicación como el citronelal (repelente de mosquitos), mentol (analgésico, anestésico y antiespasmódico), 1,8 cineol (expectorante y antiséptico), citral (antihistamínico, analgésico en oftalmología).

Los extractos etanólicos y diclorometánicos de las especies vegetales *B. huanita* y *L. guatemalensis*, así como sus correspondientes aceites esenciales fueron evaluados para determinar, la presencia de actividad inhibitoria contra microorganismos estandarizados para los procedimientos de tamizaje antimicrobiano. Las pruebas para evaluar la actividad biológica fueron: antibacteriano, antilevadura, antimicótico, citotóxico y larvicida.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó presencia de actividad inhibitoria en el tamizaje antibacteriano, las especies vegetales evaluadas que inhibieron el crecimiento contra microorganismos utilizados fueron el extracto etanólico de *B. huanita* con inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, extracto etanólico de *L. guatemalensis* con inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis*.

Se realizó la CIM (Concentración Mínima Inhibitoria) a todos los extractos contra los microorganismos que presentaron inhibición para determinar la concentración que evidencia dicha actividad. Los resultados que se obtuvieron mostraron que el extracto etanólico de *B. huanita* presentó actividad contra *E. coli* a una CIM de 0.5 mg/mL, el extracto etanólico de *L. guatemalensis* presentó actividad contra *S. aureus*, *S. typhi* y *B. subtilis* a una CIM de 1 mg/mL, y la mayor actividad la presentó contra *M. smegmatis* a una CIM de 0.25 mg/mL.

El tamizaje realizado contra levaduras no evidenció ningún tipo de inhibición, en contraste con el tamizaje realizado contra bacterias en las que se logró establecer concentraciones mínimas a las cuales se pueden utilizar los extractos vegetales para evitar el crecimiento de microorganismos de importancia clínica, validando así la actividad antibacteriana de dichas especies, principalmente en los extractos etanólicos, donde además demostró la mayor cantidad de metabolitos extraídos.

De acuerdo a la revisión de literatura la tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra *C. albicans*, *E. floccosum* y *M. canis*. El extracto etanólico presenta actividad insecticida contra hormigas.

Los resultados obtenidos evidencian que ninguno de los extractos evaluados presentaron actividad contra hongos filamentosos (*Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophyte*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*) evaluados a una concentración de 1 mg/mL, mostrando también

concordancia con el estudio realizado por Ortiz (2006) quien evaluó la actividad antifúngica contra la fase micelial y levaduriforme de *Sporothrix shenkii* y la fase micelial de *Fonsecaea pedrosoi* del extracto etanólico y particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa de *B. huanita* demostrando que ninguno de los extractos presentaron actividad a una concentración de 1 mg/mL.

Se realizó la evaluación de la actividad larvicida en los extractos etanólicos y diclorometánicos en cuatro estadios larvarios de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, determinando que ninguno de los extractos presentó actividad insecticida, ya que se considera con actividad cuando se produce la muerte total de las larvas, por lo que la concentración letal 100 es mayor a 1 mg/mL.

Se determinó que ninguno de los extractos presentó citotoxicidad contra *A. salina*, por lo que su DL<sub>50</sub> es mayor a 1mg/mL. Siendo el primer reporte para ambas especies de dicha actividad.

En los resultados obtenidos en el tamizaje antibacteriano y antilevadura realizada con los aceites esenciales de *B. huanita* y *L. guatemalensis* se observa que ninguno de los aceites esenciales presentó actividad inhibitoria contra las bacterias y levaduras evaluadas. Confirmándose que la actividad está presente en extractos polares, sin embargo se podría evaluar el aceite contra otros microorganismos o determinar alguna otra actividad farmacológica.

## 9. CONCLUSIONES

- 9.1** La mayor cantidad de sólidos totales se obtuvo con Etanol al 50% presentando el mayor porcentaje de rendimiento el extracto de las flores de la especie vegetal *B. huanita* (38.1%).
- 9.2** El aceite volátil que presentó mayor porcentaje de rendimiento fue el extraído de las hojas de *L. guatemalensis* (0.70%).
- 9.3** La partición de *B. huanita* con mayor porcentaje de rendimiento fue la hexánica (4.0%) y para *L. guatemalensis* fue la de acetato de etilo (14.5%).
- 9.4** El aceite esencial de *L. guatemalensis*, presentó nueve constituyentes siendo el compuesto mayoritario 1,8 cineol (61.34%) y el aceite de *B. huanita* presentó 30 constituyentes siendo el mayoritario farnesil cetona (8.38%).
- 9.5** Los metabolitos secundarios presentes en *B. huanita*, según los ensayos realizados en materia vegetal fueron: Alcaloides, flavonoides y antocianinas, taninos y cumarinas y en *L. guatemalensis* se evidenció la presencia de alcaloides, flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, taninos, cumarinas y saponinas.
- 9.6** Los metabolitos secundarios presentes en *B. huanita*, según el tamizaje fitoquímico en extractos etanólicos fueron flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenoides, taninos, cumarinas, saponinas y aceites volátiles y en extractos diclorometánicos los metabolitos detectados fueron esteroides y triterpenoides, cumarinas y aceites volátiles.
- 9.7** Los metabolitos secundarios presentes en *B. huanita*, según resultados de CCF en la partición hexánica fueron saponinas, principios amargos, cumarinas y aceites volátiles y en la partición clorofórmica se detectaron flavonoides y antocianinas, saponinas, principios amargos, cumarinas y aceites volátiles.
- 9.8** Los metabolitos secundarios presentes en *B. huanita*, según resultados de CCF en la partición de acetato de etilo fueron: Flavonoides y antocianinas, saponinas, principios amargos y aceites volátiles.
- 9.9** Los metabolitos secundarios presentes en *L. guatemalensis*, según el tamizaje fitoquímico realizados en extractos etanólicos fueron flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenoides, taninos, cumarinas y saponinas y en extractos diclorometánicos los metabolitos detectados fueron Esteroides y triterpenoides y cumarinas.
- 9.10** Los metabolitos secundarios presentes en *L. guatemalensis*, según resultados de cromatografía en CCF en la partición hexánica fueron: Alcaloides, saponinas, principios amargos, cumarinas y aceites volátiles y en

la partición clorofórmica fueron: Alcaloides, flavonoides y antocianinas, saponinas, principios amargos, cumarinas y aceites volátiles.

- 9.11** Los metabolitos secundarios presentes en *L. guatemalensis*, según resultados de cromatografía en CCF en la partición de acetato de etilo fueron: Flavonoides y antocianinas, saponinas y principios amargos.
- 9.12** Los extractos etanólicos de las especies vegetales de *B. huanita* y *L. guatemalensis* presentaron mayor actividad inhibitoria que los extractos diclorometánicos.
- 9.13** El extracto etanólico de *B. huanita* presentó actividad antibacteriana contra *E. coli* a 0.5 mg/mL y en el extracto etanólico de *L. guatemalensis* contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/mL y contra *S. aureus* y *S. typhi* a 1 mg/mL.
- 9.14** Ninguno de los extractos vegetales evaluados presentó actividad antimicótica, citotóxica y larvicida.
- 9.15** Los aceites esenciales de *B. huanita* y *L. guatemalensis*, no presentaron ninguna actividad antibacteriana, antilevadura, antimicótica, citotóxica, y larvicida.

## 10. RECOMENDACIONES

**10.1** Extraer el aceite esencial en las especies de otras localidades, para comparar las diferencias de rendimiento y composición química incluyendo otras variables.

**10.2** Realizar el aislamiento y elucidación de las estructuras químicas de los compuestos presentes en las especies.

**10.3** Desarrollar monografías farmacopeicas de las especies para establecer las especificaciones de calidad.

**10.4** Evaluar otras actividades farmacológicas en las especies para continuar con la validación del uso popular de las plantas medicinales.

**10.5** Evaluar otras partes de las especies para determinar si se presentan diferencias en la composición química y actividad biológica.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Corpus. Rosario, Argentina. 1359 p.
- Argueta, A. *et al.*, 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Indigenista Tomo I, II, III. 1786 p.
- Bandoni, A. 2003. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latioamérica. La Plata, Ed. Univ. Nac. de la Plata, 410 p.
- Brancato, FP. y Golding, NS. 1953. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* 45:848-864.
- British Herbal Pharmacopoeia. 2002. London: Department of Health, Social Services and Public Safety.
- Bruneton, J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2a. Ed. Zaragoza: Acribia.
- Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala.
- Cáceres, A. 2005. Vademécum Nacional de Plantas Medicinales. Editorial Universitaria. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 273 p.
- Cañigüeral, S. Vila, R. Wichtl, M. (Eds.) 1998. Plantas Medicinales y Drogas Vegetales. Milano: OEMF Internacional.
- Duke, JA. 1985. Handbook of Medicinal Herbs. CRC. New York pp. 378-383, 521, 563.
- Duke, JA. 1986. Handbook proximate analysis tables of higher plants. Boca Raton. CRC Press pp. 99.
- Edwards-Jones V, Buck R, Shawcross SB, Dawson MM, Dunn K. 2004. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns* 30: 772-777.
- European Pharmacopoeia. 2002. 4<sup>th</sup> Edition and supplements. Strasbourg: Conseil de L' Europe.
- FAO. 1987. Informe sobre los Recursos Naturales para la Agricultura y la Alimentación en América Latina y el Caribe. 124 pp.

- Fonegra, R. 2001. Ed. Simposio sobre Plantas Medicinales y Aromáticas, Curso Nacional para el Conocimiento de las Plantas Medicinales y Aromáticas. Documentos Ocasionales No. 2 Herbario Universidad de Antioquia. 349 p.
- García Alvarado, JS. *et al.*, 2001. Tradicional Uses and Scientific knowledge of medicinal plants from Mexico and Central America. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 8:37-39
- Hernández, I. 2007. Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio de hoja de *Solanum hartwegii* Benth. (Huiz), de hoja de *Litsea guatemalensis* Mez. (Laurel) y de hoja de *Piper jacquemontianum* Kunth. (Cordoncillo). Tesis de Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. 55 p.
- House, PR. *et al.*, 1995. Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Tegucigalpa. UNAH/CIMN-H/CID/CIIR/GTZ, 555 p.
- Joly, AB. 1977. Botánica-Introducción a Taxonomía Vegetal. Compañía Ed. Nacional. Sao Paulo, Brasil.
- 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. Universidad Pontificia del Perú. Fondo Editorial. Perú. 300 p.
- Maruzzella JC, Balter JR. 1959. The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Dis Rept* 43: 1143-1147.
- Mena, MG. 1996. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora Salvadoreña. San Salvador. Ed. Universitaria. 563 p.
- Mitscher, LA. *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction rationale and methodology. *Lloydia* 35:157-166.
- Proença Da Cunha, A. 2005. Farmacognosia e Fitoquímica. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 670 p.
- Ortiz, H. 2006. Actividad antifúngica de los extractos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecae pedrosoi*. Tesis de Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. 70 p.
- Real Farmacopea Española (2002). 2ª. Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 p.

- Santa Cruz, L. Manual: Selección Fitoquímica. Guía Práctica par 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. 247 p.
- Solis, PN. *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.* 59:250-252.
- Standley, PC & Steyermark JA. 1952. Flora of Guatemala. Fiediana: Botany 24(3): 275.
- Standley, PC & Steyermark JA. 1946. Flora of Guatemala. Fiediana: Botany 24(4): 315.
- Stevens, WD *et al.* 2001. Flora de Nicaragua. USA. Missouri Botanical Garden. 3:2510.
- Trease & Evans. 1991. Farmacognosia. México. Interamericana McGraw Hill pp. 261-280.
- Tucker, A. *et al.* 1992. *Litsea glaucescens* Humb., Bonpl. & Kunth var *glaucescens*. (Lauraceae). A Mexican Bay. *Economic Botany* 46 (1):21-24.
- Vallverdú, C. *et al.* 2005. Composition of the essential oil from leaves of *Litsea guatemalensis*. *Flavour and Fragrance Journal* 20:415-418.
- Vanaclocha B. & Cañigueral S. 2003. Fitoterapia Vademécum de Prescripción. 4ª. Ed. Masson S.A. Barcelona.1091 p.
- Wagner, H. & Bladt, S. 1996. Plant Drug Análisis. Springer Verlag. Berlin. 320 p.
- WHO. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO.115 p.
- WHO. 2003. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva: WHO.

## 12. ANEXOS

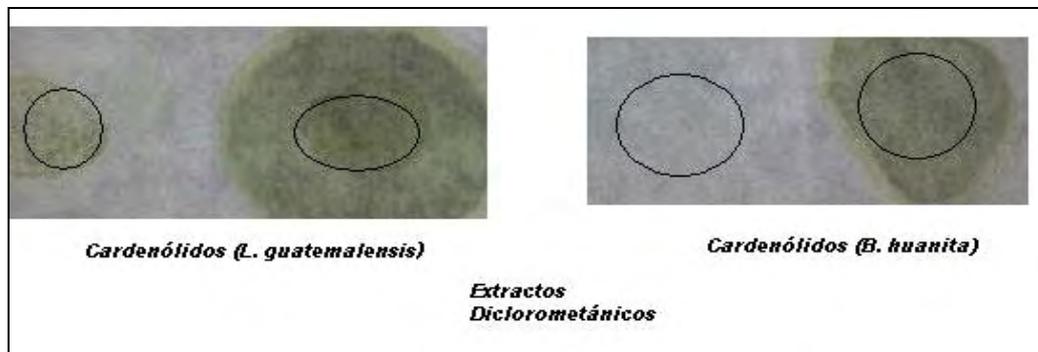
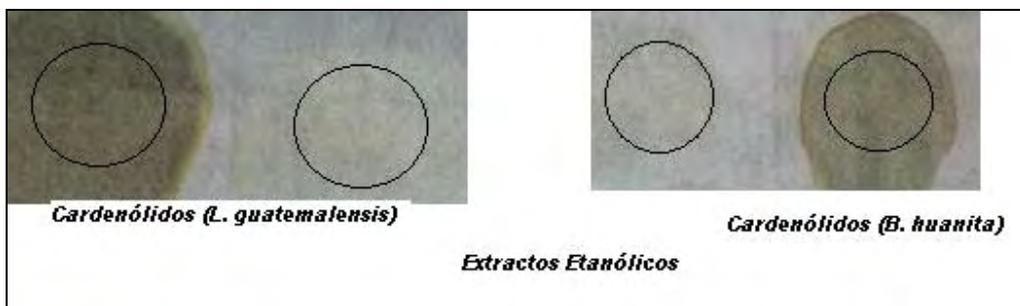
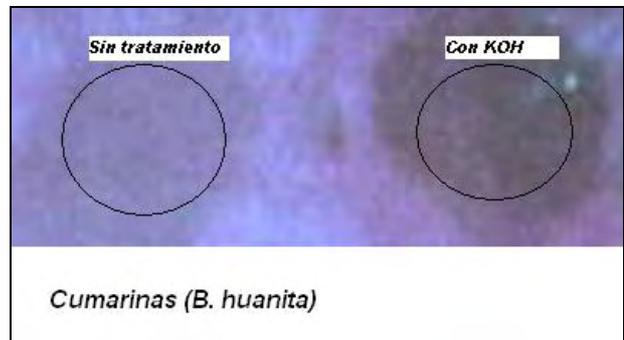
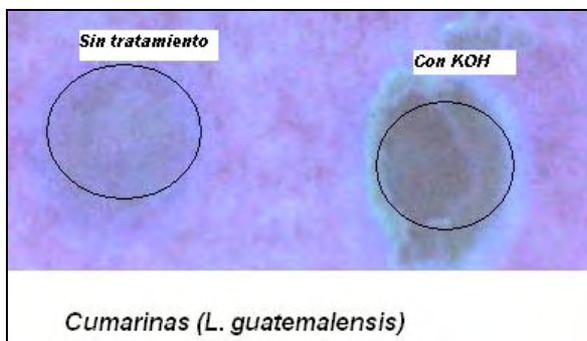
### 12.1 Árbol de esquisuchil (*B. huanita*)



### 11.2 Hojas de Laurel (*L. guatemalensis*)

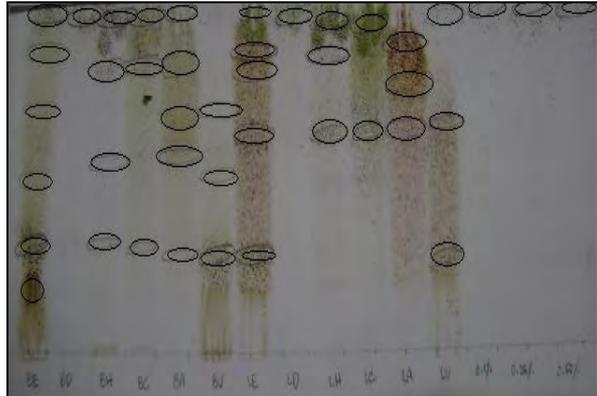


### 12.3 Tamizaje fitoquímico

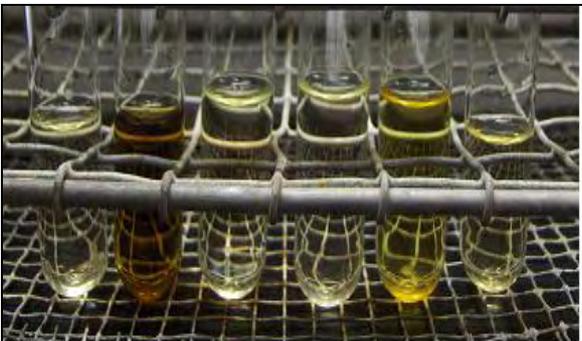




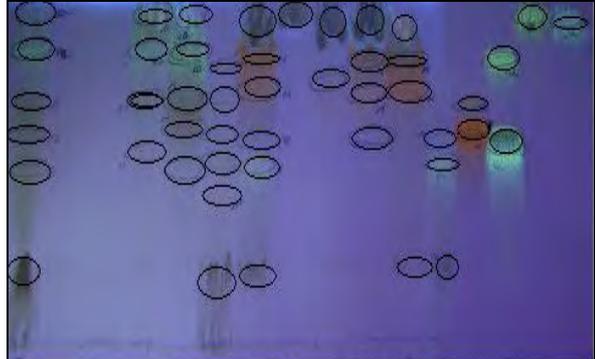
Prueba de Espuma  
Saponinas



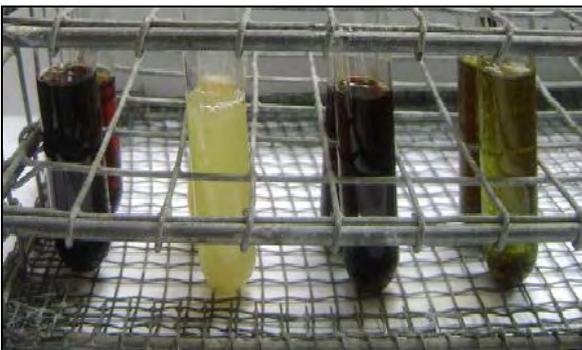
Saponinas



Flavonoides y Antocianinas



Flavonoides y Antocianinas por CCF



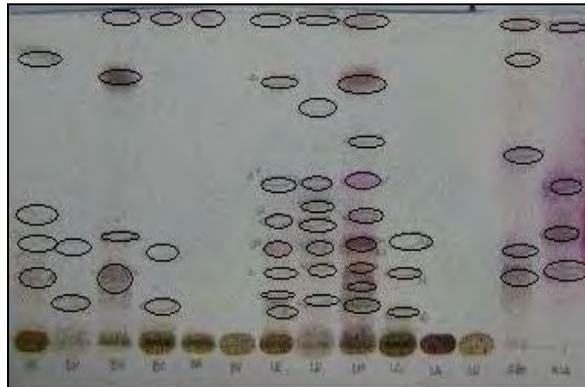
Sesquiterpenelactonas  
Extractos Laurel y Esquisuchil



Taninos *L. guatemalensis*

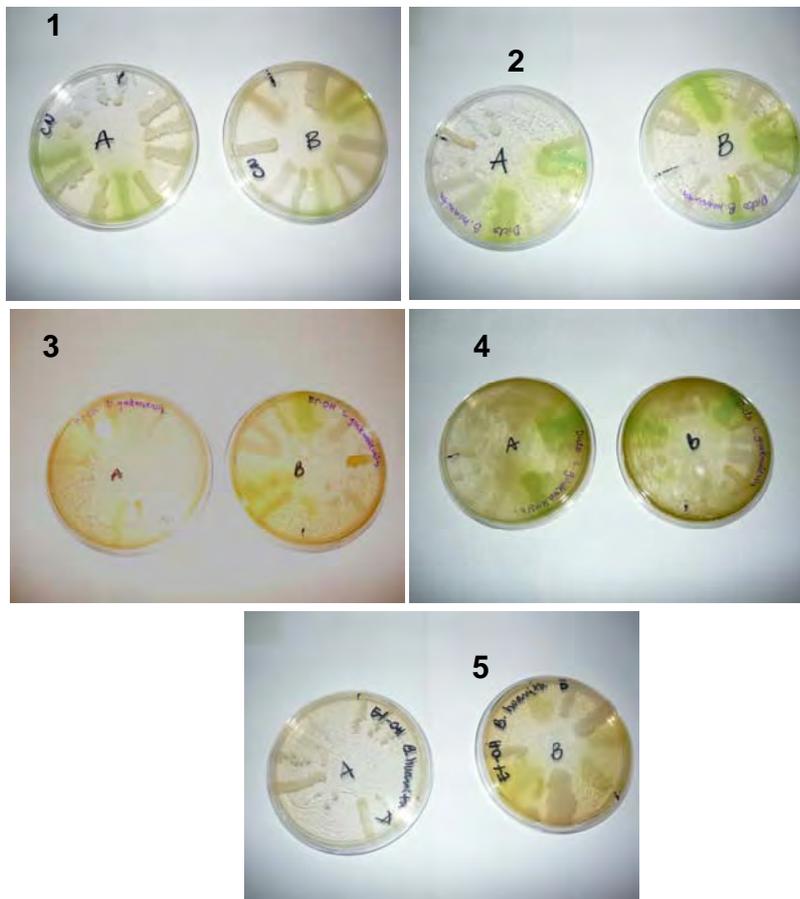


Pruebas macro y semimicro  
Flavonoides  
Laurel



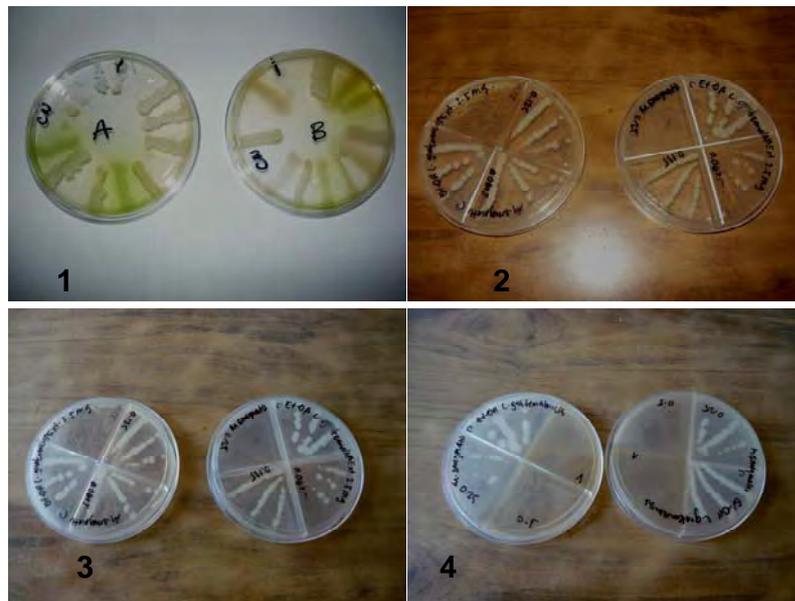
Aceites volátiles

### 12.4 Tamizaje antibacteriano y antilevadadura



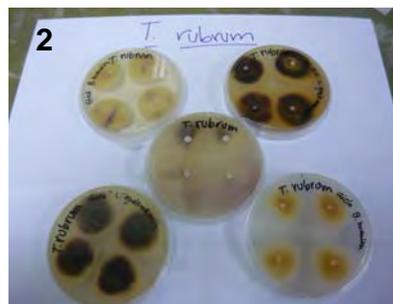
- 1= Control
- 2= Extracto diclorometánico de Esquisuchil (*B.huanita*)
- 3= Extracto diclorometánico de Laurel (*L.guatemalensis*)
- 4= Extracto etanólico de Laurel (*L. guatemalensis*)
- 5= Extracto etanólico de Esquisuchil (*B.huanita*).

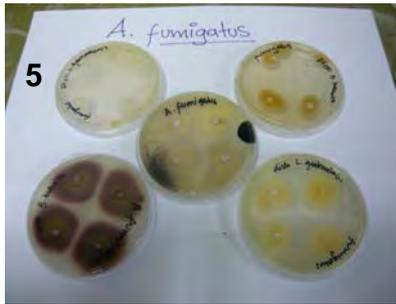
## 12.5 Concentración mínima inhibitoria de extractos (CIM)



- 1: Tamizaje antimicrobiano
- 2: Extracto etanólico de *L. guatemalensis* contra *Mycobacterium smegmatis*
- 3: Extracto etanólico de *L. guatemalensis* actividad a 0.025 mg/mL.
- 4: Extracto etanólico *L. guatemalensis*

## 12.6 Actividad antifúngica de extractos



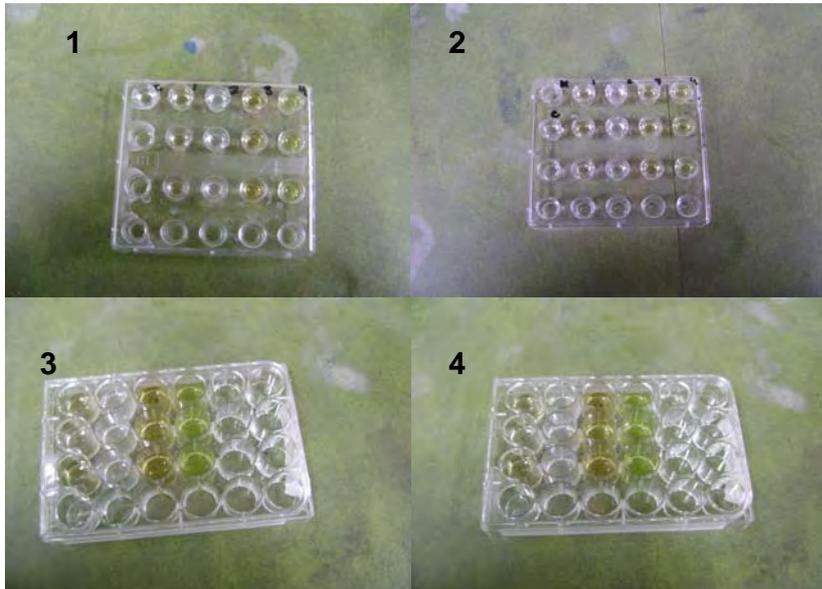


- 1= Preparación de material
- 2= *Trichophyton rubrum*
- 3= *Trichophyton mentagrophytes*
- 4= *Microsporum gypseum*
- 5= *Aspergillus fumigatus*
- 6= *Aspergillus flavus*
- 7= *Aspergillus niger*

### 12.7 Actividad citotóxica contra *Artemia salina*

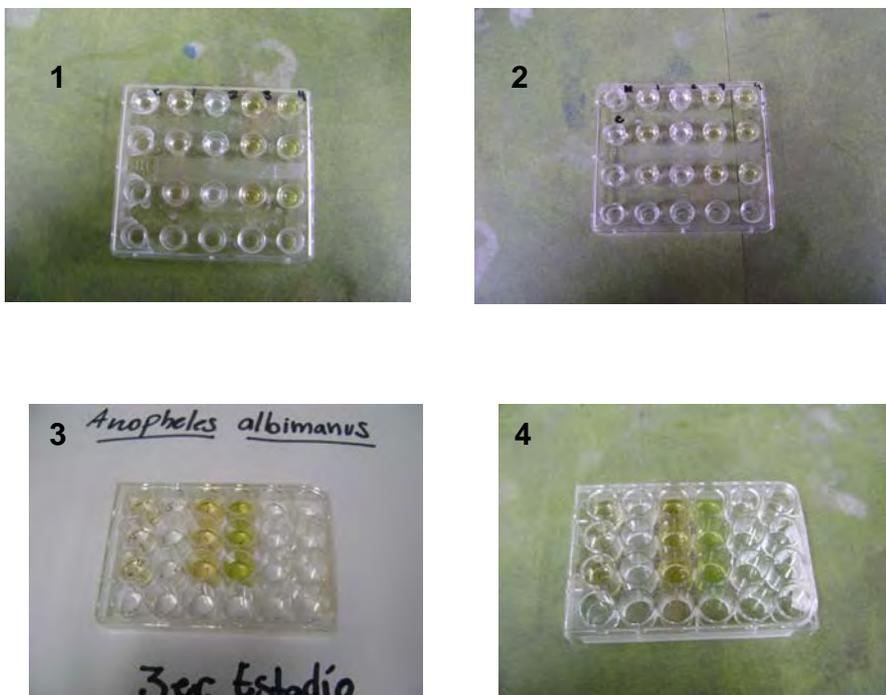


### 12.8 Actividad insecticida contra *A. aegypti*



- 1: Primer estadio                      2: Segundo estadio  
3: Tercer estadio                    4: Cuarto estadio

### 12.9 Actividad insecticida contra *A. albimanus*



- 1: Primer estadio                      2: Segundo estadio  
3: Tercer estadio                    4: Cuarto estadio