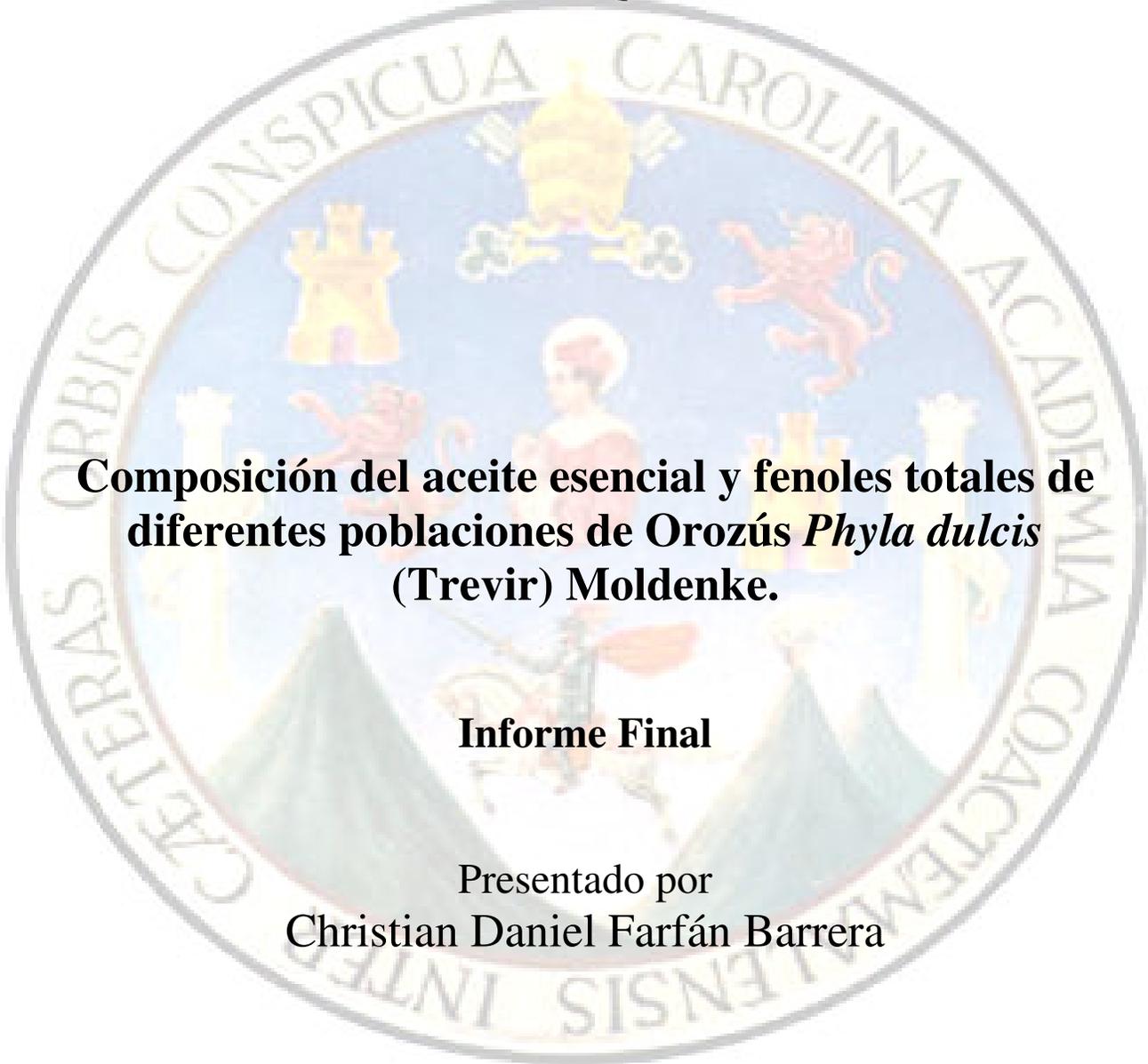


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, holding a staff and a book. Above him is a crown and a shield. The shield is divided into four quadrants, each containing a different symbol: a castle, a lion, a cross, and a cross. The text around the border of the seal reads "UNIVERSITAS CAROLINA ACCADEMIA COACTEMMALIENSIS INTER CÆTERAS ORBIS CONSPICUA".

**Composición del aceite esencial y fenoles totales de  
diferentes poblaciones de Orozús *Phyla dulcis*  
(Trevir) Moldenke.**

**Informe Final**

Presentado por  
Christian Daniel Farfán Barrera

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de  
Plantas Medicinales  
MUPLAM

Guatemala, octubre de 2009

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

JUNTA DIRECTIVA

OSCAR MANUEL COBAR PINTO, PhD	DECANO
LIC. PABLO ERNESTO OLIVA SOTO, MA.	SECRETARIO
LICDA. LILIAN RAQUEL IRVING ANTILLON, MA.	VOCAL I
LICDA. LILIANA VIDES DE URIZAR	VOCAL II
LIC. LUIS ANTONIO GALVEZ SANCHINELLI	VOCAL III
BR. MARIA ESTUARDO GUERRA VALLE	VOCAL IV
BR. BERTA ALEJANDRA MORALES MERIDA	VOCAL V

CONSEJO ACADÉMICO

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

OSCAR MANUEL COBAR PINTO, PhD, DECANO  
LICDA. ANNE MARIE LIERE DE GODOY, MSc.  
JORGE LUIS DE LEÓN ARANA, PhD.  
JORGE ERWIN LÓPEZ GUTIÉRREZ, PhD.  
LIC. FELIX RICARDO VELIZ FUENTES, MSc.

## **DEDICATORIA**

Acto que dedico:

A mis padres, Andrea y Manuel.

A mis hermanos Jason, Juan Carlos, María Eugenia, Will, Astrid; y demás familiares.

A todos mis amigos, especialmente a Tamara, Manuel, Elisandra, Odra, Chepe, César, Juan Pablo, Erick, Willy, Patty, Javier, Oliver, Max, Letty, Jorge Luis, Carlos, Roberto, Juan Carlos, Sunday, Tomasz, Tana, Linh, Sanja, Pablo, Signe, Marianne, Diana y Ana Judith.

A mis compañeras de la maestría Nathalia, Diana, Isabel, Jenny, Ligia y Keila.

## **AGRADECIMIENTOS**

Universidad San Carlos de Guatemala.

Dirección General de Investigación.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Unidad de Análisis Instrumental, Departamento de Análisis Inorgánico, Departamento de Físicoquímica Departamento de Citohistología y Departamento de Toxicología por toda la ayuda prestada durante la realización de mi tesina.

Centro Experimental y Docente de Agronomía –CEDA-.

A mi asesor Juan Francisco Pérez, PhD. por sus observaciones y sugerencias.

A mi revisor Lic. Rodolfo Orozco, MA. por su apoyo.

A todos los catedráticos de MUPLAM por compartir su conocimiento y experiencia.

A Benito Soler, PhD. por sus enseñanzas y consejos.

A los pobladores de Los Platanares, Santa Rosa y El Chico, Zacapa por toda la ayuda prestada de manera desinteresada.

## 1. INDICE

1	Indice	1
2	Resumen	3
3	Introducción	4
4	Definición del problema	5
5	Justificación	7
6	Marco teórico	8
6.1	Género <i>Phyla</i>	8
6.2	<i>Phyla dulcis</i> (Trevir) Moldenke	9
6.3	Distribución de <i>Phyla dulcis</i>	10
6.4	Análisis Químicos y Farmacológicos de <i>P. dulcis</i>	12
6.5	Aceites Esenciales	16
6.6	Extracción de Aceites Esenciales	17
6.7	Fenoles	19
7	Objetivos	22
8	Hipótesis	23
9	Materiales y métodos	24
9.1	Universo	24
9.2	Muestra	24
9.3	Diseño Estadístico	24
9.4	Repeticiones	24
9.5	Materiales	24
9.6	Reactivos	25
9.7	Equipo	25
9.8	Metodología	26
9.8.1	Muestreo	26

9.8.2 Preparación del material vegetal	26
9.8.3 Extracción de aceites esenciales con Likens-Nickerson	26
9.8.4 Análisis cromatográfico	26
9.8.5 Cuantificación de fenoles totales	27
10 Cronograma de actividades	28
11 Presupuesto	29
12 Resultados	30
12.1 Lugar de origen e información general del material vegetal	30
12.2 Extracción de aceites esenciales	30
12.3 Análisis de los aceites esenciales por cromatografía de gases Acoplada a espectrometría de masas	34
12.4 Cuantificación de fenoles totales	40
13 Discusión de Resultados	44
13.1 Lugar de origen e información general del material vegetal	44
13.2 Extracción de aceites esenciales	45
13.3 Análisis de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	46
13.4 Cuantificación de fenoles totales	48
14 Conclusiones	50
15 Recomendaciones	51
16 Referencias	52
ANEXOS	56

## 2. RESUMEN

En el presente estudio se investigaron las diferencias químicas en *Phyla dulcis* Trevir (Moldenke) u orozús de tres diferentes poblaciones ubicadas en Los Platanares, municipio de Guasacapán, Santa Rosa (262 msnm); El Chico, municipio de Usumatlán, Zacapa (929 msnm) y el Centro Experimental y Docente de Agronomía –CEDA- de la Facultad de Agronomía, Universidad San Carlos, Ciudad de Guatemala (1465 msnm). Los análisis se enfocaron en la determinación del porcentaje de rendimiento de aceite esencial y la cuantificación de fenoles totales de *P. dulcis*.

Se encontró que la población localizada en el CEDA presenta un mayor rendimiento de aceite esencial que la proveniente de El Chico con  $p$  de 0.0242. No fue posible realizar comparación estadística alguna con el rendimiento de Los Platanares debido a la falta de material vegetal proveniente de este lugar; únicamente se realizó una extracción de aceite esencial. Al realizar los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se encontró un alto contenido de sesquiterpenos en los aceites esenciales de las tres poblaciones estudiadas. También se encontró un alto contenido de 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, los cuales son los subproductos de la descomposición térmica de la hernandulcina (sesquiterpeno), la cual no fue detectada. No hubieron diferencias relevantes en la composición química de los aceites esenciales.

Con respecto de los fenoles totales, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la población de Los Platanares y las otras dos poblaciones ( $p$  de 0.001 para El Chico y  $p$  0.000 para el CEDA). Determinándose que en la población de Los Platanares existe un mayor contenido de fenoles.

Aunque los datos obtenidos no son del todo concluyentes, sugieren una relación entre la altitud y el rendimiento de aceite esencial y presencia de fenoles. Al aumentar la altitud de la población aparentemente aumenta la cantidad de aceite esencial y disminuye la de fenoles totales.

### 3. INTRODUCCIÓN

En Guatemala existe una gran variedad de plantas nativas utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades tales como las respiratorias. Sin embargo, varias de estas plantas como *Phyla dulcis* (Trevir) Moldenke, no son aprovechadas en todo su potencial como remedios caseros o productos fitoterapéuticos, en gran parte debido al poco conocimiento científico que hay acerca de las mismas.

Esta subutilización de los recursos naturales conlleva varias consecuencias negativas tales como la gradual desaparición de los mismos y la pérdida del conocimiento tradicional relacionado. Esto se observa claramente en el caso de *P. dulcis* la cual se distribuía ampliamente en varios departamentos de Guatemala hace tan sólo 17 años cuando el ICTA realizó un estudio extensivo de la misma. Hoy en día, la planta ya no se encuentra en varios de los sitios que fueron reportados por dicho estudio debido a que se considera en muchos lugares como maleza y es eliminada con herbicidas, a pesar de su utilidad como remedio para enfermedades del tracto respiratorio (ICTA 1992).

El objetivo principal del estudio fue la comparación de los aceites esenciales y fenoles totales entre diferentes poblaciones de *P. dulcis* en los departamentos de Guatemala (CEDA), Zacapa (El Chico) y Santa Rosa (Los Platanares) a diferentes altitudes. Encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de rendimiento de aceite esencial de la población del CEDA (el cual fue el mayor) y la de El Chico. El mismo caso se observó al comparar el contenido de fenoles totales de la población de Los Platanares (el cual tuvo el mayor contenido) y las otras dos poblaciones. Sin embargo, no se encontraron diferencias relevantes en el contenido del aceite esencial o diferencias estadísticamente significativas que incluyeran a las tres poblaciones.

#### 4. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Las infecciones del sistema respiratorio se encuentran entre las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en Guatemala. Entre los síntomas que se presentan durante dichas infecciones se incluyen la tos, dificultad para respirar, fiebre, malestar general y congestión nasal. Las principales patologías respiratorias incluyen a la bronquitis, bronquiolitis, catarro, faringitis, laringotraqueitis, otitis, resfrío común, síndrome respiratorio agudo severo, sinusitis y tuberculosis.

Una planta nativa de Guatemala que se utiliza popularmente como demulcente, expectorante, espasmolítica, antitusiva y febrífuga en el tratamiento de afecciones respiratorias es *Phyla dulcis* (Trevir) Moldenke u orozú, de la familia Verbenaceae. Se conoce de una cantidad reducida de estudios sobre esta planta en Guatemala (ICTA 1992; Fischer 1997). De los tres estudios encontrados; únicamente dos se refieren a su composición química (Fischer 1997; Pérez 2008).

En el caso de *P. dulcis* se puede esperar la presencia de quimiotipos. Esto se puede deber a desigualdades en la expresión fenotípica de la especie cuando sus individuos se desarrollan en diferentes ambientes. En la literatura internacional ya se encuentran reportadas diferencias químicas entre individuos colectados en Puerto Rico, los cuales son ricos en terpenos de quince carbonos o sesquiterpenos (75% del aceite esencial), en particular la hernandulcina; e individuos colectados en México, donde no se encontraron dichos compuestos. Aunque se debe mencionar que los individuos analizados en México no fueron identificados plenamente.

En la familia Verbenaceae se encuentran reportados quimiotipos diferentes en especies nativas que también son utilizadas en el tratamiento de afecciones del sistema respiratorio. Una de ellas es *Lippia graveolens* HBK, la cual en su aceite esencial presenta variaciones respecto al terpeno mayoritario; siendo en algunas poblaciones el carvacrol, en otras el timol y en otras no se presenta ningún terpeno en proporción mayoritaria marcada. *Lippia alba* (Mills) N.E. Brown, presenta variaciones en quimiotipos de terpenos como el geraniol

y el mirceno, y otro quimiotipo rico en carvona y limoneno. Todo esto sugiere que pueden haber diferencias en los terpenos entre las diferentes poblaciones de *P. dulcis*. Al determinar estas diferencias se logra establecer una relación entre la composición química y la procedencia de la población.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La comparación del aceite esencial y fenoles totales de diferentes poblaciones de *P. dulcis* constituye uno de los primeros pasos necesarios para la determinación de las características fitoquímicas que son reproducibles entre cada población y las que no lo son. Dichas características son fundamentales para la explicación de otras propiedades que se puedan observar en la planta o en sus extractos tales como actividad farmacológica o toxicidad.

De igual manera, esta información ayuda a determinar algunos parámetros químicos relevantes para establecer la calidad de la droga cruda o extractos de *P. dulcis*. Estos parámetros incluirían en este caso la cantidad de fenoles totales, además del porcentaje de rendimiento, perfil cromatográfico. La identificación de su compuesto químico más característico, la hernandulcina o bien de sus precursores aportaría otros elementos para su caracterización química.

Es sobre esta información química básica que es posible desarrollar investigaciones posteriores enfocadas ya a la actividad farmacológica y en última instancia utilidad, factibilidad y seguridad de *P. dulcis* como remedio tradicional o fitofarmacéutico para el tratamiento de afecciones respiratorias u otro tipo de afección. La finalidad de la caracterización química de *P. dulcis* de diferentes poblaciones es entonces lograr establecer las primeras diferencias cualitativas y cuantitativas entre las poblaciones estudiadas.

## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Género *Phyla*

Las especies que se encuentran dentro del género *Phyla* son en su mayoría hierbas perennes y en algunas raras ocasiones arbustos pequeños, frecuentemente decumbentes hasta postrados y enraizando en los nudos. Las hojas son simples, opuestas, con bases decurrentes sobre el pecíolo, mientras que el margen es dentado, especialmente en el ápice, presentan tricomas malpigiáceos. (Stevens 2001:2517)

Las inflorescencias de espigas cilíndricas son axilares, ya sea en espigas solitarias o en fascículos de 2 a 4, con flores pequeñas y blancas con manchas tubulares amarillas, las cuales se pueden tornar púrpura con la edad. Las brácteas son persistentes y relativamente conspicuas, las superiores son espatuladas, las flores se encuentran en sus axilas. (Stevens 2001:2517)

Los cálices son ovoide-campanulados, 2-carinado, 2 ó 4 dentado. Los tubos de las corolas son cilíndricos, angostos, erectos o curvados, limbo oblicuo, ligeramente 2-labiado, 4-lobado, los lobos desiguales. Mientras que los estambres son 4, incluidos o ligeramente exsertos, estigmas inconspicuamente 2-lobados, generalmente oblicuos. Las espigas son más alargadas al tener frutos. Éstos son pequeños, secos, cubiertos por el cáliz persistente, y se separan al madurar en 2 pirenos, cada uno con una semilla. (Stevens 2001:2517)

Se conoce de 9 especies. Son nativas de América desde el norte de Estados Unidos hasta la zona templada Sudamericana, y en las Antillas. Se introducen ampliamente en todas las áreas tropicales y cálidas del mundo. El género se encuentra estrechamente relacionado con *Lippia*, en el cual frecuentemente se clasifican a *P. stoechadifolia* y *P. dulcis*. (Stevens 2001:2517)

Un estudio del género *Phyla* realizado por Kennedy (1992) distribuye a las especies de la siguiente manera:

1. Espigas subsésiles en pedúnculos cortos de 0.2-0.5 cm de largo, 2-4 espigas por axila de la hoja; corola 1.2-1.7 mm de largo..... ***P. betulifolia***
1. Espigas en pedúnculos de 2.5-6.5 cm de largo, 1 espiga por axila de la hoja; corola 3-4.5 mm de largo
  2. Hojas linear-oblongas, con 10-16 pares de nervios secundarios, envés con nervios prominentes..... ***P. stoechadifolia***
  2. Hojas no linear-oblongas, con 4-6 pares de nervios o nervios inconspicuos en el envés
    3. Hojas con tricomas simples, los del haz con base agrandada, margen de la hoja con dientes redondeados, base de la hoja abruptamente decurrente; cáliz denso y completamente cubierto de tricomas..... ***P. dulcis***
    3. Hojas con tricomas malpigiáceos, margen de la hoja con dientes agudos, base de la hoja gradualmente decurrente; cáliz con tricomas limitados a las carinas.
      4. Hojas espatuladas, ápice generalmente redondeado, envés con nervios inconspicuos, dientes limitados al 1/-1/3 del ápice..... ***P. nodiflora***
      4. Hojas oblongo-ovadas, ápice agudo, envés con nervios prominentes, dientes por lo menos hasta la mitad apical de la hoja... ***P. strigulosa***

## 6.2 *Phyla dulcis* (Trevir) Moldenke

Es una especie perteneciente a la familia Verbenaceae. Cuenta con varios sinónimos entre los que se encuentran *Lippia dulcis* Trev., *Lippia scaberrima* Mold., *Phyla scaberrima* (Juss.) Moldenke, *Zapcinia scaberrima* Juss. ex Pers. (Enda-caribe, 1996), *Lippia asperifolia* Benth., *L. asperifolia* Reichemb, *L. dulcis* var. *mexicana* Wehmer, *Zapania scaberrima* Juss. ex Pers. (Fischer, 1997:16). En la literatura se hace referencia a la especie principalmente como *P. dulcis* o *L. dulcis*. Entre los nombres comunes por los que se le conoce se encuentran orozús, orozuz, orozuz de la tierra, tzonpelic xihuitl, hierba buena, hierba dulce, yerba dulce, oro azul, orosul, corcoronchocho, salvia santa, honey herb

(Souto-Bachiller *et al.* 1996: 1077), corronchocho, fog fruit, guia guace, herba lippiae mexicanae, lippia mexicana, lippiae mexicanae, malva, mexican lippia, mexicanisches lippenkraut, orégano de monte, orozuz cimarrón, orozuz del país, orozuz de la tierra, regaliz de Cuba, sacsituan, sweet lippia, x thuhuy xiu, x tuhuyxiu y xtuhuexiu (Fischer, 1997:16).

Se trata de una planta herbácea pero a veces ligeramente leñosas en la base, decumbente o postrada, enraizando en los nudos, o erectas, aromáticas. Los tallos jóvenes cuentan con tricomas simples diminutos, rápidamente glabros. Mientras que las hojas son ovadas (lanceoladas), con un ancho de 1.5 a 4 cm y una longitud de 3 a 7 cm. Los ápices de las hojas son agudos, márgenes gruesamente crenados en los  $\frac{3}{4}$  apicales o más, haces con tricomas simples adpresos, dispersos a abundantes, con bases agrandadas con la edad, envés puberulento. (Stevens 2001:2518; Núñez 1978:260; Morton *et al.* 1981:746; Ministerio de Salud de Nicaragua 1986:147)

Las inflorescencias tienen una longitud entre 0.4 y 0.9 cm y un ancho entre 0.4 y 0.6 cm. Al fructificar estas dimensiones cambian ya que se observa una longitud entre 1 y 1.8 cm un ancho entre 0.5 y 0.6 cm. Se observa una espiga por axila, pedúnculos de 2.5 a 5 cm de largo. Las brácteas son verdes, siendo las inferiores ovadas o lanceoladas, 2 a 4 mm de largo y 1.25 a 3 mm de ancho; mientras que las superiores son obovado-espátuladas (rómicas), 3 mm de largo y 1.25 a 2 mm de ancho, ápices redondeados, mucronados; cálices de 1 a 1.25 mm de largo, densamente cubiertos de diminutos tricomas. Las corolas son de 3 mm de largo. (Stevens 2001:2518; Núñez 1978:260; Morton *et al.* 1981:746; Ministerio de Salud de Nicaragua 1986:147)

### **6.3 Distribución de *Phyla dulcis***

Especie ampliamente distribuida entre México y Panamá, también se encuentra presente en las islas del mar Caribe. (Williams 1981:332) Entre los países que menciona Fischer (1997) se incluyen a Estados Unidos (Arizona), Cuba, República Dominicana, Puerto Rico, Colombia, Chile, Venezuela e India. En Guatemala se encuentra entre los 0 y 1800 msnm principalmente en lugares muy húmedos como orillas de cuerpos acuíferos. Se ha

encontrado en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Guatemala, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa y Sololá (Gibson 1970:210). Otros departamentos donde ha sido reportado son Jalapa, Jutiapa, Chimaltenango, Quetzaltenango y Baja Verapaz (Fischer, 1997:66-84)

**Tabla 1. Localización de *P. dulcis* en diferentes departamentos de Guatemala**

Localidad	Municipio	Departamento	Latitud/ Longitud	Altitud (msnm)	Zona de vida
El Chagüite	Jalapa	Jalapa	14°21'20" 90°01'08"	1350	Bosque húmedo subtropical templado
Morazán	Monjas	Jalapa	14°31'07" 89°55'07"	1010	Bosque seco subtropical
Jalapa	Jalapa	Jalapa	14°38'02" 89°58'52"	1362	Bosque húmedo subtropical templado
El Chaguité	Jalapa	Jalapa	14°41'20" 90°01'08"	1362	Bosque húmedo subtropical templado
San Juan	El Progreso	Jutiapa	14°19'40" 89°51'00"	930	Bosque húmedo subtropical templado
Platanares	Guasacapán	Santa Rosa	14°04'04" 90°26'22"	240	Bosque muy húmedo subtropical cálido
Guadiela	Chiquimulilla	Santa Rosa	14°09'32" 90°21'50"	1100	Bosque muy húmedo subtropical cálido
Finca La Morena	Chiquimulilla	Santa Rosa	14°10'49" 90°22'35"	760	Bosque muy húmedo subtropical cálido
El Junquillo	Barberena	Santa Rosa	14°20'17" 90°20'43"	1380	Bosque muy húmedo subtropical cálido
El Junquillo	Barberena	Santa Rosa	14°20'30" 90°20'50"	1330	Bosque muy húmedo subtropical cálido
El Cerinal	Barberena	Santa Rosa	14°18'26" 90°25'10"	1195	Bosque muy húmedo subtropical cálido
El Cerinal	Barberena	Santa Rosa	14°19'45" 90°24'06"	1010	Bosque muy húmedo subtropical cálido
Las Dantas	Granados	Baja Verapaz	14°54'56" 90°32'45"	1220	Bosque húmedo subtropical templado
Santa Cruz el Chol	Santa Cruz el Chol	Baja Verapaz	14°57'40" 90°29'16"	1008	Bosque húmedo subtropical templado
El Chiac	Rabinal	Baja Verapaz	15°05'05" 90°31'12"	975	Bosque húmedo subtropical templado
San Miguel Chicaj	San Miguel Chicaj	Baja Verapaz	15°05'37" 90°24'02"	940	Bosque húmedo subtropical templado
Candelaria	San Juan Alotenango	Sacatepéquez	14°25'40" 90°49'13"	1060	Bosque muy húmedo subtropical cálido

**Tabla 1 (Continuación)**

San Juan Alotenango	San Juan Alotenango	Sacatepéquez	14°29'00" 90°48'17"	1388	Bosque muy húmedo subtropical cálido
San Lorenzo	Ciudad Vieja	Sacatepéquez	14°32'12" 90°46'13"	1530	Bosque muy húmedo subtropical cálido
Sabana Grande	El Rodeo	Escuintla	14°22'57" 90°49'54"	720	Bosque muy húmedo subtropical cálido
Barrio Chacalapa	Esquipulas	Chiquimula	14°33'44" 90°20'55"	930	Bosque húmedo subtropical templado
San Ramón Patí	San Rafael Pie de la Cuesta	San Marcos	14°33'50" 90°54'48"	1038	Bosque muy húmedo subtropical cálido
San Ramón Patí	San Rafael Pie de la Cuesta	San Marcos	14°56'39" 90°54'49"	1039	Bosque muy húmedo subtropical cálido
San Rafael Pie de la Cuesta	San Rafael Pie de la Cuesta	San Marcos	14°55'55" 90°54'49"	1039	Bosque muy húmedo subtropical cálido
Santa Cruz Muluá	Santa Cruz Muluá	San Marcos	14°34'52" 91°37'26"	389	Bosque muy húmedo subtropical cálido
Las Mercedes	Colomba	Quetzaltenango	14°42'18" 91°45'57"	960	Bosque muy húmedo subtropical cálido
El Huité	San Martín Jilotepeque	Chimaltenango	14°47'39" 90°47'21"	1800	Bosque húmedo montano bajo subtropical
Las Escobas	Villa Canales	Guatemala	14°19'18" 90°33'35"	1100	Bosque muy húmedo subtropical cálido

Fuente: ICTA, 1992 y Fischer, 1997.

#### 6.4 Análisis Químicos y Farmacológicos de *P. dulcis*

Uno de los estudios realizados en Guatemala de *P. dulcis* investigó el rendimiento de la extracción de aceite esencial por hidrodestilación con aparato Clevenger. De igual manera, se determinó la composición del aceite esencial haciendo uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se colectaron muestras en Barberena, Santa Rosa y en el CEDA, Ciudad de Guatemala. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Rendimiento y Composición Química de los Aceites Esenciales de Tres Muestras de *P. dulcis***

Rendimiento (%)/ Sustancia (% Área)	Muestra CEDA	Muestra 1 Barberena	Muestra 2 Barberena
<b>Aceite Esencial</b>	<b>0.84</b>	<b>0.82</b>	<b>0.70</b>
6-metil-5-hepten-2-ona	16.8	17.6	20.5
3-metil-2-ciclohexenona	13.3	12.7	15.7
(E)-Cariofileno	11.6	8.4	7.7
$\alpha$ -Bisabolol	7.8	6.9	5.7
(E,E)- $\alpha$ -Farneseno	6.7	7.1	5.8
$\delta$ -Cadineno	6.3	2.7	6.4
$\delta$ -Selineno	5.4	6.4	5.8
Otros	32.1	38.2	32.4

Fuente: Pérez 2008.

En ninguno de los tres casos se observó la presencia de hernandulcina. Sin embargo los componentes mayoritarios fueron 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexanona, los cuales son los subproductos de la descomposición térmica de la hernandulcina. Debido a ello, se puede inferir su presencia en los tres aceites esenciales analizados.

Se realizó un segundo análisis de la muestra colectada en el CEDA. En esta ocasión se modificaron las condiciones de operación del cromatógrafo de gases con la finalidad de exponer la hernandulcina a un menor riesgo de descomposición térmica. El principal cambio fue la disminución de la temperatura de inyección. Efectivamente se logró identificar hernandulcina en esta muestra haciendo uso del espectro de masas obtenido, donde se observan los picos característicos a 218 m/z (eliminación de agua), 137 m/z (fragmentación) y otros picos importantes en 153, 110, 95, 82 y 69 m/z (Pérez 2008:165).

Por último, se comparó la composición química de la población de Barberena a lo largo de un año. Se encontró que la composición no varió ampliamente entre las tres épocas colectadas (abril, junio y octubre). En los tres casos, 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-

ciclohexenona fueron los componentes principales. Aunque en el mes de abril, la concentración de  $\alpha$ -Bisabolol puede haber sido mayor que la de 3-metil-2-ciclohexanona (Pérez 2008:164).

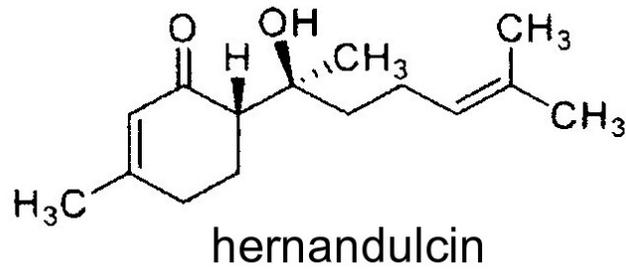
Fischer (1997) reporta la presencia de 6-metil-5-hepten-2-ona (11.0-15.8%), 3-metil-2-ciclohexenona (6.9-9.7%), Cariofileno (7.1-8.8%) y  $\delta$ -Cadineno (5.2-6.4%) en cantidades importantes en el aceite esencial de cuatro muestras colectadas en Las Mercedes, Quetzaltenango. Sin embargo, también reporta altas cantidades de  $\alpha$ -Copaeno (4.0-6.2%), Germacreno B (4.9-7.1%), epi- $\alpha$ -Bisabolol (10.1-13.1 %), cis- $\beta$ -Farneseno y Espotuleno a diferencia de lo reportado por Pérez (2008).

Uno de los estudios más importantes de la composición química realizado fuera de Guatemala fue el hecho por Souto-Bachiller (1997). Al comparar la composición química de los aceites esenciales de *P. dulcis* colectada en Orocovis, Puerto Rico y en Morelos, México se observan variaciones que sugieren la presencia de más de un quimiotipo de *P. dulcis*. El contenido total de monoterpenos de la muestra obtenida en México es de 86.29% mientras que la de Puerto Rico es de tan sólo 8.14%. Por aparte, el contenido total de sesquiterpenos es de 6.00% en el primer caso y 79.52% en el segundo.

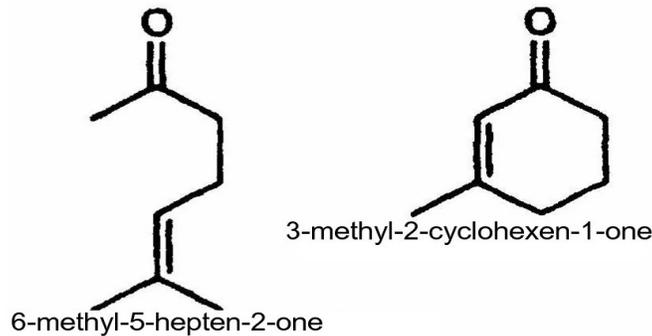
**Tabla 3. Comparación de la Composición Química del Aceite Esencial de *P. dulcis* en Puerto Rico (Orocovis) y en México (Morelos)**

Sustancia (% Área)	Orocovis	Morelos
Alcanfor	0.00	53.24
Canfeno	0.12	15.99
Limoneno	0.00	7.47
(+)-Hernandulcina	36.00	0.00
(-)-epi-Hernandulcina	22.00	0.00

Fuente: Souto-Bachiller 1997



Esquema 1: Estructura química de la hernandulcina. Fuente: Google Images.



Esquema 2: Estructura química de 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.

Debido al uso tradicional de *P. dulcis* como remedio casero para el tratamiento de afecciones del sistema respiratorio, digestivo y como condimento de comida tanto en Guatemala como en otros países del mundo (Pascual *et al.* 2001:201-206; Cáceres *et al.* 1991:193-208) cabe la posibilidad que tenga alguna acción farmacológica. Se reporta actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* (Cáceres *et al.* 1993: 31-38) pero no contra el cólera (Guevara *et al.* 1994:27-31).

Otro estudio determinó que los extractos metanólicos de *P. dulcis* no tienen acción antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Alcaligenes faecalis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Arthrobacter globiformis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Micrococcus roseus*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium rodochrus* y *Mycobacterium smegmatis* (Meléndez y Capriles 2006:272). También se ha determinado la acción anti-histaminérgica y anti-colinérgica del aceite esencial a concentraciones de 100 µg/ml utilizando el bioensayo porcino bronquial

(Görnemann *et al.* 2008:166). Mientras que la actividad anti-inflamatoria de los extractos etanólicos fue comprobada en varios modelos animales incluyendo la inflamación con carragenina, granuloma producida con algodón y edema inducido con TPA. Los extractos hexánicos fueron inactivos (Pérez *et al.* 2005:1).

## **6.5 Aceites Esenciales**

El aceite esencial es una muestra compleja, constituida principalmente de terpenos de bajo peso molecular y fenilpropanoides. Los monoterpenos y sesquiterpenos (10 y 15 átomos de carbono respectivamente) son los compuestos más comunes en dicha muestra; y se caracterizan por ser insolubles en agua, ligeramente solubles en alcoholes y muy solubles en compuestos apolares tales como el n-pentano, n-hexano, benceno, éter de petróleo, entre otros. Sin embargo son susceptibles a oxidaciones provocadas por el oxígeno atmosférico o por luz *uv-vis* (Bruneton 2001:478).

Los terpenos y fenilpropanoides por ende pertenecen al grupo de compuestos denominados como “metabolitos secundarios”, los cuales se caracterizan por no ser producidos en el metabolismo primario, no ser vitales al ser vivo que los produce y de tener una utilidad a veces desconocida. De igual manera los terpenos o terpenoides presentan en sus estructuras múltiplos de 2-metil-1,3-butadieno ya que son el resultado del metabolismo del ácido mevalónico. Por aparte, los fenilpropanoides se caracterizan por contar con una estructura de un anillo aromático unido a un grupo propilo (3 carbonos) por lo que son conocidos también como C6C3 y son productos de reacciones a partir del aminoácido fenilalanina (Bruneton 2001:484-486).

También existen otros compuestos que no son derivados del metabolismo del ácido mevalónico o de la fenilalanina y que también se encuentran dentro de los aceites esenciales que se extraen. Estos compuestos comparten propiedades físicas con los terpenos y fenilpropanoides tales como volatilidad y bajo punto de ebullición (Bruneton 2001:486).

En el reino vegetal, los aceites esenciales se encuentran frecuentemente en las hojas, flores y semillas. Las familias que se caracterizan por presentar aceites esenciales entre sus especies son: Apiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Rutaceae y Verbenaceae. En el caso particular de *P. dulcis*, esta especie pertenece a la familia Verbenaceae (género *Phyla* o *Lippia*). Las industrias químicas y farmacéuticas han investigado extensivamente estas familias debido a su utilidad como antibacterianos, estimulantes, estomáquicos, analgésicos, aromatizantes y sedantes entre otras (Bruneton 2001:481).

Los aceites esenciales son de amplio uso en la industria debido principalmente a los aromas agradables que poseen. Se utilizan tanto en la producción de perfumes, cosméticos y jabones como de condimentos y dulces. Otras industrias que también utilizan los aceites esenciales son las de aromatizantes, plásticos, cauchos e insecticidas. Debido a su complejidad estructural también se utilizan como sustratos para la síntesis de compuestos de interés y los que son biológicamente activos se utilizan en la industria farmacéutica como analgésicos, antibacterianos, expectorantes, estimulantes, estomáquicos y anti cancerígenos entre otros. (Bandoni 2003:19)

## **6.6 Extracción de Aceites Esenciales**

Existen varias técnicas para llevar a cabo la extracción de aceites esenciales. Estas incluyen la maceración, percolación, arrastre con vapor de agua e hidrodestilación. En el caso de la maceración y percolación se presenta el inconveniente que el aceite esencial es extraído a la par de los otros metabolitos presentes en el material vegetal tales como flavonoides, alcaloides, cumarinas, otros metabolitos secundarios y primarios. Debido a ello, las técnicas de hidrodestilación y arrastre con vapor de agua son las más utilizada para la obtención de aceites esenciales. (Bandoni 2003:142-143)

Actualmente se utiliza la técnica de extracción de aceites esenciales con el aparato Clevenger para la realización de extracciones con fines analíticos. Aunque presenta el inconveniente de promover reacciones de oxidación debido a la temperatura de operación y a la cantidad de agua que utiliza. Por otra parte, existe una técnica emergente que requiere

de un aparato tipo Likens-Nickerson la cual expone el aceite esencial a un menor riesgo de oxidación del mismo. La ventaja radica en que mientras el Clevenger hace uso de hidrodestilación, exponiendo a la muestra a un contacto constante con agua caliente, el Likens-Nickerson utiliza arrastre con vapor de agua que evita dicho contacto aunque no el calor. (Pereira *et al.* 2003)

Otro de los factores que hay que tomar en cuenta en la extracción de aceites esenciales y que resulta fundamental es la selección adecuada de disolvente orgánico a utilizar. En la actualidad el n-pentano se utiliza tanto en hidrodestilaciones con Clevenger como extracciones con Likens-Nickerson. Esto se debe a la alta solubilidad de los fenilpropanoides, monoterpenos y sesquiterpenos en él como a su alta volatilidad y bajo punto de ebullición, lo cual permite que una vez extraído el aceite, sea posible eliminar el n-pentano sin hacer un alto gasto de energía y así minimizar la pérdida de aceite esencial por evaporación. Otras propiedades que hacen que el n-pentano sea el disolvente ideal para la extracción de aceites esenciales incluyen su insolubilidad en agua, baja densidad y alta presión de vapor. (Farfán 2008:6)

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

Al haberse determinado que una planta cumple con los parámetros mencionados anteriormente es posible hacer su introducción al mercado con una mejor oportunidad de éxito. De acuerdo a la industria a la que se destine el aceite, se encuentran diferentes restricciones. Por un lado en las industrias relacionadas con la química, la aceptación de un nuevo aceite presenta menos restricciones debido a que se utilizaría como disolvente o

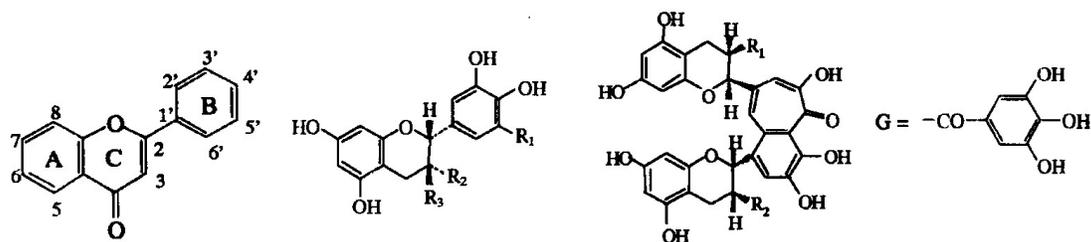
sustrato. Mientras que en la industria cosmética y de aromas se encuentran patrones y estándares elevados que se enfocan en la homogeneidad del aceite. (Farfán 2008:6)

## 6.7 Fenoles

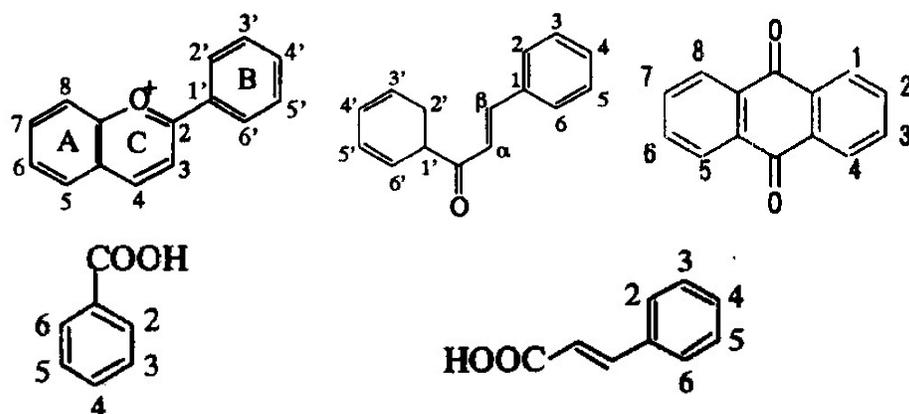
Los fenoles se dividen en dos grupos principales, los policíclicos y los simples. Entre los primeros encontramos a los flavonoides, antraquinonas, taninos y otros polifenoles policíclicos.

5.6.1 Flavonoides: Éste es el grupo más ampliamente estudiado. Cuentan con dos anillos de benzo-1-pirano-4-quinona (anillos A y C) y un anillo B. De acuerdo a la posición de los grupos hidroxilo y demás grupos funcionales, se subclasifican de la siguiente manera (Sun *et al.* 2000:1373):

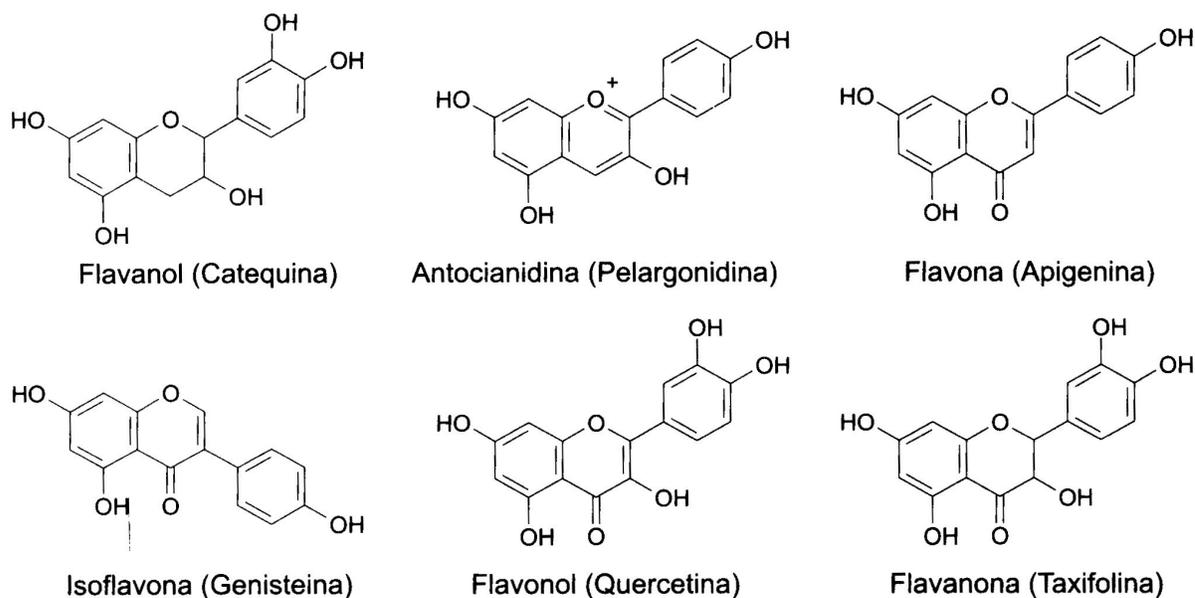
- 6.7.1.1 Flavonas: Estructura básica.
- 6.7.1.2 Flavonoides: Presenta un grupo hidroxilo en la posición 3.
- 6.7.1.3 Flavanonas: El enlace 2-3 se encuentra saturado.
- 6.7.1.4 Catequinas: El anillo C es un 1-pirano.
- 6.7.1.5 Chalconas: Presentan un anillo C abierto.
- 6.7.1.6 Antocianidinas: El anillo C es un 1-pirano, enlaces 1-2 y 3-4 insaturados.



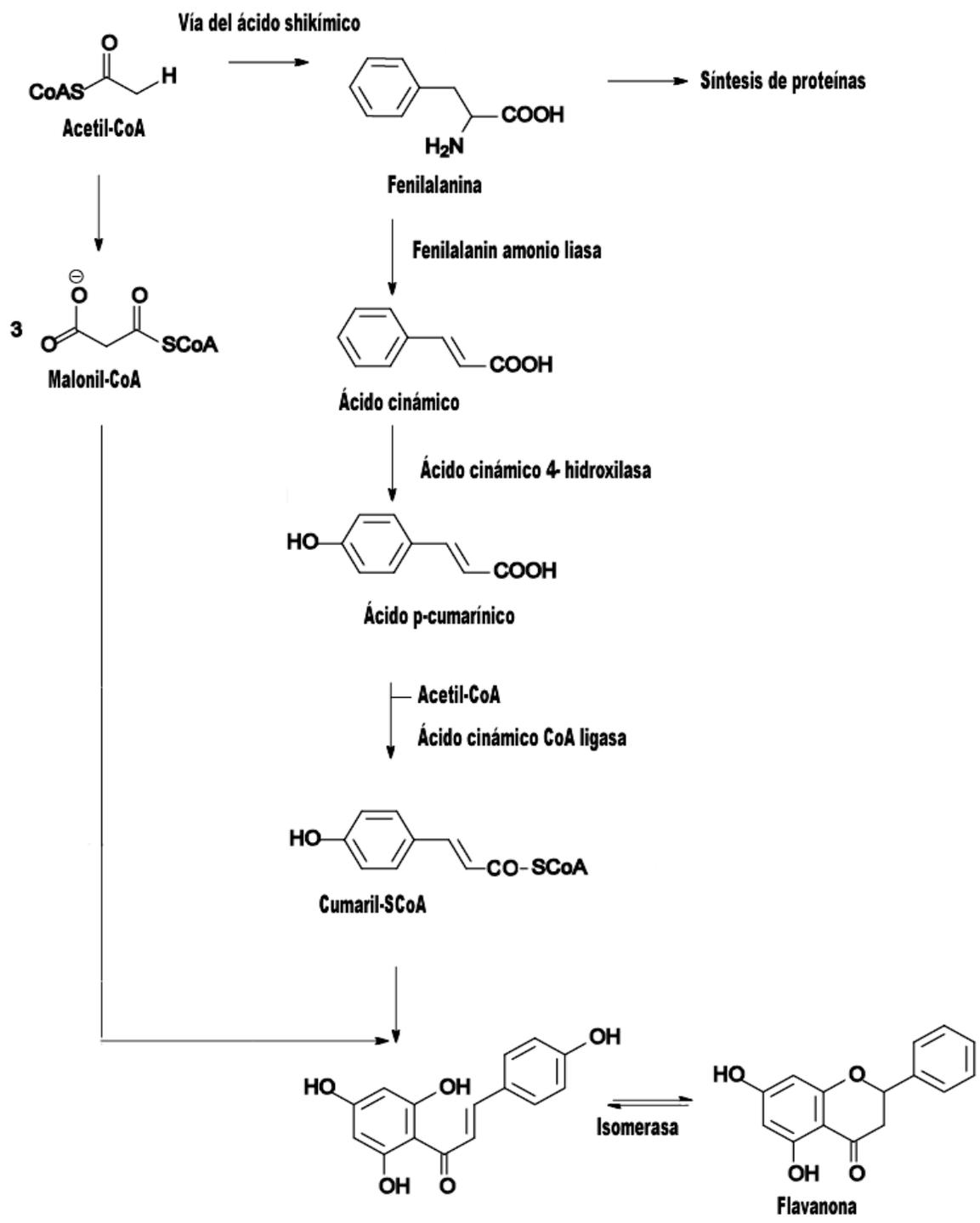
Esquema 3. Esqueleto de flavonoides, catequinas y teaflavinas. Fuente: Imágenes Google.



Esquema 4. De izquierda a derecha, esqueletos de antocianinas, chalconas, antraquinonas y dos polifenoles simples (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos). Fuente: Imágenes Google.



Esquema 5. Estructuras de las principales clases de flavonoides. Fuente: Imágenes Google.



Esquema 6: Biosíntesis de chalconas (2 anillos) y flavanonas (3 anillos). Fuente: Imágenes Google.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 General**

Evaluar las diferencias en el contenido de aceites esenciales y fenoles totales en *Phyla dulcis* de tres poblaciones de Guatemala.

### **7.2 Específicos**

7.2.1 Cuantificar el rendimiento de la extracción de aceites esenciales de diferentes poblaciones de *P. dulcis*.

7.2.2 Determinar y comparar la composición de los aceites esenciales de diferentes poblaciones de *P. dulcis*.

7.2.3 Cuantificar los fenoles totales de diferentes poblaciones de *P. dulcis*.

## **8. HIPÓTESIS**

Existen diferencias en la cantidad de aceite esencial y fenoles totales en *P. dulcis* de diferentes poblaciones de Guatemala.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Universo

*P. dulcis* colectada en tres diferentes altitudes en Guatemala. Santa Rosa (0-600 msnm), Zacapa (601-1,200 msnm) y Guatemala (1,201-1,800 msnm).

### 9.2 Muestra

Hojas de *P. dulcis*.

### 9.3 Diseño estadístico

Para variables de porcentaje de rendimiento y mg equivalentes de ácido gálico por gramo (distribución normal):

Análisis descriptivo (muestras): Media  $\pm$  desviación estándar, representado gráficamente en cajas de Tuckey.

Análisis inferencial (poblaciones): Prueba de homogeneidad de varianzas (estadística de Levene), análisis de varianza de una vía, con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ), HSD de Tukey e intervalos de confianza para las medias poblacionales.

Software: Excel 2007, SPSS 15.0, Minitab 14.0.

### 9.4 Repeticiones

Para cada uno de los ensayos se realizará un total de cuatro repeticiones

### 9.5 Materiales

Tijeras para colecta

Sacos para colecta

Bandejas de plástico

2 Balones de 2 bocas de 1000 ml

Viales ámbar de 2 ml

Viales transparentes de 10 ml

Micropipetas Pasteur

Agitador magnético

Tubos de ensayo de 10 ml  
Balones aforados de 25 ml  
Celdas de cuarzo de 2 ml  
Pipetas automáticas de volumen variable  
Puntas para pipetas de 100 y 1000  $\mu\text{L}$   
Beakers de 40 y 250 ml

## 9.6 Reactivos

n-Pentano A  
Cloroformo A  
Ácido clorhídrico R  
Metanol A  
Agua destilada  
Folin-Ciocalteu A

## 9.7 Equipo

Procesador de alimentos  
Aparato Likens-Nickerson  
Horno de convección  
Baño ultrasónico con regulador de temperatura  
Estufa  
Balanza analítica  
Balanza semianalítica  
Refrigeradora  
Campana de extracción  
Espectrofotómetro uv-vis  
Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas HP 5890 Series II  
Espectrofotómetro uv-vis Thermo Scientific Evolution 300  
Centrifugadora

## 9.8 Metodología

**9.8.1 Muestreo:** Se realizaron viajes de campo a diferentes sitios de los departamentos mencionados por Fischer (1997) e ICTA (1992). Dichos viajes tuvieron como propósito la colecta de material vegetal (hojas) de diferentes poblaciones de *P. dulcis*. Cada muestra se identificó con el nombre de la especie, el nombre del lugar donde fue colectado y el número de colecta correspondiente. También se tomaron datos de posicionamiento global (GPS). Dependiendo del tamaño de la población se colectaran entre 1000 y 2000 gramos de material fresco el cual fue transportado a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en sacos para su preparación y análisis químico. (Farfán 2008:18)

**9.8.2 Preparación del material vegetal:** Haciendo uso de un horno de convección, se secó el material a una temperatura de 40 °C en bandejas plásticas. Este material consistió en las hojas separadas del resto de órganos de *P. dulcis*. A continuación se trituraron las hojas haciendo uso de un procesador de alimentos. (Farfán 2008:18)

**9.8.3 Extracción de aceites esenciales con Likens-Nickerson:** Se tomaron 40 g de material vegetal seco, los cuales son humedecidos y colocados en el balón de dos bocas, mientras que 50 mL de pentano son colocados en el balón de solvente extractor. El sistema se calentó, para que circulen y se mezclen los vapores de pentano y agua. Se dio inicio al paso de vapor por la muestra, y se completó la extracción cuando el agua condensada en el balón de muestra ocupó un 50% del volumen del balón. El aceite extraído por este método fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se calculó el porcentaje de rendimiento partiendo de la masa de aceite obtenida y la masa de material vegetal utilizada para la extracción. (Jayes *et al.* 2009:8-9)

**9.8.4 Análisis cromatográfico:** Se realizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, según condiciones propuestas por Adams (2001), inyectando 0.5 µL de aceite esencial diluido en metanol en el cromatógrafo. Los componentes fueron identificados por su espectro de masas e índices de retención publicados por Adams y la biblioteca electrónica de Wiley.

**9.8.5 Cuantificación de fenoles totales:** Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo con las metodologías de Waterhouse (2001) o Singleton (1999). Se extrajeron 200 mg de muestra por 2 h con 10 mL de metanol al 80% conteniendo 1% de ácido clorhídrico, a temperatura ambiente en un agitador mecánico. Se centrifugó la muestra a 1000 rpm por 15 min y decantó el sobrenadante en balones aforados de 25 mL. Se aforó el balón haciendo uso del metanol al 80% con 1% de ácido clorhídrico. Se adicionan las sustancias en el siguiente orden:

- 20  $\mu$ l Muestra
- 4.58 ml agua
- 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu
- Se esperó entre  $\frac{1}{2}$  y 8 min.
- 600  $\mu$ L solución de carbonato de sodio
- Dejó en baño maría a 40 °C por 30 min.

Finalmente se lee en un espectrofotómetro *uv-vis* a 765 nm. Se utiliza como estándar ácido gálico en concentraciones entre 0 y 500 ppm. Los estándares fueron adicionados de la siguiente manera:

- 50  $\mu$ l Muestra
- 4.55 ml agua
- 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu
- Se esperó entre  $\frac{1}{2}$  y 8 min.
- 600  $\mu$ L solución de carbonato de sodio
- Dejó en baño maría a 40 °C por 30 min.

## 10. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

**Tabla 4**  
**Actividades junio-octubre 2009**

<b>Actividad</b>	<b>Jun.</b>	<b>Jul.</b>	<b>Ago.</b>	<b>Sept.</b>	<b>Oct.</b>
Revisión bibliográfica					
Elaboración de anteproyecto de investigación					
Revisión de anteproyecto					
Elaboración de protocolo					
Revisión de protocolo					
Colecta de <i>P. dulcis</i>					
Análisis Químicos					
Elaboración de informe final					
Revisión de informe final					
Examen publico					

## 11. PRESUPUESTO

**Tabla 5**  
**Presupuesto de los materiales a utilizar**

Material	Valor	Procedencia
Combustible	Q. 3,200.00	Dirección General de Investigación USAC
Viáticos (2 días x 8 muestreos)	Q. 3,200.00	Dirección General de Investigación USAC
Sacos	Q. 50.00	Tesista
Tijeras para colectar	Q. 200.00	Tesista
n-Pentano (1 L)	Q. 1,400.00	Unidad de Análisis Instrumental –UAI-
Metanol (1 L)	Q. 300.00	Unidad de Análisis Instrumental –UAI-
Ácido Clorhídrico (0.25 L)	Q. 250.00	Unidad de Análisis Instrumental –UAI-
Carbonato de Sodio (500 g)	Q. 225.00	Laboratorio de Investigación del Departamento de Análisis Inorgánico
Reactivo de Folin-Ciocalteu (1 L)	Q. 850.00	Laboratorio de Investigación del Departamento de Análisis Inorgánico
Agua Destilada	Q. 50.00	Laboratorio de Investigación del Departamento de Análisis Inorgánico
Utilización del equipo y cristalería de la Unidad de Análisis Instrumental	Q. 4,000.00	Unidad de Análisis Instrumental –UAI-
Utilización del equipo y cristalería del Laboratorio de Investigación de Análisis Inorgánico	Q. 7,000.00	Laboratorio de Investigación del Departamento de Análisis Inorgánico
Electricidad	Q. 500.00	Unidad de Análisis Instrumental –UAI-, Laboratorio de Investigación del Departamento de Análisis Inorgánico
Agua Corriente	Q. 200.00	Unidad de Análisis Instrumental –UAI-, Laboratorio de Investigación del Departamento de Análisis Inorgánico
Helio para CG	Q. 5,000.00	Departamento de Toxicología
<b>Total</b>	<b>Q. 26,325.00</b>	

## 12. RESULTADOS

### 12.1 Lugar de origen e información general del material vegetal

**Tabla 6**

**Localización de las tres poblaciones de *P. dulcis* estudiadas**

<b>Rango (msnm)</b>	<b>Población</b>	<b>Municipio</b>	<b>Departamento</b>	<b>Posicionamiento Global</b>
0-600	Los Platanares	Guasacapán	Santa Rosa	N 14° 04.246' W 90° 26.277'
601-1200	El Chico	Usumatlán	Zacapa	N 15° 01.020' W 89° 50.468'
1201-1800	CEDA (Centro Experimental y Docente de Agronomía)	Guatemala	Guatemala	N14° 34.811' W 90° 33.220'

**Tabla 7**

**Hábitat de las poblaciones y fecha de colecta**

<b>Población</b>	<b>Altitud (msnm)</b>	<b>Hábitat</b>	<b>Fecha</b>
Los Platanares	262	Bosque muy húmedo subtropical cálido	23.09.09
El Chico	929	Bosque nuboso	16.08.09
CEDA	1465	Cultivo	30.08.09

**Tabla 8**

**Cantidad y humedad del material vegetal\***

<b>Población</b>	<b>Masa Material Vegetal (g)</b>	<b>Humedad (%)</b>
Los Platanares	47	12.84
El Chico	290	13.35
CEDA	328	12.03

\*Después de haber sido tratado el material vegetal en un horno de convección.

### 12.2 Extracción de Aceites Esenciales

**Tabla 9**

**Extracción de Aceites Esenciales de *P. dulcis* de Los Platanares**

<b>Muestra</b>	<b>Masa (g)</b>	<b>Tara (g)</b>	<b>Tara + AE* (g)</b>	<b>AE (g)</b>	<b>% Rendimiento</b>
<b>U</b>	36.919	2.5814	2.6494	0.0680	<b>0.18</b>

\*AE: Aceite Esencial. Software: Excel 2007.

**Tabla 10****Extracción de Aceites Esenciales de *P. dulcis* de El Chico**

Muestra	Masa (g)	Tara (g)	Tara + AE (g)	AE (g)	% Rendimiento
A	39.914	2.1963	2.3175	0.1212	0.30
B	40.054	2.642	2.7284	0.0864	0.22
C	40.006	2.6155	2.6754	0.0599	0.15
D	40.086	2.6194	2.7111	0.0917	0.23
<b>PROMEDIO</b>	40.015	2.5183	2.6081	0.0898	<b>0.22</b>

Software: Excel 2007.

**Tabla 11****Extracción de Aceites Esenciales de *P. dulcis* de CEDA**

Muestra	Masa (g)	Tara (g)	Tara + AE (g)	AE (g)	% Rendimiento
A	39.996	2.2085	2.3671	0.1586	0.40
B	40.334	2.2311	2.3811	0.1500	0.37
C	40.059	2.5714	2.6808	0.1094	0.27
D	40.010	2.5947	2.7352	0.1405	0.35
<b>PROMEDIO</b>	40.100	2.401425	2.54105	0.1396	<b>0.35</b>

Software: Excel 2007.

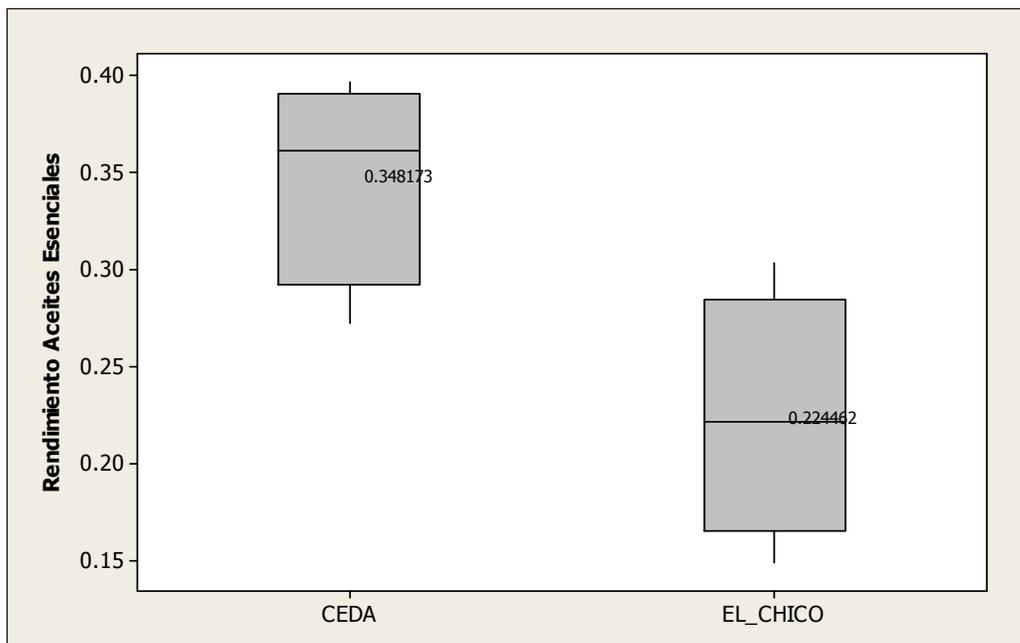
**Tabla 12****Límite inferior y superior****Porcentaje de rendimiento de aceite esencial de ambas poblaciones**

Población	Media	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95%	
			Límite Inferior	Límite Superior
El Chico	0.22%	0.063%	0.12%	0.32%
CEDA	0.35%	0.053%	0.26%	0.43%

Software: Excel 2007.

### Gráfica 1

#### Homocedasticidad de las muestras



De acuerdo a las cajas de Tuckey, fue posible realizar análisis de varianzas con los datos obtenidos. Software: Minitab 14.0

**Tabla 13**

#### Análisis de varianza

#### Porcentaje de rendimiento de aceite esencial proveniente de El Chico y CEDA

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	p
Inter-grupos	.0306	1	.0307	8.959	<b>.0242</b>
Intra-grupos	.0205	6	.00342		
Total	.0511	7			

Debido a que p es de 0.0242 existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de rendimiento de aceite esencial de las dos poblaciones. Software: SPSS 15.0

**Tabla 14****Resumen aceites esenciales**

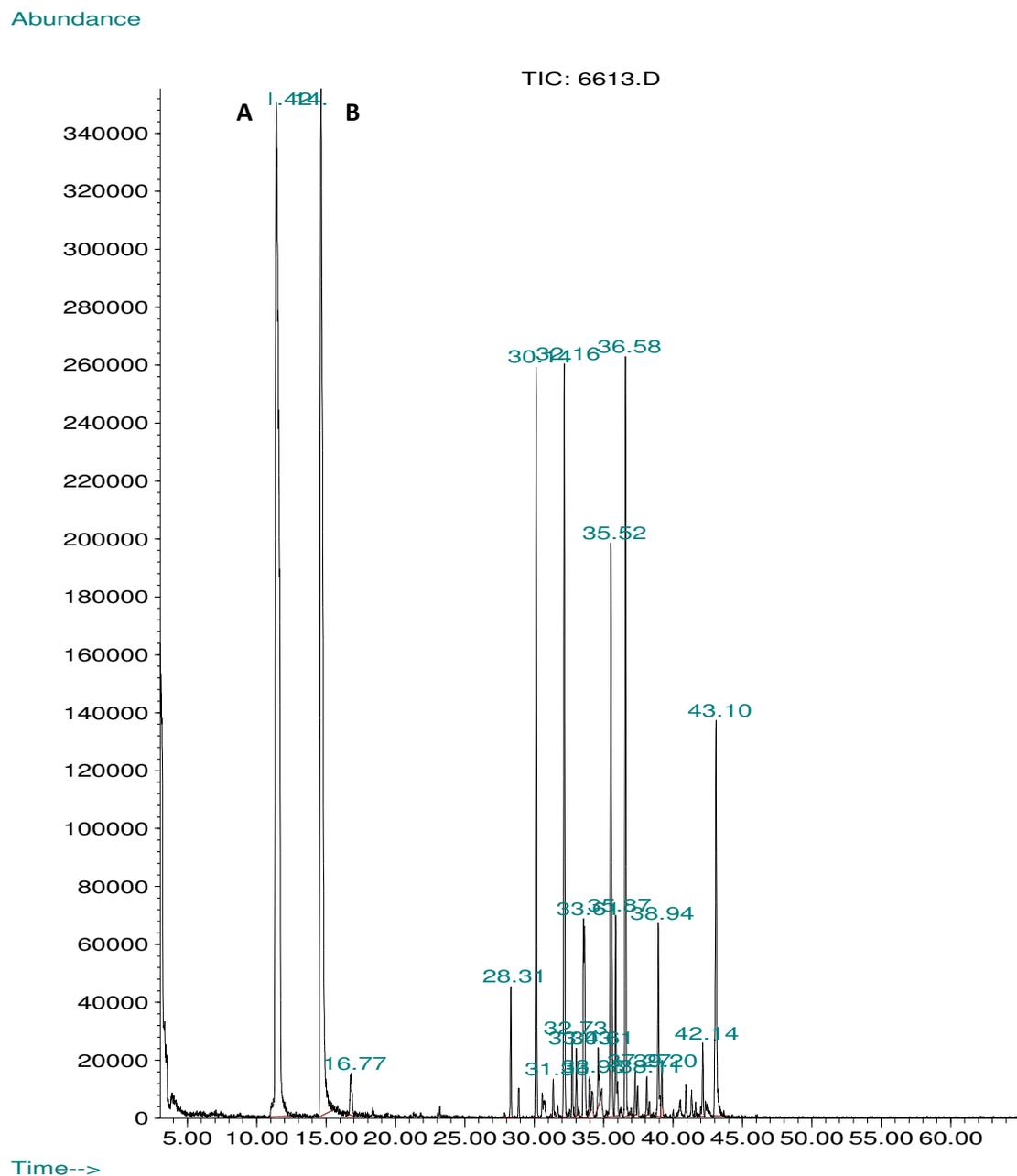
<b>Población</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>Límite Superior</b>	<b>p</b>
CEDA	4	0.35	0.053	0.26%	0.43%	
El Chico	4	0.22	0.063	0.12%	0.32%	0.0242
Los Platanares	1	0.18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

### 12.3 Análisis de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Gráfica 2

#### Perfil cromatográfico

Aceite esencial obtenido de *P. dulcis* de Los Platanares



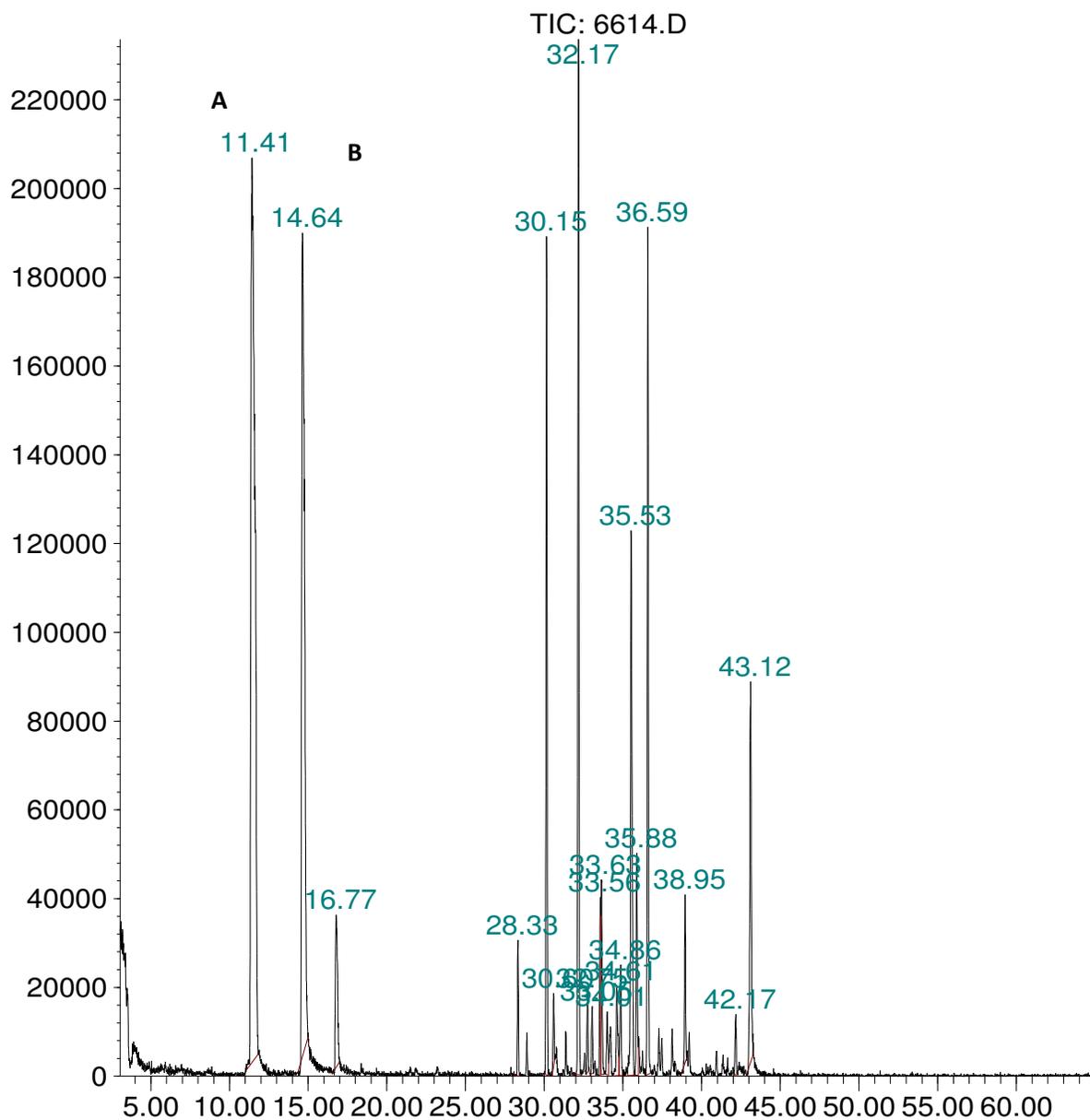
Espectro obtenido del análisis cromatográfico haciendo uso de las condiciones establecidas por Adams (2001). Los dos primeros picos corresponden a 6-metil-5-hepten-2-ona (A) y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (B), subproductos de la degradación térmica de hernandulcina.

**Tabla 15**  
**Composición química**  
**Aceite esencial de *P. dulcis* de Los Platanares**

<b>No.</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Área (%)</b>	<b>Compuesto</b>
<b>1</b>	<b>11.43</b>	<b>32.62</b>	<b>6-metil-5-hepten-2-ona</b>
<b>2</b>	<b>14.64</b>	<b>23.29</b>	<b>3-metil-2-ciclohexen-1-ona</b>
<b>3</b>	30.14	6.38	$\alpha$ -Cubebeno
<b>4</b>	32.16	6.57	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno
<b>5</b>	32.73	0.63	Zingibereno
<b>6</b>	33.62	3.23	$\beta$ -Sesquifelandreno
<b>7</b>	34.60	0.56	$\gamma$ -Cadineno
<b>8</b>	35.52	6.43	Biciclogermacreno
<b>9</b>	35.87	1.65	$\beta$ -Bisaboleno
<b>10</b>	36.57	6.67	$\delta$ -Cadineno
<b>11</b>	37.28	0.30	<i>trans</i> -alfa-Bisaboleno
	Fracción sesquiterpénica	32.42	
	Subproductos de descomposición de hernandulcina (sesquiterpeno)	55.91	
	Fracción y subproductos sesquiterpénicos	88.33	
	Compuestos químicos no elucidados	11.67	
	<b>Total</b>	<b>100.00</b>	

**Gráfica 3**  
**Perfil cromatográfico**  
**Aceite esencial obtenido de *P. dulcis* de El Chico**

Abundance



Time-->

Espectro obtenido del análisis cromatográfico haciendo uso de las condiciones establecidas por Adams (2001). Los dos primeros picos corresponden a 6-metil-5-hepten-2-ona (A) y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (B), subproductos de la degradación térmica de hernandulcina.

**Tabla 16**  
**Composición química**  
**Aceite esencial de *P. dulcis* de El Chico**

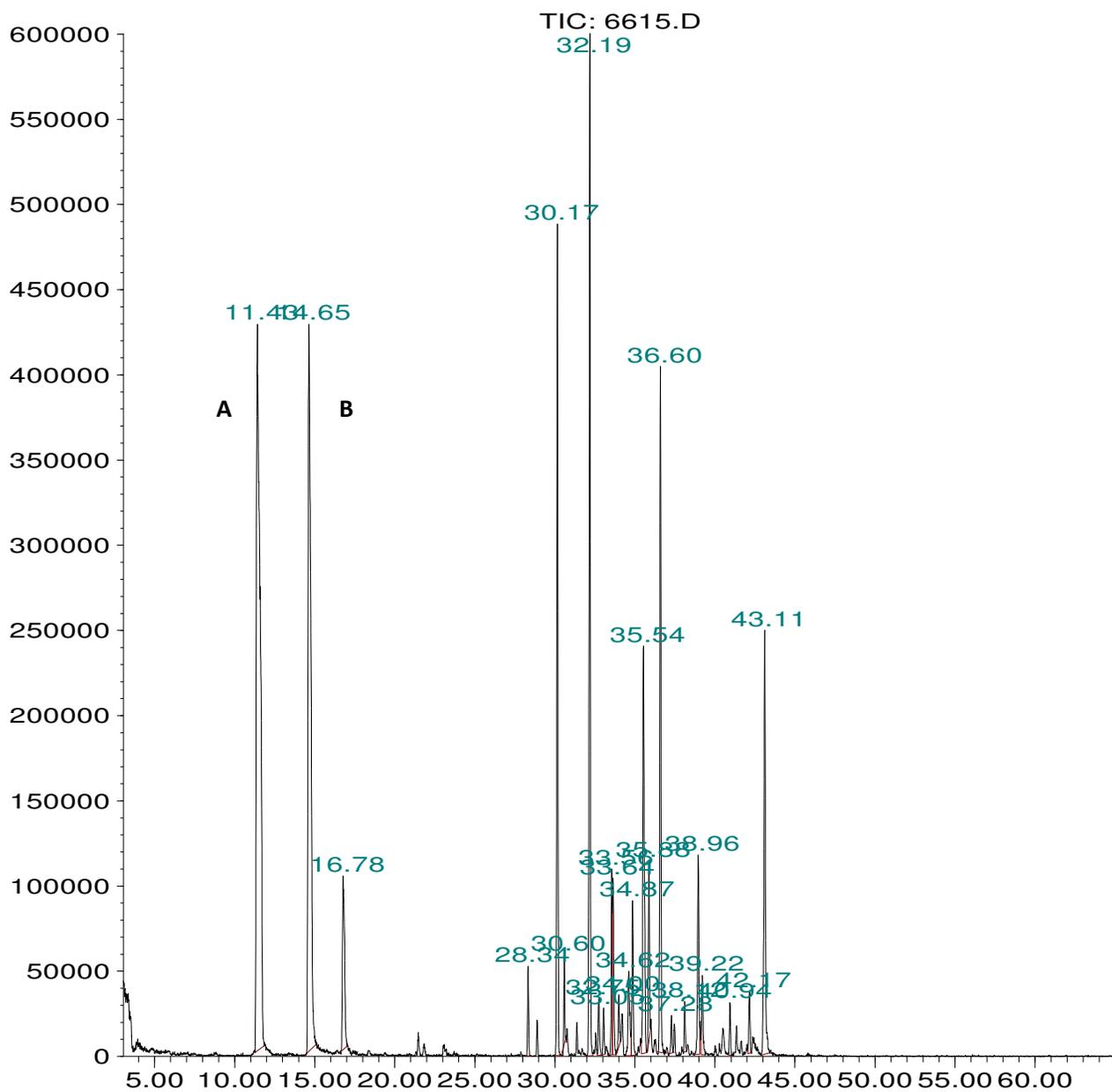
<b>No.</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Área (%)</b>	<b>Compuesto</b>
<b>1</b>	<b>11.41</b>	<b>29.33</b>	<b>6-metil-5-hepten-2-ona</b>
<b>2</b>	<b>14.64</b>	<b>19.30</b>	<b>3-metil-2-ciclohexen-1-ona</b>
<b>3</b>	30.15	7.32	$\alpha$ -Cubebeno
<b>4</b>	30.59	0.62	Burboneno
<b>5</b>	32.17	9.65	trans- $\beta$ -Cariofileno
<b>6</b>	33.56	1.60	trans- $\beta$ -Farneseno
<b>7</b>	35.52	6.78	Biciclogermacreno
<b>8</b>	36.58	7.48	$\delta$ -Cadineno
<b>9</b>	38.95	1.38	Espatulanol
	Fracción sesquiterpénica	34.80	
	Subproductos de descomposición de hernandulcina (sesquiterpeno)	48.66	
	Fracción y subproductos sesquiterpénicos	83.46	
	Compuestos químicos no elucidados	16.54	
	<b>Total</b>	<b>100.00</b>	

## Gráfica 4

### Perfil cromatográfico

Aceite esencial obtenido de *P. dulcis* del CEDA

Abundance



Time-->

Espectro obtenido del análisis cromatográfico haciendo uso de las condiciones establecidas por Adams (2001). Los dos primeros picos corresponden a 6-metil-5-hepten-2-ona (A) y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (B), subproductos de la degradación térmica de hernandulcina.

**Tabla 17**  
**Composición química**  
**Aceite esencial de *P. dulcis* del CEDA**

No.	Tiempo de retención (min)	Área (%)	Compuesto
<b>1</b>	<b>11.42</b>	<b>24.34</b>	<b>6-metil-5-hepten-2-ona</b>
<b>2</b>	<b>14.64</b>	<b>18.20</b>	<b>3-metil-2-ciclohexen-1-ona</b>
<b>3</b>	16.78	3.25	Linalool*
<b>4</b>	30.17	8.03	$\alpha$ -Copaeno
<b>5</b>	30.60	0.73	Burboneno
<b>6</b>	32.19	10.40	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno
<b>7</b>	33.57	1.71	<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno
<b>8</b>	33.99	0.76	Aromadendreno
<b>9</b>	34.87	1.76	Germacreno-D
<b>10</b>	35.54	5.57	Biciclogermacreno
<b>11</b>	35.89	1.65	$\beta$ -Bisaboleno
<b>12</b>	36.60	7.11	$\delta$ -Cadineno
<b>13</b>	37.28	0.37	$\alpha$ -Humuleno
	Fracción sesquiterpénica	38.09	
	Subproductos de descomposición de hernandulcina (sesquiterpeno)	42.54	
	Fracción y subproductos sesquiterpénicos	80.63	
	Compuestos no elucidados	19.37	
	<b>Total</b>	<b>100.00</b>	

\*Único compuesto no sesquiterpénico identificado en cualquiera de las tres cromatografías realizadas. Linalool es un monoterpeno.

**Tabla 18****Resumen composición química de aceites esenciales**

Todos los datos como % de Área				Principales componentes			
Población	FS	SH	FS+SH	A	B	C	D
Los Platanares	32.42	55.91	88.33	32.62	23.29	6.57	6.67
El Chico	34.80	48.66	83.46	29.33	19.30	9.65	7.48
CEDA	38.09	42.54	80.63	24.34	18.20	10.40	7.11

FS: Fracción sesquiterpénica. SH: Subproductos de la descomposición de hernandulcina (sesquiterpeno). A: 6-metil-5-hepten-2-ona B: 3-metil-2-ciclohexen-1-ona C: trans- $\beta$ -Cariofileno D:  $\delta$ -Cadineno.

**12.4 Cuantificación de Fenoles Totales****Tabla 19****Fenoles Totales de *P. dulcis* de Los Platanares**

Muestra	Masa (mg)	Concentración (mg A.G./g)*
A	205.12	42.15
B	200.15	37.43
C	201.21	45.10
D	203.76	43.96
<b>PROMEDIO</b>	202.56	<b>42.17</b>

\*Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal.  
Software: Excel 2007.

**Tabla 20****Fenoles Totales de *P. dulcis* de El Chico**

Muestra	Masa (mg)	Concentración (mg A.G./g)
A	202.86	34.09
B	206.18	27.93
C	206.58	31.54
D	208.59	33.70
<b>PROMEDIO</b>	206.0525	<b>31.81</b>

Software: Excel 2007.

**Tabla 21****Fenoles Totales de *P. dulcis* proveniente del CEDA**

<b>Muestra</b>	<b>Masa (mg)</b>	<b>Concentración (mg A.G./g)</b>
A	203.18	27.57
B	206.26	29.52
C	206.02	28.50
D	203.00	26.74
<b>PROMEDIO</b>	204.62	<b>28.08</b>

Software: Excel 2007.

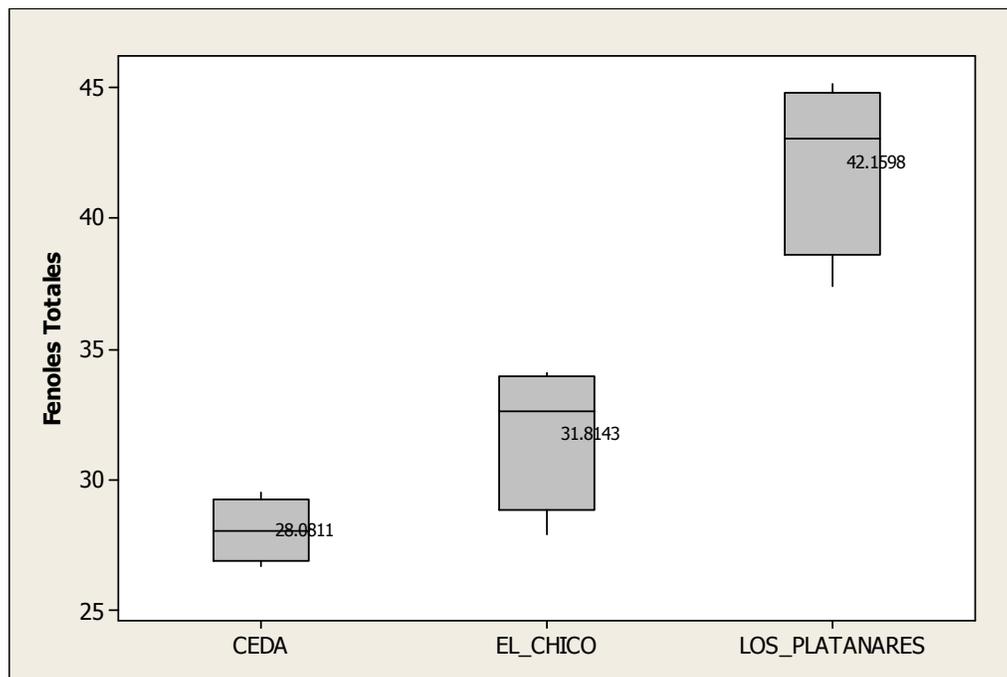
**Tabla 22****Límite inferior y superior****Fenoles totales de las tres poblaciones****mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal seco**

<b>Población</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Intervalo de Confianza 95 %</b>	
			<b>Límite Inferior</b>	<b>Límite Superior</b>
Los Platanares	42.16	3.38	36.78	47.54
El Chico	31.81	2.82	27.33	36.30
CEDA	28.08	1.20	26.18	29.98

Software: Excel 2007.

## Gráfica 5

### Homocedasticidad de las muestras



De acuerdo a las cajas de Tuckey, fue posible realizar análisis de varianzas con los datos obtenidos. Software: Minitab 14.0

**Tabla 23**

### Análisis de varianza

#### Concentración de fenoles totales de las tres poblaciones

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	p
Inter-grupos	425.566	2	212.783	30.675	<b>0.000</b>
Intra-grupos	62.431	9	6.937		
Total	487.996	11			

Debido a que p es de 0.000 existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de fenoles totales de las tres poblaciones. Software: SPSS 15.0

**Tabla 14****Resumen fenoles totales**

<b>Población</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>Límite Superior</b>	<b>p*</b>
Los Platanares	4	42.16	3.38	36.78	47.54	
El Chico	4	31.81	2.82	27.33	36.30	0.001
CEDA	4	28.08	1.20	26.18	29.98	0.000

\*Valor p medido con respecto de la población de Los Platanares. Al realizar comparaciones múltiples de medias (HSD de Tukey) se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre El Chico y el CEDA. Sí existen diferencias estadísticamente significativas entre Los Platanares y las otras dos poblaciones.

## 13. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 13.1 Lugar de origen e información general del material vegetal

Uno de los objetivos de la investigación consistió en realizar comparaciones químicas entre 3 diferentes poblaciones ubicadas a diferentes altitudes sobre el nivel del mar. Con tal propósito y como se puede observar en las Tablas 6 y 7 se colectó material vegetal en Los Platanares, municipio de Guasacapán, Santa Rosa (262 msnm); El Chico, municipio de Usulután, Zacapa (929 msnm) y el Centro Experimental y Docente de Agronomía –CEDA-, Facultad de Agronomía, Universidad San Carlos, Ciudad de Guatemala (1465 msnm). Además de la diferencia de altitud, también se observaron diferencias en los hábitats de estos 3 lugares. En el primer caso se trató de un bosque muy húmedo subtropical cálido, en el segundo de un bosque nuboso y en el tercero de un cultivo en condiciones templadas.

La principal dificultad consistió en la obtención de suficiente material vegetal proveniente de una población a una altitud entre los 0 y 600 msnm. A pesar de encontrarse reportada la presencia de *P. dulcis* en lugares como Santa Cruz Mulúa, Retalhuleu a una altitud de 389 msnm (Fischer, 1997:66-84) además de Siquinalá y Masagua, Escuintla también a altitudes menores a los 600 msnm (Ing. Vicente Martínez, comunicación personal); no fue posible encontrarla en dichos lugares. El único lugar donde fue posible colectar *P. dulcis* a una altitud menor a los 600 msnm fue en Los Platanares; aunque en pequeñas cantidades por lo que no fue posible realizar todas las repeticiones deseadas para cada uno de los análisis químicos. De acuerdo a pobladores de los lugares visitados, su poca abundancia se debe principalmente a su sensibilidad a los herbicidas utilizados en las plantaciones cercanas y a la limpieza o “chapeo” que se hace a las orillas de los caminos donde normalmente se encuentra.

### 13.2 Extracción de Aceites Esenciales

Se realizó únicamente una extracción de aceite esencial con el material colectado en Los Platanares, Santa Rosa debido al poco material vegetal disponible. Los resultados obtenidos indican un bajo rendimiento (0.18%) como se observa en la Tabla 9. Sin embargo, por tratarse de sólo una extracción, no se puede incluir dentro de los análisis estadísticos.

El material colectado en El Chico, Zacapa y CEDA, Ciudad de Guatemala fue lo suficiente abundante para la realización de cuatro extracciones. En todos los casos, incluyendo con la muestra de Los Platanares se utilizó la técnica de arrastre de vapor con el aparato Likens-Nickerson. Los resultados obtenidos se observan en las Tablas 10 y 11 respectivamente. En el caso de El Chico se obtiene un valor promedio de 0.22%; mientras que CEDA presenta un mayor promedio, el cual es de 0.35%. Se determinaron sus desviaciones estándar además de los límites inferiores y superiores con un intervalo de confianza del 95% para ambas poblaciones (Tabla 12). Al realizar las pruebas de varianza y de homocedasticidad para estos dos grupos de datos se determinó que los valores obtenidos son adecuados para la realización de un análisis de varianza de una vía.

El análisis de varianza (Tabla 13) se obtuvo un  $p$  de 0.024, lo cual indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones. De tal manera se llega a determinar que existe una mayor cantidad de aceite esencial en *P. dulcis* proveniente de CEDA que de la proveniente de El Chico.

Al comparar los porcentajes de rendimiento con las diferentes altitudes a la que fueron colectadas las muestras (Tabla 14), se observa una tendencia en la cual al aumentar la altitud, aumenta el porcentaje de rendimiento (0.18, 0.22 y 0.35% respectivamente). Sin embargo, debido a que sólo se realizó una extracción con el material de Los Platanares, no es posible probar dicha correlación de una manera que sea estadísticamente significativa.

Por último, al comparar los porcentajes de rendimiento de CEDA con el reportado para una muestra por Pérez (2008) para la misma población, se encuentra que éstos son

aproximadamente dos veces menores. Esta diferencia se debe a que la técnica utilizada para la extracción de aceites esenciales fue la de arrastre de vapor con aparato Likens-Nickerson y no la de hidrodestilación con aparato tipo Clevenger. Debido a ello, todavía es necesario determinar las condiciones ideales para aumentar el porcentaje de rendimiento al utilizar el aparato Likens-Nickerson.

### **13.3 Análisis de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Los resultados de los análisis realizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para los aceites esenciales de las poblaciones de Los Platanares, El Chico y CEDA se presentan en las Gráficas 2, 3 y 4; y Tablas 15, 16 y 17 respectivamente. Debido a la similitud de los perfiles cromatográficos obtenidos para las tres poblaciones es más conveniente discutir los resultados en conjunto (Tabla 18).

Al igual que en las investigaciones de Pérez (2008) y Souto-Bachiller (1997), se encontró una alta abundancia de sesquiterpenos en los tres aceites esenciales analizados; 32.42% para Los Platanares, 34.80% para El Chico y 38.09% para el CEDA. Los sesquiterpenos más abundantes fueron en los tres casos trans- $\beta$ -Cariofileno y  $\delta$ -Cadineno. También se encontró una alta presencia de 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, los cuales son los subproductos de la descomposición térmica de la hernandulcina (sesquiterpeno). El contenido de estos dos compuestos químicos fue de 55.91% para Los Platanares, 48.66% para El Chico y 42.54% para el CEDA. Sin embargo, la hernandulcina misma no fue encontrada entre los compuestos elucidados, lo cual indica que las condiciones de extracción por arrastre de vapor o de análisis cromatográfico provocan su completa o casi completa descomposición.

En las tres muestras analizadas se observa que la señal de 6-metil-5-hepten-2-ona es más intensa que la de 3-metil-2-ciclohexen-1-ona. Esto se puede deber a una mayor sensibilidad del detector al primer compuesto. O bien, puede ser a una diferencia entre las concentraciones de 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona. Tal diferencia de

concentraciones indicaría que estos compuestos no provienen exclusivamente de la descomposición térmica de la hernandulcina, sino que se encuentran de manera natural dentro de las muestras.

Al comparar las señales relativas de 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona en cada una de las muestras, se observa una proporción de 1:0.71, 1:0.66 y 1:0.75 para las poblaciones de Los Platanares, El Chico y CEDA respectivamente. Al ser todas las proporciones diferentes, se corrobora que estos compuestos no se encuentran presentes en las muestras exclusivamente como subproductos de la descomposición térmica de la hernandulcina.

Al tomar en cuenta la fracción sesquiterpénica obtenida junto con 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (subproductos de la descomposición térmica de la hernandulcina) en un mismo grupo se observa que el aceite esencial de *P. dulcis* está compuesto casi exclusivamente por sesquiterpenos; 88.33% para Los Platanares, 83.46% para El Chico y 80.63% para el CEDA. Estos valores pueden ser mayores si uno toma en cuenta que los compuestos químicos no elucidados representan el 11.67, 16.54 y 19.37% de la composición total de los aceites esenciales, respectivamente (Tablas 15, 16 y 17). Aunque también pueden ser menores, ya que no toda la 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona presentes provienen de la descomposición térmica de la hernandulcina y que la adición de las señales obtenidas de estos dos compuestos no es necesariamente proporcional a la de la hernandulcina.

El único compuesto químico no sesquiterpénico encontrado fue el Linalool (monoterpeno), el cual fue detectado en la muestra de *P. dulcis* del CEDA; con una abundancia del 3.25% (Tabla 17). Los sesquiterpenos detectados únicamente en el aceite esencial del CEDA son Aromadendreno (0.76%), Germacreno-D (1.76%),  $\beta$ -Bisaboleno (1.65%) y  $\alpha$ -Humuleno (0.37%). Se detectó exclusivamente en el aceite esencial de El Chico Espatulenol (1.38%, Tabla 16). Por aparte, Zingibereno (0.63%),  $\beta$ -Sesquifelandreno (3.23%) y  $\gamma$ -Cadineno (0.56%) fueron detectados en el aceite esencial de Los Platanares pero no en las otras dos poblaciones (Tabla 15). Estas diferencias encontradas son muy pequeñas y aunque la

naturaleza del método es semi-cuantitativa, se considera que los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de las tres poblaciones son muy similares por lo que no se encuentran diferencias químicas características entre ellos.

#### **13.4 Cuantificación de fenoles totales**

A diferencia de la extracción de aceites esenciales, la cuantificación de fenoles totales requiere de poco material vegetal; aproximadamente 200 mg por cada repetición. Debido a ello, fue posible realizar cuatro repeticiones para cada una de las poblaciones estudiadas. Donde se observó una concentración de 42.17 mg equivalentes de ácido gálico por g en Los Platanares, 31.81 en El Chico y 28.08 en CEDA (Tabla 21).

Se determinaron sus desviaciones estándar además de los límites inferiores y superiores con un intervalo de confianza del 95% para las tres poblaciones (Tabla 22). Al realizar los análisis de homogeneidad de varianzas y homocedasticidad se determinó que los datos podían ser analizados utilizando análisis de varianza de una vía. Al realizar dicho análisis (Tablas 23) se observó que existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de fenoles entre las 3 poblaciones con un p de 0.000. Este resultado por sí solo sugiere una relación entre la altitud a la que se encuentra la población y la cantidad de fenoles totales de la misma. Sin embargo, existen muchos otros factores ambientales y biológicos que también podrían explicar dicha diferencia.

Al realizar una prueba HSD de Tuckey se observó que las diferencias estadísticamente significativas se deben en realidad a las diferencias entre los datos obtenidos de Los Platanares y los datos de El Chico y el CEDA (p 0.001 y 0.000 respectivamente). Sin embargo, al comparar los datos de El Chico con los de CEDA se obtiene un p de 0.167, lo cual no es estadísticamente significativo. Por lo tanto, no es posible determinar la relación entre la altitud de la población y su contenido de fenoles; únicamente que la población de Los Platanares tiene un mayor contenido de fenoles que las otras dos poblaciones.

Los datos obtenidos deben ser utilizados con precaución, ya que la cuantificación de fenoles totales con esta técnica tiene la desventaja que los compuestos reductores actúan como interferentes. Estos compuestos aumentan la señal obtenida de la muestra por lo que se puede dar una sobreestimación de los datos.

Al comparar los valores obtenidos con esta misma técnica con el orégano (*Lippia graveolens* HBK) una especie relacionada, se observa que ninguna de las tres poblaciones presenta concentraciones iguales o mayores a las de esta especie. Los valores obtenidos para el orégano fueron de 45 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal (Licda. Bessie Oliva, comunicación personal).

## 14. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas que incluyan a las tres poblaciones de *P. dulcis* estudiadas en relación al porcentaje de rendimiento de aceite esencial y fenoles totales; tampoco se encontraron diferencias químicas características en los perfiles cromatográficos.

Los porcentajes de rendimiento de aceite esencial encontrados al utilizar extracción por arrastre de vapor (Likens-Nickerson) son de 0.18, 0.22 y 0.35 para las poblaciones de Los Platanares, El Chico y el CEDA respectivamente.

Los aceites esenciales obtenidos de las tres poblaciones presentaban un alto contenido de sesquiterpenos además de 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, los cuales son subproductos de descomposición de hernandulcina, la cual no se detectó.

Existen diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de El Chico y el CEDA en relación de su porcentaje de rendimiento de aceite esencial con una significancia de 0.0242.

Las cantidades de fenoles totales expresados como mg de ácido gálico por g de material vegetal son de 42.17, 31.81 y 28.08 para las poblaciones de Los Platanares, El Chico y el CEDA respectivamente

Existen diferencias estadísticamente significativas entre la población de Los Platanares y las poblaciones de El Chico y el CEDA en relación al contenido de fenoles totales con una significancia de 0.001 y 0.000 respectivamente.

## 15. RECOMENDACIONES

Ubicar una población de *P. dulcis* a una altitud entre 0 y 600 msnm que sea más grande a la encontrada en Los Platanares para así poder colectar una mayor cantidad de material y realizar más extracciones de aceite esencial y análisis químicos.

Caracterizar los aceites esenciales de *P. dulcis* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas haciendo uso un mayor número de bibliotecas.

Cuantificar los principales componentes químicos del aceite esencial de *P. dulcis* haciendo uso de estándares y cromatografía de gases.

Analizar la composición química de los fenoles de *P. dulcis* haciendo uso de estándares y HPLC.

## 16. REFERENCIAS

Adams, R; *et al.* 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL. 456 p.

Aragão, A. 1981. Oleos Essenciais de Plantas do Nordeste. Edicoes UFC. Fortaleza, BR.

Bandoni, A; *et al.* 2003. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Buenos Aires, AR CYTED. 417 p.

Bruneton, J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica plantas medicinales. Segunda Edición. Acerbia S.A. ES. 1098 p.

Cáceres *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. Journal of Ethnopharmacology 31:193-208.

Cáceres *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. Journal of Ethnopharmacology 38:31-38.

Compadre, C; *et al.* 1985. Hernandulcin: An intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. Science. 227: 417-419.

Enda-caribe *et al.* 1996. Borrador Tramil 8: *Lippia dulcis* Trev. 4 p.

Farfán, C; 2008. Estudio del Aceite Esencial y Metabolitos Secundarios de Diferentes Poblaciones de *Lippia chiapasensis* Loes. (Verbenaceae) Fase II. Tesis Licenciatura. Guatemala, GT: Universidad San Carlos de Guatemala. 75 p.

Fischer, U. 1997. Untersuchungen zur Domestikation von Guatemaltekischen Arzneipflanzen. Tesis Licenciatura. Viena, AT: Österreichischen Akademie der Wissenschaften. 235 p.

Gibson, D *et al.* 1970. Verbenaceae. Flora de Guatemala. US. Fieldana Botany. 24(9):209-211.

Görnemann, T; *et al.* 2008. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. Journal of Ethnopharmacology. 117: 166-169.

Guevara, J; Chumpitaz, J; Valencia, E. 1994. The *in vitro* action of plants of *Vibrio cholera*. Revista de Gastroenterología del Perú. 14:27-31.

ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, GT) 1992. Desarrollo Agrotecnológico de Cinco Especies de Plantas Medicinales Silvestres con Potencial Industrial. sp.

Kaneda, N; *et al.* 1992. (+)-4 $\beta$ -Hydroxyhernandulcin: A new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. Journal of Natural Products. 55(8): 1136-1141.

Kennedy, K. 1992. A systematic study of the genus *Phyla* Lour. (Verbenaceae: Verbenoideae Lantanae). Disertación doctoral. Universidad de Texas. US. 160-170.

Ministerio de Salud de Nicaragua. 1986. Rescate de la Medicina Popular. Managua, NI. 147 p.

Mori, K; *et al.* 1986. Synthesis and absolute configuration of (+)-hernandulcin, a new sesquiterpene with intensely sweet taste. Tetrahedron Letters. 27(8) 981-982.

Morton, J; *et al.* 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. 746-747.

Meléndez, P; Capriles, V. 2006. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*. 13: 272-276.

Núñez, E. 1978. *Plantas medicinales de Puerto Rico y su folklore*. San Juan, PR: Universidad Central de Puerto Rico. 260 p.

Pascual, M; *et al.* 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 76: 201-214.

Pereira, S; *et al.* 2003. Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitosus* Grown on the Islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). *Phytochem. Anal.* 14:228-231

Pérez, J; 2008. *Investigação Química de Óleos Essenciais de Plantas da Guatemala*. Tesis doctoral. Río de Janeiro. Universidade Federal. BR. 281 p.

Pérez, S; *et al.* 2005. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 1-4.

Singleton, V, Orthofer, R, Lamuela-Raventos, R; 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Souto-Bachiller, F; *et al.* 1997. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry*. 44(6): 1077-1086.

Stevens, WD; *et al.* 2001. *Flora de Nicaragua: Angiospermas*. St. Louis, US: Missouri Botanical Garden Press. Tomo III. 2517-2519.

Sun, M. *et al.* 2000 Cytochrome P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationships. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1373-1378.

Waterhouse, A.L. 2001. Determination of Total Phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, I1.1.1-I1.1.8, Wrolstad, R.E., Wiley.

Williams, L. 1981. The useful plants of Central America. *Ceiba.* 24: 332-333.

## ANEXOS

	Página
Imágenes	57
Perfiles cromatográficos	61
Cuantificación de fenoles totales	72
Firmas y avales	81

**Imágenes de colecta y preparación de *Phyla dulcis***

**Imagen I**

***Phyla dulcis***

**El Chico, municipio de Usumatlán, Zacapa**



Fotografía: Christian Farfán.

**Imagen II**

***Phyla dulcis***



*P. dulcis* se encuentra frecuentemente en las orillas de los caminos, en medio del lodo y basura. Fotografía: Christian Farfán.

## Imágenes de extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor (Likens-Nickerson)

**Imagen III**  
**Sistema durante la extracción**



A la derecha de la imagen se observa el balón con agua en ebullición (A). El vapor es transportado al balón con el material vegetal (B) y arrastra el aceite esencial hacia el aparato Likens-Nickerson (C) donde se condensa por el flujo de un refrigerante. El n-pentano proviene del balón en baño maría (D) y también se condensa en el aparato Likens-Nickerson, donde recoge el aceite esencial. Fotografía: Christian Farfán.

## Imágenes de los análisis químicos realizados al material vegetal y aceite esencial

### Imagen IV

#### Aceite esencial obtenido por arrastre de vapor (Likens-Nickerson)



Aceite esencial de *P. dulcis* obtenido por arrastre de vapor. Todos los aceites esenciales tuvieron la misma apariencia y coloración (ámbar). Fotografía: Christian Farfán.

### Imagen V

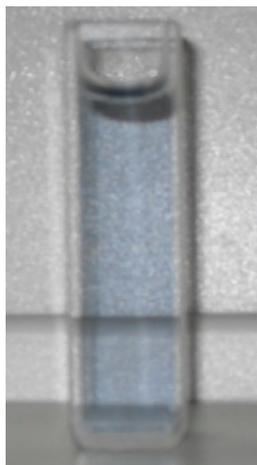
#### Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas



Cromatógrafo HP 5890 Series II, ubicado en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Fotografía: Christian Farfán.

## Imagen VI

### Muestra tratada con reactivo de Folin-Ciocalteu



Previo a la medición de fenoles totales por espectrofotometría uv-vis, se trata la muestra con reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio, produciendo una coloración azul, cuya intensidad se mide a 765 nm. Fotografía: Christian Farfán.

## Imagen VII



Espectrofotómetro uv-vis Thermo Scientific Evolution 300, ubicado en el Departamento de Análisis Inorgánico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Fotografía: Christian Farfán.

## Perfiles cromatográficos

*Phyla dulcis* Los Platanares, municipio de Guasacapán, Santa Rosa.

File: C:\HPCHEM\1\DATA\6613.D

Sample Name: P. dulcis Los platanares 0.18%

*Phyla dulcis* El Chico, municipio de Usumatlán, Zacapa.

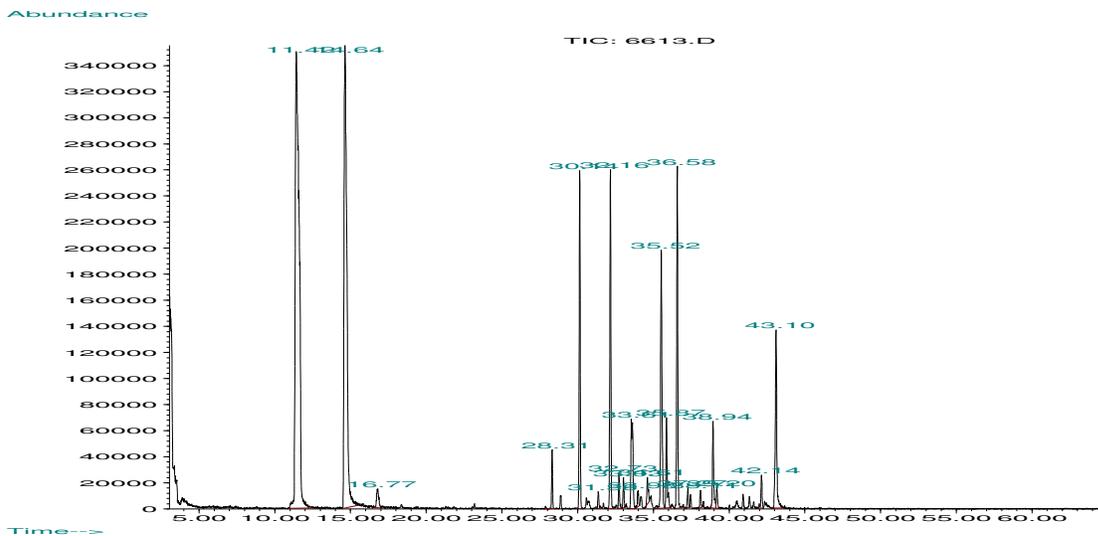
File: C:\HPCHEM\1\DATA\6614.D

Sample Name: P. dulcis El Chico 0.23%

*Phyla dulcis* CEDA, municipio de Guatemala, Guatemala.

File: C:\HPCHEM\1\DATA\6615.D

Sample Name: P. dulcis CEDA 3/0.27%



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\6613.D  
 Operator: MCS/FPM  
 Date Acquired: 21 Oct 09 10:04  
 Method File: ACEITES  
 Sample Name: P. dulcis Los plataneros 0.18%  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	11.43	32.62	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE	18101	000110-93-0	96
			6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE B	18143	000000-00-0	83
			6-Methyl-5-hepten-2-one \$\$ 5-Hepte	17929	000110-93-0	83
2	14.64	23.29	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl- (CAS	9808	001193-18-6	83
			2-methyl-2-cyclohexenone \$\$ 2-Cycl	9886	001121-18-2	78
			2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl- (CAS	9807	001193-18-6	72
3	16.77	0.71	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-,	40004	022564-99-4	53
			.alpha.-terpinolene \$\$ Cyclohexene	25089	000586-62-9	53
			.BETA.-OCIMENE	25390	013877-91-3	43

- 4 28.31 1.09 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimethyl 24958 042123-66-0 81  
 Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane, 25162 000079-92-5 58  
 .alpha.-Terpinene \$\$ 1,3-Cyclohexa 24983 000099-86-5 50
- 5 30.14 6.38 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .alpha.-Cubebene \$\$ 1H-Cyclopenta[ 89539 017699-14-8 98  
 .ALPHA.-CUBEBENE 89788 000000-00-0 98  
 .alpha.-Cubebene \$\$ 1H-Cyclopenta[ 89537 017699-14-8 96
- 6 31.37 0.34 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Bicyclo[3.1.1]heptane, 6-methyl-2- 89453 055123-21-2 64  
 1-Phellandrene \$\$ 1,3-Cyclohexadie 25008 000099-83-2 64  
 1H-3a,7-Methanoazulene, 2,3,4,7,8, 89293 000469-61-4 56
- 7 32.16 6.57 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .BETA.-CARYOPHYLLENE 89693 000087-44-5 99  
 TRANS(.BETA.)-CARYOPHYLLENE 89769 000000-00-0 99  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89251 000087-44-5 99
- 8 32.73 0.63 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Zingiberene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 89152 000495-60-3 91  
 .ALPHA. FARNESENE 89654 000502-61-4 68  
 Farnesene \$\$ 1,3,6,10-Dodecatetrae 89119 000502-61-4 68
- 9 33.04 0.55 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .BETA.-SESQUIPELLANDRENE 89700 020307-83-9 81  
 CIS-CARYOPHYLLENE \$\$ Bicyclo[7.2.0 89239 013877-93-5 72  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89246 000087-44-5 68
- 10 33.62 3.23 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .BETA.-SESQUIPELLANDRENE 89700 020307-83-9 94  
 .beta.-sesquiphellandrene \$\$ 2-MET 89155 020307-83-9 93  
 .beta.-sesquiphellandrene \$\$ 2-MET 89153 020307-83-9 93
- 11 33.98 0.35 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Alloaromadendrene \$\$ 1H-Cycloprop[ 89480 025246-27-9 74  
 (+)-Aromadendrene \$\$ 1H-Cycloprop[ 89472 000489-39-4 68  
 .ALPHA.-MUUROLENE 89663 010208-80-7 52
- 12 34.60 0.56 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .GAMMA.-CADINENE 89644 039029-41-9 93  
 .alpha.-Ylangene \$\$ Tricyclo[4.4.0 89523 014912-44-8 91  
 6,10,11,11-TETRAMETHYL-TRICYCLO[6. 89475 000489-39-4 90
- 13 35.52 6.43 C:\DATABASE\WILEY275.L

bicyclogermacrene \$\$ Bicyclo[8.1.0] 89615 100762-46-7 93  
 BICYCLOGERMACRENE 89653 024703-35-3 70  
 1,5-Heptadiene, 2,5-dimethyl-3-met 24959 074663-83-5 68

14 35.87 2.04 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89164 000495-61-4 93  
 .BETA.-BISABOLENE 89678 000495-61-4 83  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89162 000495-61-4 81

15 36.57 6.67 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .delta.-cadinene (armoise-Maroc) \$ 89581 000483-76-1 95  
 .delta.-cadinene (armoise-Maroc) \$ 89582 000483-76-1 95  
 .delta.-Cadinene \$\$ Naphthalene, 1 89358 000483-76-1 94

16 37.28 0.30 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 TRANS-.ALPHA.-BISABOLENE 89673 017627-44-0 90  
 CIS-.ALPHA.-BISABOLENE 89674 017627-44-0 81  
 CIS-.ALPHA.-BISABOLENE 89636 017627-44-0 76

17 38.11 0.34 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 d-Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien- 108170 000142-50-7 59  
 (E,E)-FARNESYLACETONE \$\$ 5,9,13-Pe 146565 001117-52-8 53  
 d-Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien- 108167 000142-50-7 50

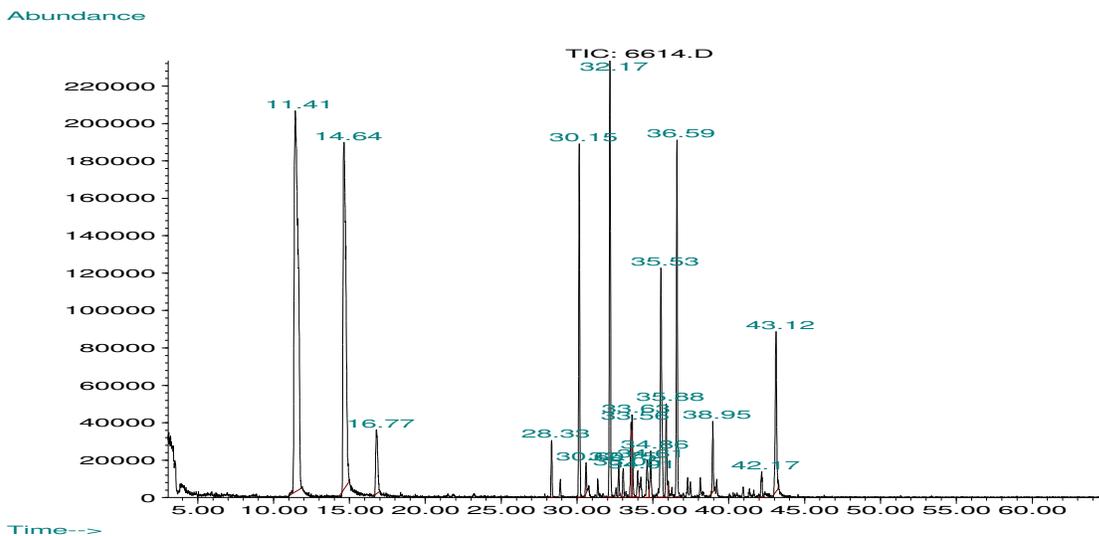
18 38.94 2.03 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Spathulenol \$\$ 1H-Cycloprop[e]azul 105942 006750-60-3 81  
 (-)-Spathulenol (CAS) \$\$ 1H-Cyclop 105982 077171-55-2 72  
 (1R\*,4R\*,5R\*)-1-(2-HYDROXYPROPYL)- 105842 043219-77-8 45

19 39.19 0.45 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 cis-Farnesol \$\$ 2,6,10-Dodecatrien 108182 003790-71-4 27  
 nerolidol Z and E 108427 000000-00-0 25  
 (Z,E)-.alpha.-Farnesene \$\$ 1,3,6,1 89114 026560-14-5 22

20 42.14 0.70 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 4-amino-2-methylpyrimidine 9396 000000-00-0 30  
 Phenol, 2-amino- (CAS) \$\$ o-Aminop 9474 000095-55-6 30  
 Cyclohexanol, 3,3,5-trimethyl- (CA 29939 000116-02-9 27

21 43.09 4.72 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 italicene 89613 000000-00-0 56  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89162 000495-61-4 53  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89163 000495-61-4 49

Fri Oct 23 07:48:07 2009



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\6614.D  
 Operator: MCS/FPM  
 Date Acquired: 21 Oct 09 14:05  
 Method File: ACEITES  
 Sample Name: P, dulcis El Chico 0.23%  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	11.41	29.33	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE	18101	000110-93-0	95
			6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE	18102	000110-93-0	93
			6-Methyl-5-hepten-2-one	17927	000110-93-0	90
2	14.64	19.30	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl- (CAS	9808	001193-18-6	91
			2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl- (CAS	9809	001193-18-6	91
			2-methyl-2-cyclohexenone	9886	001121-18-2	86
3	16.77	2.58	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Linalool	40059	000078-70-6	86
			Linalool	40053	000078-70-6	72
			Linalool	40058	000078-70-6	53

- 4 28.32 1.12 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Cyclopentane, 2-methyl-1-methylene 24977 056710-83-9 59  
 TRANS-8-ETHYLBICYCLO[4.3.0]-3-NONE 36250 000000-00-0 50  
 Hydrazine, 1-ethyl-1-phenyl- (CAS) 24516 000644-21-3 49
- 5 30.15 7.32 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .alpha.-Cubebene \$\$ 1H-Cyclopenta[ 89540 017699-14-8 98  
 .alpha.-Copaene \$\$ Tricyclo[4.4.0. 89533 003856-25-5 96  
 .alpha.-Copaene \$\$ Tricyclo[4.4.0. 89527 003856-25-5 95
- 6 30.59 0.62 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta.-Bourbonene \$\$ Cyclobuta[1,2 89546 005208-59-3 90  
 .beta.-Bourbonene \$\$ Cyclobuta[1,2 89547 005208-59-3 83  
 .beta.-Bourbonene \$\$ Cyclobuta[1,2 89549 005208-59-3 83
- 7 32.17 9.64 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89245 000087-44-5 98  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89255 000087-44-5 98  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89242 000087-44-5 92
- 8 32.75 0.58 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .alpha.-Bergamotene \$\$ Bicyclo[3.1 89445 017699-05-7 64  
 1-.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25211 018172-67-3 53  
 1-.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25214 018172-67-3 53
- 9 33.05 0.57 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .BETA.-SESQUIPELLANDRENE 89665 020307-83-9 64  
 TRANS-.BETA.-FARNESENE 89677 028973-97-9 55  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89164 000495-61-4 50
- 10 33.56 1.60 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 TRANS-.BETA.-FARNESENE 89697 028973-97-9 94  
 .beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecat 89128 018794-84-8 72  
 trans-.beta.-Farnesene \$\$ (E)-.bet 89125 000502-60-3 72
- 11 33.63 1.71 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 TRANS-.BETA.-FARNESENE 89677 028973-97-9 87  
 TRANS-.BETA.-FARNESENE 89697 028973-97-9 83  
 .beta.-sesquiphellandrene \$\$ 2-MET 89154 020307-83-9 64
- 12 34.01 0.68 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 CYCLOOCTENE, 5,6-DIMETHYLENE- 23418 000000-00-0 60  
 GERMACRENE-D 89684 023986-74-5 60  
 .beta.-cubebene 89691 013744-15-5 58
- 13 34.61 1.13 C:\DATABASE\WILEY275.L

.beta.-Cubebene \$\$ 1H-Cyclopenta[1 89544 013744-15-5 76  
 Calarene \$\$ 1H-Cyclopropa[a]naphth 89494 017334-55-3 76  
 germacrene d 89580 023986-74-5 68

14 34.86 1.16 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 GERMACRENE-D 89684 023986-74-5 89  
 .beta.-cubebene 89691 013744-15-5 81  
 GERMACRENE-D 89658 023986-74-5 80

15 35.52 6.78 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 BICYCLOGERMACRENE 89653 024703-35-3 97  
 bicyclogermacrene \$\$ Bicyclo[8.1.0 89615 100762-46-7 96  
 BICYCLOGERMACREME 89643 024703-35-3 90

16 35.88 2.08 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta. bisabolene \$\$ BETA-BISABOLE 89605 000000-00-0 72  
 (Z)-.beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dod 89122 028973-97-9 58  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89163 000495-61-4 52

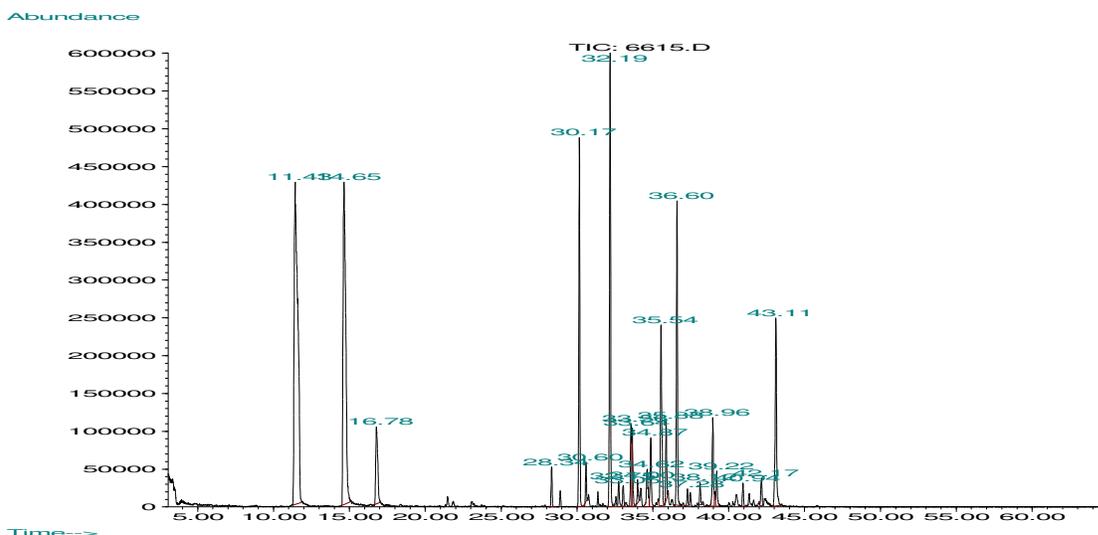
17 36.58 7.48 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .delta.-Cadinene \$\$ Naphthalene, 1 89349 000483-76-1 98  
 .delta.-cadinene (armoise-Maroc) \$ 89582 000483-76-1 98  
 .delta.-Cadinene \$\$ Naphthalene, 1 89358 000483-76-1 95

18 38.95 1.38 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Spathulenol \$\$ 1H-Cycloprop[e]azul 105942 006750-60-3 91  
 7-(1-methyl-ethenyl)-1-hydroxy-1,4 106006 000000-00-0 70  
 (-)-Spathulenol (CAS) \$\$ 1H-Cyclop 105982 077171-55-2 70

19 42.17 0.58 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Trivinyl(1,3,3-tribromopropyl)sila 228657 000000-00-0 43  
 Bicyclo[2.2.1]hept-2-en-2-amine, 5 111298 041696-74-6 32  
 Phenol, 3-amino- (CAS) \$\$ 3-Aminop 9478 000591-27-5 27

20 43.12 4.35 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89162 000495-61-4 70  
 trans-.beta.-Farnesene \$\$ (E)-.bet 89123 000502-60-3 43  
 .beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecat 89127 018794-84-8 43

Fri Oct 23 07:55:51 2009



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\6615.D  
 Operator: MCS/FPM  
 Date Acquired: 22 Oct 09 7:23  
 Method File: ACEITES  
 Sample Name: P. dulcis CEDA 3/0.27%  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	11.42	24.34	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE	18101	000110-93-0	94
			6-Methyl-5-hepten-2-one \$\$ 5-Hepte	17927	000110-93-0	94
			6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE B	18143	000000-00-0	94
2	14.64	18.20	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl- (CAS	9808	001193-18-6	90
			2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl- (CAS	9809	001193-18-6	90
			2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl- (CAS	9806	001193-18-6	83
3	16.78	3.25	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Linalool \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7	40055	000078-70-6	90
			.alpha.-terpinolene \$\$ Cyclohexene	25089	000586-62-9	80
			Linalool \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7	40061	000078-70-6	72

4 28.34 0.86 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Bicycloelemene 89618 000000-00-0 80  
 Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane, 25160 000079-92-5 70  
 CAMPHENE 25359 000079-92-5 70

5 30.17 8.03 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .alpha.-Copaene \$\$ Tricyclo[4.4.0. 89534 003856-25-5 98  
 .alpha.-Copaene \$\$ Tricyclo[4.4.0. 89531 003856-25-5 98  
 .alpha.-Copaene \$\$ Tricyclo[4.4.0. 89529 003856-25-5 98

6 30.60 0.73 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta.-Bourbonene \$\$ Cyclobuta[1,2 89547 005208-59-3 95  
 .beta.-Bourbonene \$\$ Cyclobuta[1,2 89545 005208-59-3 94  
 .BETA. BOURBONENE 89648 005208-59-3 91

7 32.19 10.40 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89246 000087-44-5 99  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89251 000087-44-5 99  
 TRANS(.BETA.)-CARYOPHYLLENE 89769 000000-00-0 99

8 32.76 0.64 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 MYRCENE 25355 000123-35-3 38  
 CIS-CARYOPHYLLENE \$\$ Bicyclo[7.2.0 89238 013877-93-5 38  
 .alpha.-CEDRENE 89638 000469-61-4 38

9 33.05 0.47 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Alloaromadendrene \$\$ 1H-Cycloprop[ 89480 025246-27-9 58  
 Aromadendrene 89577 000489-39-4 50  
 (E)-Farnesene 89113 000502-61-4 38

10 33.57 1.71 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 (Z)-.beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dod 89122 028973-97-9 91  
 TRANS-.BETA.-FARNESENE 89697 028973-97-9 90  
 (E,E)-7,11,15-Trimethyl-3-methylen 155520 070901-63-2 78

11 33.64 1.89 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 CIS-.ALPHA.-BISABOLENE 89674 017627-44-0 64  
 (E)-Farnesene 89113 000502-61-4 62  
 trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2 89242 000087-44-5 58

12 33.99 0.76 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 AROMADENDRENE 89682 000489-39-4 94  
 ALLOAROMADENDRENE 89772 000000-00-0 91  
 Alloaromadendrene \$\$ 1H-Cycloprop[ 89480 025246-27-9 91

13 34.20 0.64 C:\DATABASE\WILEY275.L

- CYCLOPENTANE, 1-METHYLEN-2-VINYL- 9244 006196-78-7 38  
 tricyclo[5.1.0.0(2,8)]octan \$\$ Tri 9339 036328-29-7 38  
 TRICYCLO(3.2.1.0) OCTANE \$\$ Tricyc 9319 019074-25-0 38
- 14 34.63 1.32 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .alpha.-Copaene \$\$ Tricyclo[4.4.0. 89532 003856-25-5 86  
 .alpha.-amorphenone \$\$ .ALPHA. AMORP 89416 023515-88-0 83  
 .alpha.-Cubebene \$\$ 1H-Cyclopenta[ 89541 017699-14-8 64
- 15 34.87 1.76 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 germacrene d 89579 023986-74-5 94  
 .gamma.-Cadinene \$\$ Naphthalene, 1 89345 039029-41-9 93  
 GERMACRENE-D 89684 023986-74-5 91
- 16 35.54 5.57 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 bicyclogermacrene \$\$ Bicyclo[8.1.0 89615 100762-46-7 95  
 BICYCLOGERMACRENE 89653 024703-35-3 94  
 .GAMMA.-ELEMENE \$\$ Cyclohexane, 1- 89183 003242-08-8 93
- 17 35.89 1.65 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta. bisabolene \$\$ BETA-BISABOLE 89607 000000-00-0 94  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89166 000495-61-4 93  
 .beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89162 000495-61-4 91
- 18 36.60 7.11 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .delta.-Cadinene \$\$ Naphthalene, 1 89351 000483-76-1 95  
 .DELTA.-CADINENE 89787 000000-00-0 95  
 .delta.-Cadinene \$\$ Naphthalene, 1 89352 000483-76-1 94
- 19 37.28 0.37 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cyclound 89201 006753-98-6 90  
 .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cyclound 89190 006753-98-6 87  
 .alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cyclound 89202 006753-98-6 83
- 20 38.12 0.48 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecat 89127 018794-84-8 96  
 trans-.beta.-Farnesene \$\$ (E)-.bet 89123 000502-60-3 96  
 NEROLIDOL 108474 007212-44-4 80
- 21 38.96 2.30 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 (-)-Spathulenol (CAS) \$\$ 1H-Cyclop 105982 077171-55-2 59  
 Spathulenol \$\$ 1H-Cycloprop[e]azul 105942 006750-60-3 56  
 cis-2,7,7.beta.-trimethyl-6-methyl 87326 122211-49-8 53
- 22 39.22 0.91 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 1-.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25215 018172-67-3 49  
 2-.BETA.-PINENE \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25217 000127-91-3 46

l-.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25214 018172-67-3 46

23 40.94 0.55 C:\DATABASE\WILEY275.L

1 S-CIS-CALAMENENE 87320 000483-77-2 60

3-Isopropyl-6,10-dimethyltricyclo[ 87340 000000-00-0 47

1,8-ANHYDRO-CIS-.ALPHA.-COPAENE-8- 87310 058569-26-9 47

24 42.17 0.70 C:\DATABASE\WILEY275.L

5-t-Butyluracil \$\$ 2,4(1H,3H)-Pyri 52636 017432-97-2 27

2-Heptenoic acid, 4-methylphenyl e 103447 072060-10-7 22

3-Pyridinol, 6-methyl- (CAS) \$\$ 3- 9448 001121-78-4 11

25 43.11 5.37 C:\DATABASE\WILEY275.L

.ALPHA.-CEDRENE 89765 000000-00-0 70

1H-3a,7-Methanoazulene, 2,3,4,7,8, 89298 000469-61-4 70

.beta.-Bisabolene \$\$ Cyclohexene, 89162 000495-61-4 68

Fri Oct 23 07:58:05 2009

## **Cálculos para cuantificación de fenoles**

De acuerdo a la metodología establecida en la sección 9.8.5 los cálculos correspondientes para determinar la concentración de fenoles totales en *Phyla dulcis* son:

$2.5 * \text{Conc}(\mu\text{g/ml}) * 25 \text{ ml} / \text{Masa}(\text{mg}) = \mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por mg o mg equivalentes de ácido gálico por g, donde

Conc = Concentración cuantificada en el espectrofotómetro uv-vis.

Masa = Masa del material vegetal a partir del cual se preparó la muestra.

*Phyla dulcis* Los Platanares, municipio de Guasacapán, Santa Rosa.

*Phyla dulcis* El Chico, municipio de Usumatlán, Zacapa.

*Phyla dulcis* CEDA, municipio de Guatemala, Guatemala.

## THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario (No Introducido)  
 Departamento (No Introducido)  
 Organización (No Introducido)  
 Información (No Introducido)

Fecha del informe 23/10/2009  
 Hora del informe 13:25:34

### Calibración - Calibración Ácido Gálico Finalizada.fqc

Nombre operario (No Introducido)  
 EV300 153903

### Método de Calibración - Calibración Ácido Gálico Finalizada.fqc

Descripción (No Introducido)  
 Modo Cuantificación Lambda Sencilla Patrones 5  
 Lambda 1 765,00 nm Réplicas 3  
 Lambda 2 Apagado Ajuste de Curva inicialineal  
 Lambda 3 Apagado Uds.. Conc. (No Introducido)  
 Tiempo Integ. 00:00:01 N° Decimales Conc. 3  
 D2/Halógena Xenón Detección desviación Apagado  
 Ancho de Banda 2,0 nm Caducidad Apagado  
 Status Seguridad Desprotegido  
 Rango del Coeficiente Apagado

### Tabla de Patrones - Calibración Ácido Gálico Finalizada.fqc

Patrón	Conc.	Use	Rep.	765,00nm	Errores
Ácido Gálico	50,460	Sí	1	0,060	Ninguno
			2	0,059	Ninguno
			3	0,060	Ninguno
			Media:	0,060	Ninguno
Patrón02	100,920	Sí	1	0,120	Ninguno
			2	0,127	Ninguno
			3	0,117	Ninguno
			Media:	0,121	Ninguno
Patrón03	151,380	Sí	1	0,166	Ninguno
			2	0,183	Ninguno
			3	0,181	Ninguno
			Media:	0,177	Ninguno
Patrón04	204,320	Sí	1	0,277	Ninguno
			2	0,301	Ninguno
			3	0,296	Ninguno
			Media:	0,292	Ninguno
Patrón05	254,600	Sí	1	0,564	Ninguno
			2	0,579	Ninguno
			3	0,592	Ninguno
			Media:	0,578	Ninguno

Todos los Resultados han sido calculados a doble precisión , acorde con ANSI/IEEE STD 754-1985 han sido redondeados por motivos gráficos

### Tecla de errores

Ninguno: No se detectan errores  
 I : Datos inválidos

### Calibración Línea / Estadísticas Curva

Ecuación  $A = 0,0011 \times \text{Conc} + 0,0039$   
 Ajuste seleccionlineal  
 Coeficiente 0,998012

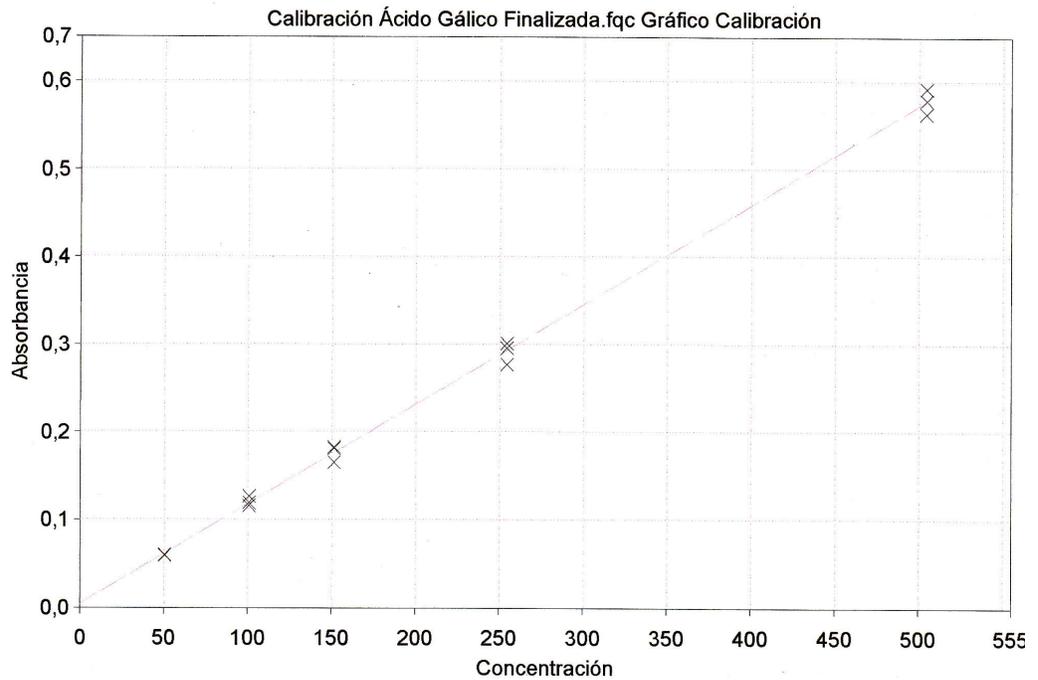
## THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario (No Introducido)  
Departamento (No Introducido)  
Organización (No Introducido)  
Información (No Introducido)

Fecha del informe 23/10/2009  
Hora del informe 13:25:34

Suma de residuo 0,0010

### Gráfico Calibración



## THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario (No Introducido)

Fecha del informe 23/10/2009

Departamento (No Introducido)

Hora del informe 13:24:00

Organización (No Introducido)

Información (No Introducido)

**Tabla resultados Cuantificación - Fenoles Totales 23 10 09.qre**

	<b>Muestra</b>	<b>765,0nm</b>	<b>Conc.</b>	<b>Errores</b>
1	Banano A	0,163	140,101	Ninguno
2	Muestra002	0,184	158,068	Ninguno
3	Muestra003	0,178	153,031	Ninguno
4	Cacao A	0,413	359,347	Ninguno
5	Muestra005	0,471	410,878	Ninguno
6	Muestra006	0,424	369,450	Ninguno
7	Guayaba A	0,229	197,678	Ninguno
8	Muestra008	0,253	219,302	Ninguno
9	Muestra009	0,251	217,305	Ninguno
10	Maíz A	0,046	37,381	Ninguno
11	Muestra011	0,059	48,084	Ninguno
12	Muestra012	0,056	45,875	Ninguno
13	Manzana A	0,074	61,518	Ninguno
14	Muestra014	0,083	69,171	Ninguno
15	Muestra015	0,084	70,233	Ninguno
16	Melón A	0,195	168,274	Ninguno
17	Muestra017	0,196	168,639	Ninguno
18	Muestra018	0,225	194,736	Ninguno
19	Naranja A	0,199	171,563	Ninguno
20	Muestra020	0,243	209,787	Ninguno
21	Muestra021	0,239	206,974	Ninguno
22	Orégano A	0,413	359,520	Ninguno
23	Muestra023	0,421	366,621	Ninguno
24	Muestra024	0,421	366,850	Ninguno
25	Papaya A	0,221	190,551	Ninguno
26	Muestra026	0,150	128,271	Ninguno
27	Muestra027	0,196	168,464	Ninguno
28	Piña A	0,075	62,178	Ninguno
29	Muestra029	0,090	75,741	Ninguno
30	Muestra030	0,098	82,283	Ninguno
31	Uva A	0,294	255,198	Ninguno
32	Muestra032	0,347	301,849	Ninguno
33	Muestra033	0,344	299,162	Ninguno
34	P dulcis los pla	0,161	138,330	Ninguno
35	Muestra035	0,140	119,856	Ninguno
36	Muestra036	0,169	145,197	Ninguno

*Déjimo 4. Tabla resultados Cuantificación - Fenoles Totales 23 10 09.qre*

## THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario (No Introducido)  
Departamento (No Introducido)  
Organización (No Introducido)  
Información (No Introducido)

Fecha del informe 23/10/2009  
Hora del informe 13:24:00

	Muestra	765,0nm	Conc.	Errores
37	Muestra037	0,167	143,323	Ninguno
38	AC 1	0,079	66,040	Ninguno
39	Muestra039	0,083	69,438	Ninguno
40	Muestra040	0,046	36,714	Ninguno
41	AC 4	0,064	53,001	Ninguno
42	Muestra042	0,064	52,911	Ninguno
43	Muestra043	0,064	52,914	Ninguno
44	Muestra044	0,064	52,840	Ninguno
45	Muestra045	0,064	52,868	Ninguno

Todos los Resultados han sido calculados a doble precisión , acorde con ANSI/IEEE STD 754-1985 , pero han sido redondeados por motivos gráficos

### Tecla de errores

Ninguno: No se detectan errores

I : Datos inválidos

A : Por encima del Patrón superior

## THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario (No Introducido)  
 Departamento (No Introducido)  
 Organización (No Introducido)  
 Información (No Introducido)

Fecha del informe 02/09/2009  
 Hora del informe 14:54:30

### Calibración - Curva de Calibración, Ácido Gálico.fqc

Nombre operario (No Introducido)  
 EV300 153903

### Método de Calibración - Curva de Calibración, Ácido Gálico.fqc

Descripción (No Introducido)  
 Modo Cuantificación Lambda Sencilla Patrones 5  
 Lambda 1 765,00 nm Réplicas 3  
 Lambda 2 Apagado Ajuste de Curva inicia Todas Curvas  
 Lambda 3 Apagado Uds.. Conc. (No Introducido)  
 Tiempo Integ. 00:00:01 N° Decimales Conc. 4  
 D2/Halógena Xenón Detección desviación Apagado  
 Ancho de Banda 2,0 nm Caducidad Apagado  
 Status Seguridad Desprotegido  
 Rango del Coeficiente Apagado

### Tabla de Patrones - Curva de Calibración, Ácido Gálico.fqc

Patrón	Conc.	Use	Rep.	765,00nm	Errores
Ácido Gálico	53,6300	Sí	1	0,055	Ninguno
			2	0,061	Ninguno
			3	0,063	Ninguno
			Media:	0,059	Ninguno
Patrón02	107,2600	Sí	1	0,129	Ninguno
			2	0,131	Ninguno
			3	0,131	Ninguno
			Media:	0,130	Ninguno
Patrón03	160,8900	Sí	1	0,184	Ninguno
			2	0,190	Ninguno
			3	0,181	Ninguno
			Media:	0,185	Ninguno
Patrón04	268,1500	Sí	1	0,310	Ninguno
			2	0,301	Ninguno
			3	0,295	Ninguno
			Media:	0,302	Ninguno
Patrón05	536,3000	Sí	1	0,523	Ninguno
			2	0,542	Ninguno
			3	0,566	Ninguno
			Media:	0,544	Ninguno

Todos los Resultados han sido calculados a doble precisión , acorde con ANSI/IEEE STD 754-198 han sido redondeados por motivos gráficos

**THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10**

Nombre operario (No Introducido)  
Departamento (No Introducido)  
Organización (No Introducido)  
Información (No Introducido)

Fecha del informe 02/09/2009  
Hora del informe 14:55:39

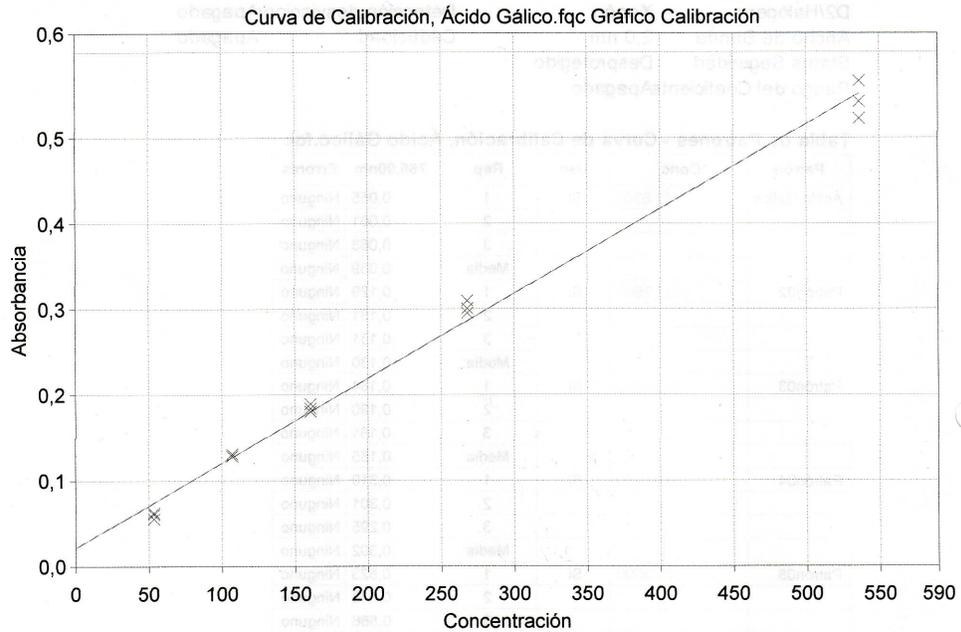
**Tecla de errores**

Ninguno : No se detectan errores  
I : Datos inválidos

**Calibración Línea / Estadísticas Curva**

Ecuación  $A = 0,0010 \times \text{Conc} + 0,0211$   
Ajuste seleccionadlineal  
Coeficiente 0,993588  
Suma de residuo0,0028

**Gráfico Calibración**



## THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario (No Introducido)  
 Departamento (No Introducido)  
 Organización (No Introducido)  
 Información (No Introducido)

Fecha del informe 02/09/2009  
 Hora del informe 14:56:21

**Tabla resultados Cuantificación - Cuantificación Fenoles totales.qre**

	Muestra	765,0nm	Conc.	Errores
1	Apio A	0,357	338,9757	Ninguno
2	Apio B	0,438	421,6073	Ninguno
3	Apio C	0,329	310,9790	Ninguno
4	Brocoli A	0,166	145,9641	Ninguno
5	Brocoli B	0,201	181,5834	Ninguno
6	Brocoli C	0,112	91,4251	Ninguno
7	Cafe A	0,244	224,9620	Ninguno
8	Cafe B	0,250	231,7604	Ninguno
9	Cafe C	0,261	242,8405	Ninguno
10	Coliflor A	0,202	182,8541	Ninguno
11	Coliflor B	0,205	186,0025	Ninguno
12	Coliflor C	0,260	241,2635	Ninguno
13	Cebolla A	0,202	182,4959	Ninguno
14	Cebolla B	0,266	247,2825	Ninguno
15	Cebolla C	0,267	248,5884	Ninguno
16	Espinaca A	0,438	420,8367	Ninguno
17	Espinaca B	0,476	459,7775	Ninguno
18	Espinaca C	0,441	424,7809	Ninguno
19	frijol A	0,196	176,4943	Ninguno
20	friol B	0,248	229,2232	Ninguno
21	Frijol C	0,286	267,9855	Ninguno
22	Lechuga A	0,145	124,8144	Ninguno
23	Lechuga B	0,178	158,5952	Ninguno
24	Lechuga C	0,170	150,8944	Ninguno
25	Papa A	0,078	57,6909	Ninguno
26	Papa B	0,084	63,3347	Ninguno
27	Papa C	0,075	54,9220	Ninguno
28	Perejil a	0,324	306,1386	Ninguno
29	Perejil B	0,482	465,2139	Ninguno
30	Perejil C	0,461	444,5512	Ninguno
31	Rabano A	0,255	236,6667	Ninguno
32	Rabano B	0,285	266,3053	Ninguno
33	Rabano C	0,268	249,6822	Ninguno

# THERMO ELECTRON ~ VISIONpro SOFTWARE V4.10

Nombre operario (No Introducido)  
 Departamento (No Introducido)  
 Organización (No Introducido)  
 Información (No Introducido)

Fecha del informe 02/09/2009  
 Hora del informe 14:58:29

	Muestra	765,0nm	Conc.	Errores
34	repollo A	0,158	137,9519	Ninguno
35	Repollo B	0,168	148,0658	Ninguno
36	Repollo C	0,191	171,6404	Ninguno
37	Zanahoria A	0,145	125,1942	Ninguno
38	Zanahoria C	0,139	119,4609	Ninguno
39	Orozus ceda A	0,110	89,6287	Ninguno
40	Orozus ceda B	0,117	97,4060	Ninguno
41	Orozus ceda C	0,114	93,9354	Ninguno
42	Orozus ceda D	0,107	86,8555	Ninguno
43	Orozus el chico A	0,131	110,6448	Ninguno
44	Orozus el chico B	0,112	92,1512	Ninguno
45	Orozus el chico C	0,124	104,2451	Ninguno
46	Orozus el chico D	0,132	112,4555	Ninguno
47	AC A	0,168	148,0245	Ninguno
48	AC B	0,158	137,9186	Ninguno
49	AC C	0,182	163,0750	Ninguno
50	AC D	0,210	190,9020	Ninguno
51	ACT A	0,307	289,2351	Ninguno
52	ACT B	0,269	250,3536	Ninguno
53	ACT C	0,290	271,3455	Ninguno
54	ACT D	0,293	274,9201	Ninguno
55	Muestra055	0,294	276,0743	Ninguno

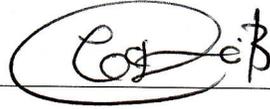
Todos los Resultados han sido calculados a doble precisión , acorde con ANSI/IEEE STD 754-1985 , pero han sido redondeados por motivos gráficos

### Tecla de errores

Ninguno : No se detectan errores

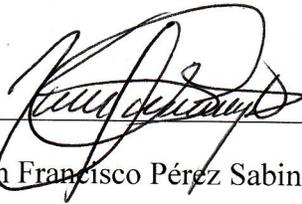
I : Datos inválidos

A : Por encima del Patrón superior



Lic. Christian Daniel Farfán Barrera

Autor



Dr. Juan Francisco Pérez Sabino Ph.D.

Asesor



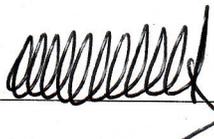
MA. Rodolfo Marineli Orozco Chilel

Revisor



MSc. Arme Marie Liere de Godoy

Directora, Escuela de Estudios de Postgrad



Dr. Óscar Manuel Cobar Pinto Ph.D.

Decano