

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



Evaluación comparativa del contenido fitoquímico y actividad biológica *in vitro* de *Litsea guatemalensis* colectada en dos regiones y épocas diferentes en Guatemala.

PRESENTADO POR

Vivian Alejandra Tucux de León

María Alejandra Mata Asifuina

Bárbara Cecilia Leiva Cifuentes

QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, MAYO DE 2012

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



INFORME DE SEMINARIO

PRESENTADO POR

Vivian Alejandra Tucux de León

María Alejandra Mata Asifuina

Bárbara Cecilia Leiva Cifuentes

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, MAYO DE 2012

MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA

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

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Ámbito de la investigación	2
II. Resumen	3
III. Antecedentes.....	4
IV. Justificación	11
V. Objetivos.....	13
VI. Materiales y Métodos	14
VII. Resultados.....	47
VIII. Discusión de Resultados	64
IX. Conclusiones.....	72
X. Recomendaciones	74
XI. Referencias Bibliográficas.....	75
XII. Anexos.....	78

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La familia Lauraceae se encuentra considerablemente distribuida en Guatemala, por medio de sus tres especies representativas: *Litsea glaucescens*, *Litsea neesiana* y *Litsea guatemalensis*, las cuales son utilizadas indistintamente por la población guatemalteca para tratar distintas afecciones y como condimento en los alimentos. El estudio minucioso de una de las especies, a saber *Litsea guatemalensis*, es una gran contribución al estudio de esta familia, ya que ésta se encuentra altamente distribuida en el territorio guatemalteco, en comparación de las otras dos (Cáceres A, 1996, p. 227).

El aporte de los resultados de la actividad biológica de *Litsea guatemalensis*, así como la descripción de sus parámetros de calidad, contribuirá grandemente a la caracterización y validación de dicha especie para el uso de la población en general. Así mismo la identificación de compuestos presentes en el aceite será de utilidad para estudiar el potencial como alimento, medicamento o cosmético. Así pues, con el fin de aprovechar al máximo el uso de la especie, el estudio se realizó en dos épocas diferentes que son claramente marcadas en el territorio guatemalteco, como lo es la época lluviosa y seca, con el objetivo de determinar la variabilidad del contenido de compuestos químicos y su repercusión en la actividad biológica.

Por último, es necesaria la determinación de parámetros de calidad de la especie, con el fin de optimizar el uso de la misma, lo cual a su vez aporta una referencia para posteriores análisis de las otras especies siendo esto muy significativo para esta familia, puesto que con base en la ficha técnica de calidad generada, pueden ser comparados los parámetros de las otras dos especies o de diversas procedencias logrando la estandarización y reproducibilidad al comercializarse la droga vegetal o sus productos.

2. RESUMEN

El presente trabajo generó información química y biológica de la especie vegetal de laurel (*Litsea guatemalensis*) ya que esta planta es de uso culinario y medicinal en el territorio guatemalteco. Esta investigación tuvo como objetivo principal establecer si existen diferencias significativas en dos lugares y dos épocas según la evaluación de la actividad biológica *in vitro* de los extractos etanólico y de diclorometano, y aceite obtenido del laurel (*Litsea guatemalensis*), al mismo tiempo la identificación de compuestos químicos por medio de caracterización fitoquímica.

Se realizó la recolección e identificación botánica de *Litsea guatemalensis* en dos puntos: Cerro Alux y Florencia; realizando la colecta en época lluviosa y seca, las cuales se determinaron de la siguiente manera: para la época húmeda se tomó de referencia el mes de septiembre y para la época seca, el mes de marzo. Después de realizada la colecta de *Litsea guatemalensis* en los distintos puntos establecidos, se procedió a realizar las pruebas fisicoquímicas. No se observó una variabilidad estadísticamente significativa según los resultados obtenidos.

El análisis de minerales en la droga vegetal, por medio de Fluorescencia de Rayos X, evidenció la presencia de algunos minerales nutritivos obtenidos comúnmente del suelo, se detectó la presencia de potasio, calcio, hierro, zinc, estroncio, en ambas épocas y ambos lugares de colecta. El magnesio y azufre únicamente se presenta en la época seca de las muestras colectadas en ambos lugares, estos compuestos provienen del suelo.

Los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de estudio en plantas aromáticas y medicinales, en este estudio se obtuvo un mayor rendimiento de aceite esencial en la época húmeda (0.9%), época seca (0.76%). Se encontró en el aceite esencial un índice de refracción promedio de 1.1240 a 20°C. Para la identificación química del aceite esencial se utilizó la cromatografía de gases (CG), habiéndose detectado que *Litsea guatemalensis* contiene como componentes mayoritarios: tetrahidro-citroneleno; 1,8-cineol;

terminen-4-ol; α -terpineol; carvona; butanoato de linalilo; p-metoxi-cinamaldehído. Mediante espectrometría de masas se identificó como componente característico de esta especie al 1,8-cineol. En la determinación fitoquímica, se detectó la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, saponinas, flavonoides, cumarinas, aceites volátiles; en ambos lugares y ambas épocas de colecta.

La evaluación de la actividad biológica muestra en la actividad antioxidante, que tanto los extractos como los aceites analizados por cromatografía de capa fina poseen esta actividad. En el análisis macrométrico el extracto etanólico proveniente de Florencia en época húmeda presentó una concentración inhibitoria mínima ideal (0.377 extracto diclorometano, 0.267 extracto etanólicos) ya que la proporción que se necesita para dicha actividad es baja.

En cuanto a la actividad anticolinesterasa tanto los extractos como los aceites analizados en cromatografía en capa fina presentaron dicha actividad la cual es importante ya que representa un potencial para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En la determinación de actividad antibacteriana del aceite y extractos la concentración inhibitoria mínima demuestra que el aceite tiene mejor acción que los controles utilizados sobre las bacterias utilizadas.

El aceite esencial de *Litsea guatemalensis* presentan una potente actividad citotóxica, así como actividad larvicida según el lugar de colecta. Por lo que se concluye que esta especie es de gran interés ya que contiene dentro de sus aceites compuestos que son de interés farmacológico, y también para un uso en la agricultura, de esta forma tener una alternativa natural.

Uno de los objetivos de esta investigación es la estandarización y validación para la propuesta de una Ficha de Control de Calidad para *Litsea guatemalensis*, para establecer parámetros característicos de la especie.

3. ANTECEDENTES

3.1 Descripción de Familia Lauraceae.

Árboles o arbustos, usualmente aromáticos, raramente parasitadas y enredadas por hierbas o ramas de plantas, glabras o pubescentes; la mayoría de hojas son alternas y pecioladas, simples, enteras, penninervadas o a menudo triplinervadas; no posee estípulas; inflorescencias usualmente axilares, paniculadas, espigas, racimos, umbrelas, o raramente capítulos, las brácteas de hojas caducas o algunas veces formando un involucre más o menos persistente; pequeñas flores, regular, perfecta o dioicas, algunas veces, polígamo-dioicas, a menudo fragantes; perianto, tubo pequeño o conspicuo, cónico, hueco, o con forma de urna, en edad generalmente acrecenté y formando una cúpula en la base del fruto (la baya y cúpula indicativos de una nuez), raramente caducan.

Los segmentos del periantio son 4 ó 6, biseriados, en el exterior a veces son más pequeños que en el interior; estambres usualmente en 3 ó 4 series de 3, alternados, incrustados en el tubo del perianto, los estambres de la corona son 2 serie fértiles, usualmente aglandular, interno o raramente externo, estambres de la tercera serie usualmente fértiles, con células internas, laterales o apicales, la base de los filamentos con dos glándulas en el exterior, estambres de la cuarta serie, (la más interna) usualmente estéril y reducido a estaminodio, algunas veces obsoleta, anteras ovaladas, oblongas, rectangulares o triangulares, usualmente con 2 ó 4 células, las células en 2 filas verticales o en forma de arco, apertura de las válvulas, usualmente desde la base del ápice.

Las válvulas brindan persistencia y difusión, filamentos comúnmente libres, o los de la tercera serie rara vez unidos, la mayoría de las glándulas basales sésiles y libres; ovario libre, epigino, unicelular, el único ovario anátropo, colgante, que se adjunta cerca de la cúspide de la célula; estilo usualmente conspicuo, el estigma obtuso o raramente capitado, fruto de una semilla o sin semilla baya o drupa, usualmente rodeado de la base por el

persistente tubo del perianto; endospermo sin semillas, la testa generalmente membranosa, cotiledones plano-convexos (Cáceres A, 2006).

Hay cerca de 40 géneros y 1,000 especies, casi se limita a los trópicos. Algunos otros géneros están representados en el sur de Centroamérica. Un árbol del género de sasafrás se encuentra en regiones templadas de Norte América. Su nombre se deriva de una lengua india del Norte de América, pero este nombre, en alguna manera desconocido, se ha establecido en América Central y del Sur de diversas plantas, por lo general de otras familias. En Centroamérica, por ejemplo, el nombre sasafrás a veces se aplica a las especies de *Croton* (Euphorbiaceae). La más celebrada y típica planta de Lauraceae es el laurel del Antiguo Mundo, *Laurus nobilis* L., nativo del sur de Europa, un largo símbolo de la victoria (Cáceres A, 2006).

La familia es un elemento importante en los trópicos como una fuente de madera y en un género de fruta. Por lo tanto, es particularmente lamentable, ya que taxonómicamente es quizás el grupo más difícil de todas las plantas tropicales de América. Las especies americanas no han sido monografiadas en su conjunto desde el momento de la monografía *Mez*, ahora a lo largo de la fecha. Un buen comienzo en una nueva monografía se ha realizado hace unos años por AJGH Ostermans de Leiden, pero el trabajo se interrumpió mucho antes de su finalización. Las flores de toda la familia son monótonamente iguales, aparecen en el exterior, pero de estructura muy variada. Árboles casi idénticos en el follaje pero se encuentran mínimas diferencias en la estructura de la flor, y generalmente es sólo por la disección de las flores que el género puede ser determinado (Cáceres A, 2006).

3.2 Nombre

El nombre completo de las tres especies de laurel que hay en Guatemala son los siguientes: *Litsea glaucescens* HBK., *Litsea guatemalensis* Mez., *Litsea neesiana* (Schauer) Hemsl (Cáceres A, 1996).

3.2.1 Sinonimias

Litsea acuminatissima Lundell, *Litsea matudau* Lundell; *Tetranthera glaucescens* var. *subsolitaria* Maissn (Cáceres A, 1996).

3.2.2 Nombres populares

Aguarel, laurelillo, dpac-tzé, sufricalla, zit-zuch, laurel (Cáceres A, 1996).

3.3 Clasificación

División:	Magnoliofita
Clase:	Magnoliopsida
SubClase:	Magnoliidae
Orden:	Lurales
Familia:	Laureceae
Género:	<i>Litsea</i> L.

Fuente de referencia: Herbario de Facultad de CCQQFAR, USAC.

3.4 Descripción botánica

Litsea guatemalensis es un árbol pequeño de hasta 6 m de alto, ramas delgadas, cafés. Hojas coriáceas, peciolo 1.5 cm de largo, elíptico-lanceoladas, 8 cm de largo, agudas en la base, lustrosas, glabras. Flores axilares, pedúnculo simple, solitarias, 15 mm de largo, 5-11 flores; brácteas de involucreo deciduo; filamentos glabros (Cáceres A, 1996).

3.5 Hábitat

Litsea guatemalensis es endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1500-3150 msnm; se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (Cáceres A, 1996).

3.6 Historia

Género de más de 100 especies, unas 12 de América, en Guatemala se han descrito tres especies nativas que se usan indistintamente como laurel (*Litsea glaucescens*, *Litsea neesiana* y *Litsea guatemalensis*). Hernández en 1790 la menciona con el nombre nahuatl *Ecapátlli* o medicina del viento y describe alguna de sus propiedades medicinales. Las hojas de las tres especies tienen olor muy parecido al del laurel europeo (*Laurus nobilis*), “porque tienen componentes químicos en común entre ellos se encuentra el terpinen-4-ol”, atribuyéndole propiedades similares. El laurel europeo se cultiva y usa medicinalmente desde los griegos y romanos; sus hojas eran las guirnaldas que se daban a los ganadores de las olimpiadas (Cáceres A, 2003).

3.7 Agricultura

Se obtiene principalmente por recolección en los campos de crecimiento silvestre en las regiones frías y montañosas del altiplano del país. Si bien es una planta relativamente frecuente en el país, raramente se encuentra en forma abundante en una localidad determinada. Se recomienda su conservación o cuando menos su manejo en las regiones de crecimiento silvestre. Se propaga por semilla, no existen cultivos establecidos en el país. Florea de febrero a junio, las hojas y flores se colectan hacia finales de la floración y se secan a la sombra (Cáceres A, 1996).

3.8 Usos medicinales atribuidos

Para su uso por la población se usan indistintamente las tres especies. El cocimiento de hojas por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, males de la garganta, tos, tos ferina) y gastrointestinales (diarrea, cólico, úlcera), carencia de leche en la madre e hinchazón; por vía tópica se usa en lavado y baños para cansancio y epilepsia. El cocimiento de la corteza se usa para tratar mordeduras de culebras y de perros. Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia; en sahumeros se usa para parálisis. Se le atribuye propiedad aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espasmolítica, febrífuga y pectoral (Cáceres A, 1996).

3.8.1 Otros usos populares

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

3.9 Farmacología

Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas de *Litsea guatemalensis* tiene moderada actividad contra *C. albicans* que no se confirmó; el extracto presenta actividad insecticida contra hormigas (Cáceres A, 1996).

3.10 Composición química

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

3.11 Farmacognosia

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

3.12 Toxicología

No se encuentran referencias sobre la toxicidad de las tres especies nativas (Cáceres A, 1996).

3.13 Indicaciones terapéuticas

Por su similitud organoléptica con *Laurus nobilis* y su uso popular en alimentación y medicina, está indicado en el tratamiento de anorexia, digestión lenta, espasmo gastrointestinal, meteorismo y bronquitis crónica. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 1-2g/taza en infusión o 1-2 ml de tintura 1:8 con etanol 35%. Para uso tópico se recomienda la decocción de 5 hojas/taza en el tratamiento de estomatitis, faringitis y sinusitis, usada como colutorio, gargarismo o compresa; en alcoholato o pomada se usa como antirreumático, pediculicida y parasiticida (Cáceres A, 1996).

4. JUSTIFICACIÓN

El uso de las plantas en Guatemala ya no es solamente algo que se remonta a la historia, es una situación que con el pasar del tiempo adquiere auge entre los guatemaltecos, ya que día a día son utilizadas como alternativas terapéuticas, en nuestros alimentos o bien como un componente más en alguna formulación comercial (medicamentos, cosméticos, productos del hogar, entre otros) (Cáceres A, 2003). Es por ello la importancia del estudio de las mismas.

Entre las plantas de uso popular en el territorio guatemalteco se encuentra el laurel (*Litsea sp*), el cual es utilizado por muchos para condimentar los alimentos (Cáceres A, 1996), esto indistintamente de la especie de laurel que se emplee, o como decocciones u otras preparaciones para tratar algunas afecciones en el organismo.

Debido al uso popular indiscriminado que se le da a este género es importante evaluar una de las tres especies descritas en Guatemala, por su popularidad, facilidad y diversidad de uso; se estudiará la especie: *Litsea guatemalensis*. Esto con el propósito de evaluar la actividad biológica *in vitro* de aceite y extractos obtenidos de la especie, puesto que se cuenta con poca información al respecto; lo cual se logrará por medio de la identificación de compuestos químicos de aceites y extractos por cromatografía de gases y espectrometría de masas, la descripción del contenido de metabolitos secundarios por medio de caracterización fitoquímica, determinación de la actividad antioxidante y evaluación de la actividad antibacteriana, actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa, tamizaje larvicida y potencial tóxico.

La descripción de los componentes químicos que conforman el aceite y extractos de laurel determinan la actividad biológica que esta pueda tener, de ahí que sea indispensable el análisis y la determinación de dichos componentes.

La determinación de la actividad antioxidante de laurel reside en la importancia que están adquiriendo las plantas en la actualidad para el tratamiento de enfermedades degenerativas, lo cual puede ser de utilidad para estudios posteriores de ésta especie.

La determinación y evaluación del potencial tóxico, es sumamente valioso, ya que dentro de las descripciones realizadas de ésta especie no existen datos en relación a este aspecto.

La evaluación de la actividad larvicida radica en la posibilidad que describen los antecedentes en cuanto a la capacidad insecticida de la especie (Cáceres A, 1996), lo que podría ser de utilidad para el control de especies como *Anopheles alibimanus* y *Aedes aegypti*.

Por último, es substancial establecer parámetros de calidad que permitan distribuir ésta especie en sus mejores condiciones a nivel guatemalteco para el consumo humano.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- 5.1.1 Establecer si existen diferencias significativas en dos lugares y dos épocas según la evaluación de la actividad biológica *in vitro* de los extractos etanólico y de diclorometano, y aceite obtenido del laurel (*Litsea guatemalensis*).

5.2 Específicos

- 5.2.1 Identificar compuestos químicos por medio de caracterización fitoquímica, Cromatografía de Capa Fina, Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.
- 5.2.2 Evaluar la actividad biológica *in vitro* de los extractos etanólico, diclorometano, y aceite de *Litsea guatemalensis* (larvicida, antibacteriana, antioxidante y anticolinesterasa).
- 5.2.3 Comparar la composición fitoquímica y la actividad biológica de los extractos etanólico, diclorometano, y aceite de *Litsea guatemalensis* colectados en dos localidades diferentes (Florencia y Cerro Alux) y de igual forma en dos épocas diferentes (Húmeda y seca).
- 5.2.4 Establecer parámetros de calidad de la droga y extractos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Universo

- 6.1.1 Población: Especie de laurel, *Litsea guatemalensis*, distribuida en Guatemala, Florencia, Antigua Guatemala; y el Cerro Alux, San Lucas Sacatepéquez. Colectada durante dos épocas diferentes: época húmeda y época seca.
- 6.1.2 Muestra: Aceite y extractos etanólico y de diclorometano, obtenidos de las hojas secas de *Litsea guatemalensis*.

6.2 Recursos

6.2.1 Recursos humanos:

- Investigadoras: María Alejandra Mata, Bárbara Cecilia Leiva, Vivian Alejandra Tucux.
- Asesora: Licda. Sully Cruz.
- Revisora: Licda. Beatriz Medinilla.

6.2.2 Recursos Institucionales:

- LIPRONAT (Laboratorio de Investigación de Productos Naturales), T-10, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica, T-10, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

- UAI (Unidad de Análisis Instrumental), T-13, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Fisicoquímica, T-12, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Análisis Inorgánico, T-12, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Sección de Entomología Médica. Unidad de Vectores, Insectario. Ciudad Capital, zona 11.
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Investigación de campo; Cerro Alux, San Lucas Sacatepéquez y Florencia, Antigua Guatemala, Guatemala.

6.3 Material y Equipo

6.3.1 Equipo de laboratorio

- Analizador de humedad (balanza)
- Autoclave
- Balanza Analítica y Semianalítica
- Campana de extracción
- Cromatógrafo de gases
- Desecadora
- Equipo de destilación tipo Neoclevenger (manta de calentamiento, destilador, balón 1000 ml y refrigerante)

- Espectrofotómetro de masas
- Estereoscopio
- Evaporador rotatorio (balón de evaporación, condensador, bomba de vacío, refrigerante y balón de colecta)
- Horno de Convección
- Horno Desecador
- Incubadora
- Microondas Digestor
- Micropipetas automáticas
- Microplacas
- Mufla
- Percoladores
- Potenciómetro
- Rayos X
- Refractómetro
- Refrigeradora
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua
- Ultrasónico
- Vortex

6.3.2 Equipo Misceláneo

- Algodón
- Asa de nicromo
- Bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tyfi*, *Micobacterium smegmatis*, *Bacilus subtilis*, *Pseudomona auriginosa*, *Escherechia coli*.
- Hongos: *Candida albicans*
- Baño de María
- Bulbo de hule

- Cucharilla medidora
- Espátulas
- Estufa eléctrica
- Gradilla
- Huevecillos de *Artemia salina*
- Lámpara
- Larvas: *Aedes aegypti* y *anopheles albimanus* en sus cuatro estadios.
- Licuadora
- Marcadores
- Maskin-Tape
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel limpiacentes
- Papel parafilm
- Papel periódico
- Papel pH
- Placas de Silica gel 60 F₂₅₄
- Platillos desechables
- Propipeta
- Puntas amarillas de 200µL
- Puntas azules de 1000µL

6.3.3 Cristalería

- Asperjadores
- Balón con boca esmerilada para Neoclevenger.
- Balones aforados de 5, 10, 20, 25, 50 y 100 mL
- Balón de colecta para rotavapor
- Beackers de 50, 100, 150, 500 mL
- Cajas de petri cuadriplate

- Cámara cromatográfica
- Cámara de vidrio
- Capilares graduados (tamaño 0,5 µl)
- Cápsulas de porcelana
- Condensador para rotavapor
- Crisoles
- Cristalizadores
- Embudos de vidrio
- Erlenmeyers 250, 500, 1000 mL
- Pipetas tipo Pasteur
- Probetas graduadas de 10, 25, 50, 500 mL
- Tubos de ensayo
- Tubos de tapón de rosca de 15ml
- Varilla de vidrio
- Viales y frascos (ámbar)
- Vidrio de reloj

6.3.4 Reactivos

- Acetato de etilo
- Acetilcolina
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido acético glacial
- Ácido Clorhídrico
- Ácido fórmico
- Ácido nítrico
- Ácido sulfúrico
- Agar Muller Hinton, Tripticasa soya, agar planta
- Agua del chorro
- Agua desmineralizada

- Agua Regia
- Amonio
- Anhídrido acético
- Atropina
- Benceno
- Betacaroteno
- Buffer de acetatos
- Caldo tripticasa soya
- Cloroformo
- Cloruro de sodio
- Diclorometano
- Dietilamina
- Digoxina
- Dimetilsulfóxido
- DPPH
- Escerina
- Etanol (al 50, 70, 95 %)
- Fast blue B
- Galantamina
- Hidróxido de amonio
- Hidróxido de sodio
- Itrio
- Metanol
- Naftilo
- N-butanol
- Papaverina
- Pentano
- Peróxido de hidrógeno
- Quercetina
- Reactivo de Dragendorf

- Reactivo de Kedde
- Reactivo de Komarowsky
- Reactivo de Liebermann-Burchard
- Reactivo de sangre
- Rivastigmina
- Rutina
- Solución salina
- Sulfato de sodio anhidro
- Tolueno
- Tris HCl
- Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico

6.4 Métodos

6.4.1 Parámetros Fisicoquímicos de la Materia Vegetal

6.4.1.1 Secado de la Material Vegetal

Encender el horno y graduarlo a una temperatura de 40°C aproximadamente.

Colocar papel periódico u otro similar sobre las rejillas del horno y poner la materia vegetal sobre él.

Dejar el tiempo necesario hasta obtener una humedad óptima, cerca del 10%. Esto dependerá del estado en que se encuentre la materia vegetal. (España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

6.4.1.2 Determinación de la Humedad

Seleccionar parte representativa de la cantidad total de muestra.

Asegurar la homogeneidad de la muestra mezclando o agitando, muestreos en varias partes o bien muestreos en intervalos definidos.

Evitar toda influencia de calor al moler la muestra: el calor produce pérdida de humedad.

Moler la muestra con mortero.

Utilizar solo platillos de muestra desechables (diámetro interno = 92)

Distribuir la muestra en el platillo fina y homogéneamente (altura: 2.5 mm, cantidad de 5-15 g)

La humedad óptima debe ser del 10%. (España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

6.4.1.3 **Sólidos Totales**

En tres percoladores de 250 ml previamente limpios y secos, colocar un pedazo de algodón en la parte inferior y papel filtro doblado y cortado de acuerdo al diámetro del mismo.

Pesar 2.5 g de materia vegetal para cada percolador y numerar.

Añadir 50 ml de etanol al 50% al percolador #1, igual cantidad de etanol al 70% al #2 y etanol al 95% al #3.

Dejar reposar por 24 hrs.

Tarar 3 cápsulas de porcelana, previamente limpias y secas, y numerarlas de igual forma que los percoladores.

Recolectar el contenido de cada percolador en su cápsula correspondiente.

Llevar hasta sequedad en Baño de María.

Colocarlas en el horno a una temperatura de 110-115°C por una hora.

Colocar en la desecadora por 15 minutos.

Calcular el porcentaje de rendimiento y seleccionar el mejor. (LIPRONAT, 2005).

6.4.1.4 **Cenizas Totales**

Colocar los crisoles necesarios en la mufla por 1 hora a 600°C.

Pesar los crisoles y obtener la tara.

Pesar 1 g de material vegetal previamente pulverizado y colocarla en un crisol.

Quemar en una estufa hasta observar que deja de salir humo blanco.

Dejar en la mufla por 3 hrs. a 600°C.

Pesar los crisoles y obtener el porcentaje de rendimiento. (LIPRONAT, 2005).

6.4.1.5 **Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico**

Las cenizas insolubles en ácido clorhídrico están formadas por el residuo obtenido tras extracción de las cenizas totales con ácido clorhídrico, y se expresan con respecto a 100 g de droga (España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

Ensayo:

En el crisol, añadir al residuo obtenido en la determinación de cenizas totales 15 ml de *agua R* y 10 ml de *ácido clorhídrico R*. Cubrir con un vidrio de reloj, hervir suavemente durante 10 min y dejar enfriar. Filtrar el residuo con un filtro sin cenizas y lavar con *agua R* caliente hasta que el filtrado sea neutro. Desechar, calcinar al rojo oscuro, dejar enfriar en el desecador y pesar. Repetir la calcinación hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no sea superior a 1 mg (España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

6.4.1.6 **Digestión ácida asistida por Microondas**

Pesar 0.5 g de materia vegetal previamente pulverizada.

Colocarlos en los vasos del microondas.

Añadir 7 ml de HNO₃ al 65% y 1 ml de H₂O₂ al 30%

Asegurarse de cerrar los vasos herméticamente y colocarlos en su lugar correspondiente dentro del microondas.

Establecer los parámetros correspondientes para el equipo.

6.4.1.7 **Análisis del Contenido de Minerales**

Digerir las muestras a analizar (revisar metodología para la digestión ácida asistida por microondas).

Colocar las muestras digeridas en un balón de 10 ml y previo a aforar, añadir 5ppm de itrio (Y). Luego proceder a aforar con agua destilada.

Utilizar 10 µL de la muestra a analizar.

Secar en lámpara infrarrojo a 30 mili voltios, 0.32 miliamperios.

Utilizando el TXRF Espectrofotómetro xAR-E200. Llevar a cabo la lectura cuando la muestra se haya secado completamente (Y. Torres, J. Suárez, R. Martínez, 1998, pp. 54-28; Galán, P. de Liberto, 1977, pp. 191-194).

6.4.2 **Aceites**

6.4.2.1 **Extracción de Aceite Esencial por Neoclevenger**

Preparación de la muestra:

Moler 100g de materia seca vegetal y pesar 40g del material molido.

Introducir los 40g de material molido en un balón de destilación de 1000 ml.

Agregar aproximadamente de 400-500 ml de agua destilada hasta cubrir los 40g del material (LIPRONAT, 2005).

Uso del equipo:

Instalar el destilador de aceites esenciales, conectar el balón de destilación con el recipiente colector.

Conectar la bomba que circula la solución de enfriamiento por el refrigerante.

Llenar con agua el tubo N hasta el nivel B del tubo graduado.

Agregar 2ml de un disolvente orgánico (hexano, pentano o xileno) en el tubo K utilizando una pipeta Pasteur y colocar el tapón al tubo hasta que empiece a destilar el aceite.

Destilar a temperatura constante durante 2 horas, mantener un flujo de destilación de 2-3ml por minuto.

Determinar el tiempo de destilación a partir de la primera gota de aceite.

Medir la capa superior de aceite esencial recogido en el recipiente graduado.

Esperar 10 minutos después de terminar el calentamiento antes de colectar el aceite.

Abrir la llave, dejar caer el agua y descartarla. Recibir la parte orgánica en un tubo de ensayo o vial adecuado a la cantidad obtenida, y agregar al tubo K aproximadamente 1ml del disolvente orgánico utilizado anteriormente, para lavar y arrastrar todo el aceite recuperado.

Eliminar el disolvente orgánico calentando en baño de maría a una temperatura menor de 40°C.

Pesar el aceite obtenido, verterlo en vial color ámbar o cubrirlo con papel aluminio y almacenar a 4°C.

Determinar el porcentaje de rendimiento.

Lavar el destilador con suficiente etanol para dejarlo completamente limpio y evitar cualquier contaminación cruzada en la siguiente corrida (LIPRONAT, 2005).

Nota:

Disminuir la temperatura a partir de la obtención de aceite para evitar proyecciones o sobrecalentamiento.

No llenar demasiado el balón con material vegetal, si el material es muy denso, pesar menos cantidad de la indicada.

Asegurarse de mantener siempre conectado el refrigerante y si no se logra mantener la temperatura de enfriamiento añadir hielo a la solución que circula por el refrigerante (LIPRONAT, 2005).

6.4.3 Análisis Fisicoquímicos de Aceites

6.4.3.1 Determinación del Índice de Refracción

Poner en marcha el termostato para controlar la temperatura de los prismas a 20°C, descubrir la ventanilla de iluminación.

Limpiar la superficie de los prismas con un paño suave humedecido en alcohol puro.

Con una varilla de vidrio llevar dos gotas del aceite en la superficie de medición del prisma de modo que toda la superficie de medición quede cubierta con aceite una vez cerrado los prismas

Evitar tocar con los dedos la superficie de medición, así como el aceite.

Bajar el prisma de recubrimiento y apretarlo contra la superficie de medición, esperar un momento antes de proceder a la medición para que la temperatura se iguale, tanto del aceite como del prisma.

Dirigir la ventanilla que ilumina el prisma de recubrimiento en la dirección de la fuente de luz más intensa. Al efectuar mediciones con la luz transmitida, el espejo debe tapar el orificio del prisma refractométrico.

Hacer girar los botones y obtener una nítida, visible e incolora delimitación de los fondos claro y oscuro en el campo visual del ocular.

Haciendo girar el botón, llevar con precisión la línea límite exactamente hacia el centro de la cruz en la ventanilla superior del ocular.

La línea vertical en la ventanilla inferior del ocular indicará entonces el resultado de la medición sobre la escala del índice de refracción (España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

6.4.3.2 **Cromatografía de Gases**

Cromatógrafo de gases Agilent Technologies Modelo 6850 con detector FID; columna capilar Supelco 30 m x 0.25 mm d.i. recubierta con 5% fenil- 95% metilsiloxano de 0.25 μm espesor de película.

Temperatura del inyector, 220°C; línea de transferencia, 240°C; temperatura programada del horno, 60°C-246°C a 3°C/min; gas de arrastre N₂ a 34.96 cm³/s ó 1.02 mL/min.

Equilibrar la columna, la cámara de inyección y el detector a las temperaturas y caudales de los gases especificados hasta que se consiga una línea base estable.

Utilizar nitrógeno como fase móvil en el Agilent Technology 6850 network, Hewlett packard 5890 serie II.

Preparar la (s) disoluciones problema y la (s) disoluciones de referencia.

Pesar una gota del aceite a analizar en un vial limpio y seco.

Disolver utilizando 7 μL diclorometano. Inyectar 0.2 μL del aceite.

Las disoluciones deben estar exentas de partículas sólidas.

Comparar resultados con los estándares disponibles (España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

6.4.3.3 **Espectrometría de Masas**

Calibrar el equipo según las especificaciones del mismo.

Preparar las disoluciones necesarias para aceites, siendo los solventes indicados: éter de petróleo, benceno o alcohol.

Proceder a inyectar 1 μL del aceite a analizar, utilizando el detector 5970 series Mass Selective Detector (España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

6.4.4 Extractos y Tinturas

6.4.4.1 Extracción Fraccionada

Preparación de la planta:

Colocar la planta previamente molida dentro de un recipiente resistente al disolvente a utilizar.

Añadir la cantidad necesaria de disolvente para remojar la planta antes de colocarla en el percolador.

Dejar reposar 24hrs (LIPRONAT, 2005).

Preparación del percolador:

Lavar y secar el percolador a utilizar.

Colocar una tapa de algodón en la parte inferior del percolador.

Colocar sobre el algodón un pedazo de papel filtro en forma de cono.

Colocar dentro del percolador la planta molida y empapada según el paso anterior.

Agregar el mismo disolvente para completar volumen, diclorometano (disolvente apolar), el disolvente debe quedar 5 cm sobre la planta.

Agitar suavemente para acomodar la planta

Tapar el percolador y dejar reposar 24 hrs (LIPRONAT, 2005).

Recuperación y Concentración de la Tintura:

Abrir la llave del percolador con un goteo intermedio y recibir en un recipiente adecuado o directamente en el balón de concentración del evaporador rotatorio.

Colocar el balón de concentración en el evaporador rotatorio.

Marcar la temperatura y presión adecuadas según el disolvente que se está utilizando.

Accionar el evaporador rotatorio (ver metodología: Concentración mediante Evaporador Rotatorio), recuperar el disolvente y agregarlo de

nuevo al percolador, repetir el proceso anterior. Esto se conoce como fracción I.

Realizar dos veces este proceso o según se requiera en la investigación particular.

Si es una extracción exhaustiva se harán extracciones cuantas veces sea necesario hasta que el efluente obtenido sea incoloro, lo que indica que se ha agotado el material.

Destapar el percolador 24 horas para que se evapore el disolvente que haya quedado.

Agregar el segundo disolvente menos polar, etanol al 95%, y repetir el proceso anterior. Esto se conoce como fracción II.

Hacer de la misma forma con todos los disolventes a utilizar e ir enumerando las fracciones obtenidas (LIPRONAT, 2005).

6.4.4.2 **Tinturas**

Las tinturas suelen ser límpidas. En reposo, pueden formar un ligero sedimento, siempre que la composición de la tintura no se modifique significativamente. Si es necesario se filtran (LIPRONAT, 2005).

Extracción mediante percolación:

Si es necesario, reducir la droga vegetal en fragmentos de tamaño adecuado.

Mezclar uniformemente con una parte del etanol de 95% y dejar en reposo durante un tiempo aproximado de dos horas.

Transferir a un percolador y dejar que el percolado fluya lentamente a temperatura ambiente asegurando que la droga vegetal a extraer esté siempre cubierta por el resto del disolvente de extracción.

El residuo puede prensarse y el líquido exprimido reunirse con el percolado (LIPRONAT, 2005).

6.4.4.3 Concentración de Extractos mediante Evaporador Rotatorio

Procedimiento:

Verificar que estén conectadas todas las conexiones eléctricas.

Colocar el balón en el colector y fijarlo con la llave respectiva

Revisar el nivel de agua del baño de calentamiento.

Encender el baño y mantener la temperatura entre 40-50°C, dependiendo del equipo puede haber pérdidas de 10-20°C entre el baño de calentamiento y el interior del balón de evaporación, en todo caso el balón de evaporación no deberá tener una temperatura mayor de 40°C.

Revisar que la llave de alimentación del refrigerante este cerrada.

Colocar el balón con la muestra y sujetar al vástago con la llave correspondiente.

Encender el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada.

Conectar un sistema de enfriamiento o por lo menos de circulación de agua del chorro.

Encender la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación

Cuando haya iniciado la destilación, apagar la bomba de vacío

Encender la bomba de vacío cuantas veces sea necesario hasta que se haya agotado el disolvente del balón de evaporación o ya no destile ningún liquido, lo que querrá decir que el vacío de nuestra bomba no es suficiente para evaporar la mezcla de disolventes contenida en el balón de evaporación (LIPRONAT, 2005).

Preparación del extracto:

Tarar un cristalizador, limpio y seco, previamente calentado por una hora en el horno a 115°C.

Cubrir el cristalizador con papel aluminio para proteger de la luz.
Posterior a la concentración, verter el extracto en el cristalizador,
etiquetar y dejar el en la desecadora por 24 hrs.
Pesar y obtener el porcentaje de rendimiento (LIPRONAT, 2005).

Nota:

Condiciones estándar para la concentración de extractos:

Con diclorometano: 850 mbar a 40°C, 100rpm

Con etanol: 175 mbar a 40°C, 100 rpm

Cubrir de la luz el balón que posee el extracto, mientras éste gira en el evaporador rotatorio, esto si se desea realizar alguna prueba antioxidante (LIPRONAT, 2005).

6.4.4.4 **Residuo Seco de Extractos**

En una cápsula de fondo plano de aproximadamente 50mm de diámetro y aproximadamente 30mm de altura, introducir rápidamente 2.00g o 2.0ml del extracto a examinar.

Evaporar hasta sequedad sobre un baño de agua y secar en un horno a 100-105°C durante 3 horas. Dejar enfriar en un desecador sobre *pentóxido de difósforo R* o *gel de sílice anhidra R* y pesar.

Calcular el resultado como porcentaje M/M o en gramos por litro.

(España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

6.4.4.5 **Caracterización Fitoquímica**

Investigación de Alcaloides

Cromatografía en capa fina: Pesar 0.1g del extracto y disolver en 5ml de metanol, añadir 4 gotas de NH₄OH al 10%, calentar en baño de maría

hasta llegar a un volumen de 1ml aproximadamente, filtrar y aplicar 10 μ l de la muestra y 5 μ l del estándar de atropina y papaverina.

Fase Móvil: Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (35:10:5)

Detección: Sin tratamiento: UV 254 nm fluorescencia, UV 365 nm azul o amarillo fluorescente.

Dragendorff: Zonas cafés o naranjas en visible, los colores no son estables. (LIPRONAT, 2005).

Investigación de Saponinas

Cromatografía en Capa Fina: Pesar 0.1 g del extracto y agregarle 5 ml de etanol al 95%, calentar en baño de María hasta concentrar a un volumen de 2 a 3 ml aproximadamente, filtrar y aplicar 10 μ l de la muestra, 5 μ l de estándar Saponinas al 0.1%, ergosterol, β -sitofterol, stigasterol.

Fase Móvil: Cloroformo-metanol (95:5)

Detección:

-Anisaldehído-acido sulfúrico: zonas azules, violetas y amarillas, calentar a 100°C por 5 minutos.

-UV 254nm: zona color morado

- UV 365nm: zonas verdes, violetas (fluorescencia) (LIPRONAT, 2005).

Investigación de Flavonoides y Antocianinas

Cromatografía en Capa Fina: Pesar 0.1 g del extracto y agregarle 5 ml de etanol al 95%, calentar en baño de maría hasta concentrar a un volumen de 2 a 3 ml aproximadamente, filtrar y aplicar 10 μ l de la muestra, 5 μ l de estándar mezcla de quercetina-rutina; ácido clorogénico.

Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (50:5.5:5.5:13.5)

Detección:

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

Reactivo de Productos Naturales (NP:PEG). Fluorescencia intensa en UV-365nm. (LIPRONAT, 2005).

Investigación de aceites volátiles

Cromatografía en capa fina:

Pesar 0.1 g del extracto y disolver en 5ml de diclorometano, poner en baño de maría hasta llegar a sequedad, agregarle 1 ml de tolueno filtrar y aplicar 10µl de la muestra, 5µl de estándar 1,8-cineol, eugenol, terpineol.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (47:3)

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico, calentar en el horno a 100°C por 5 minutos y observar zonas azules verdes, rojas y cafés en visible. (LIPRONAT, 2005).

6.4.5 Actividad Biológica de Aceite Esencial y de Extractos etanólico y de diclorometano.

6.4.5.1 Evaluación de la Actividad Antioxidante

Método de Cromatografía en Capa Fina

Aplicar 10µL de muestra y del estándar antioxidante (beta-caroteno, Rutina, Quercetina) en una placa cromatográfica de silica gel 60F₂₅₄. Colocar la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con

acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (33.3:3.6:3.6:8.6).
Secar y asperjar con DPPH (1mg/mL en metanol).

Resultados:

Si los extractos presentan actividad antioxidante se observará la decoloración del DPPH en las bandas respectivas (LIPRONAT, 2005).

Determinación de la actividad antioxidante total por medio del reactivo de DPPH (Técnica Macrométrica)

Se prepara el extracto a ensayar pesando aproximadamente 0.1 g de extracto seco, luego se procede a diluirlo en 5 mL de metanol, y finalmente se agita vigorosamente hasta diluir completamente el extracto.

Preparación de reactivos:

Preparación de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH): pesar la cantidad exacta de 10.95mg de DPPH y en un balón aforar hasta 50ml con metanol.

Preparación de Buffer de Acetato:

En un balón aforado de 250 ml agregar 1.50g de Acetato de Sodio, añadir 100ml de agua destilada, luego agregar 15 gotas de Acido Acético Glaciar y aforar con agua destilada hasta 250ml.

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

la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Se prepara una serie de tubos que contienen los reactivos que se citan a continuación:

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

Los tubos preparados de esta forma se agitan en un vortex durante 30 segundos y luego se incuban a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se leen a una longitud de onda de 517nm. Siempre debe leerse la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo. Realizar este ensayo en duplicado (LIRPONAT, 2005).

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

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

Las mediciones de cada una de estas diluciones se realizan siguiendo el paso anterior en el que se cita como se preparan los tubos de reacción.

Cada dilución corresponde a una muestra. Realizar cada uno de los ensayos de las diluciones en duplicado.

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

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

Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del Blanco Control

Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del Blanco respectivo

Luego con los valores de % de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concertación aproximada (X) se procede a realizar la regresión lineal y calcular el valor de r^2 , el cual debe ser preferiblemente lo más cercano a 1 para tomar como válida la curva realizada, de lo contrario se deberá realizar nuevamente el ensayo, hasta obtener un valor de r^2 adecuado (LIPRONAT, 2005).

Realizar los siguientes cálculos para obtener la actividad antioxidante total:

Para extractos secos:

IC₅₀: 50 % - pendiente

Intercepto

6.4.5.2 Evaluación de la Actividad Inhibitoria de Acetilcolinesterasa por Cromatografía en Capa Fina

Procedimiento:

Preparar las soluciones de los extractos a evaluar a una concentración de 0.2g/10mL. Utilizar como disolvente etanol para los extractos etanólicos y metanol para los de diclorometano.

Utilizar vortex y el ultrasónico BRANSON para mejorar la solubilidad. Filtrar si es necesario.

Preparar la placa de sílica gel 60F₂₅₄ marcando con lápiz los puntos para cada extracto y los estándares, con 1cm de por medio.

Calentar la placa en el horno, antes de aplicar las muestras, a una temperatura de 100°C durante 30min.

Luego proceder a lavar la placa con acetona. Dejar secar.

Aplicar 10µl de los extractos y de los estándares. Utilizar galantamina, rivastigmina, 1,8cineol, escopoletina, pinocembrina como estándares de referencia.

Colocar la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con tolueno: acetato de etilo: metanol (30:8:1).

Luego sacar y dejar secar a temperatura ambiente.

Asperjar con acetiltiocolina (AChE) y dejar secar nuevamente a temperatura ambiente.

En una caja con tapadera colocar 5 tapones de hule, de tal manera que sobre ellos pueda colocarse la placa de sílica. Añadir agua suficiente dentro de la caja a manera de que no halla contacto con la placa.

Colocar la placa seca dentro de la caja, sobre los tapones de hule y sobre el agua, y colocarla en la incubadora durante 20 min a una temperatura de 37°C.

Preparar una solución de Fast Blue B y naftilo, la cual servirá para asperjar la placa, en una proporción de 5/2. Primero disolver la sal de

Fast Blue B en agua (100mg/40ml), para el naftilo utilizar 250 mg en etanol para 100ml. Luego mezclar en la proporción ya mencionada.

Asperjar con la mezcla preparada de Fast Blue y Naftilo.

Secar la placa utilizando una secadora (LIPRONAT, 2005).

Interpretación: Se observara un fondo purpura y la presencia de una coloración blanca en las bandas de la placa, las cuales indican actividad positiva (LIPRONAT, 2005).

6.4.5.3 **Evaluación de la actividad citotóxica contra *Artemia salina***

Preparación del agua del mar:

Disolver 35g de sal de mar en un litro de agua destilada.

Marcar en un vaso de precipitar el volumen de agua.

Hervir por 30 minutos y evaporar el agua hasta la marca.

Filtrar y refrigerar hasta el momento de su uso, es estable por un mes a temperatura de 6-8°C (LIPRONAT, 2005).

Cultivo de *Artemia salina*:

Colocar en un vaso de precipitar de 200mL del agua de mar y airear de 30 ó 60 minutos.

Colocar el agua en una pecera y agregar 40 mg de huevecillos en un área cerrada (lado oscuro).

Incubar por 48 horas a temperatura ambiente y luz artificial. Al eclosionar, los nauplios (larvas) pasaran al área abierta de la pecera (lado con luz) (LIPRONAT, 2005).

Determinación de la citotoxicidad:

Pesar 0.005g de extracto etanólico de *Litsea guatemalensis* y disolver en 2ml de agua de mar. Agregar por triplicado en un microplaca: 100µL del extracto disuelto + 100µL de agua de mar con 10-15 nauplios.

Control negativo: 100µL de agua de mar + 100µL de agua de mar con 10-15 nauplios.

Incubar a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.

Contar en el estereoscopio el número de nauplios muertos, agregar etanol a los pozos, esperar 15 minutos y contar de nuevo todos los nauplios. Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que retirarla de nuevo (LIPRONAT, 2005).

Interpretación: Se calcula el porcentaje de camarones muertos:

Sumar el número de camarones muertos en los tres pozos (X)

Sumar el número total de camarones en los tres pozos (Y)

Dividir X dentro de Y, multiplicarlos por 100

Si el porcentaje de camarones muertos es mayor del 50 por ciento, repetir la prueba utilizando de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL. Obtener los valores de X y Y en cada dosis y determinar el valor de la Concentración Letal Media (CL₅₀) con el programa de computadora Finney (BIOSTAT).

Si el porcentaje es menor al 50 por ciento la citotoxicidad es mayor de 1mg/mL (LIPRONAT, 2005).

6.4.5.4 Tamizaje de la Actividad Larvicida

Cultivo de larvas:

Colocar en un vaso de precipitar 200 ml del agua del chorro y dejar reposar por 48 horas.

Agregar unos 40mg de huevecillos de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*

Incubar por 24 horas a temperatura ambiente (LIPRONAT, 2005).

Determinación de la actividad larvicida:

Pesar 1 mg de extracto a ensayar y disolver con 1ml de agua de chorro reposada. (Puede prepararse más cantidad de la solución del extracto, siempre manteniendo la concentración 1:1).

En la microplaca agregar por triplicado: 100 microlitros del extracto disuelto y 100 microlitros del agua del chorro reposada con 10-15 larvas

Control negativo: 100 microlitros de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.

Incubar a temperatura ambiente (25-28°C) en un lugar oscuro durante 24 horas.

Contar en el estereoscopio el número de larvas muertas y determinar la CL₁₀₀ (concentración letal al 100%) (LIPRONAT, 2005).

6.4.5.5 Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

Disolución del extracto

En la balanza analítica pesar 30 mg de extracto a ensayar y disolverlo en 3 mL de etanol al 50% (hacer cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo).

Agitar en un vortex hasta que este bien disuelto. Si no se disuelve utilizar un sonicador. En el caso de extractos con disolventes apolares agregar 25uL de dimetilsulfoxido (DMSO).

Filtrar el extracto.

Filtración de extracto

Trabajar la filtración en la campana de flujo laminar (previamente limpia, ver PEO de limpieza de campana).

Aspirar el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 mL.

Desenroscar la aguja y enroscar en la jeringa el filtro de 0.45 μm de diámetro.

En un frasco estéril recibir el filtrado haciendo pasar la disolución del extracto por el filtro lentamente.

Preparación de Agar-Planta

Preparar tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar). Esterilizar a 121°C durante 15 min, dejar enfriar a 50°C.

En una caja de petri simple agregar 1.0 mL de la solución del extracto filtrado (este debe tener una concentración de 10 mg/mL) y los 9 mL de agar Mueller Hinton. Tapar la caja y homogenizar con movimientos circulares. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL.

Dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 h, para comprobar esterilidad.

Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

Preparación del inóculo

Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en una caja de petri con agar tripticasa soya, incubar 36°C durante 24 h.

Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, incubar a 36°C durante 24 h.

Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).

Demostración de la actividad antibacteriana

Inocular en las cajas con agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo. Dejar reposar durante 5-10 min e incubar a 36°C durante 24 h.

Utilizar como control negativo 9 mL de agar Muller Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%.

Interpretación de resultados

Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

Preparación de medio de cultivo

Preparar tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud.

Esterilizar durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 mL del extracto de la planta a probar (Dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL.

Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para chequear esterilidad.

Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

Preparación de inóculo

Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

Dextrosa 0.6 g

NaSO₄ 0.3 g

KH₂PO₄ 0.3 g

Peptona 0.3 g

Agar-agar 6.0 g.

Agregarlo a 300 mL de agua, disolver, verter 6 mL en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible. Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación.

Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).

Agregar a cada tubo 2 mL de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.

Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca. Agitar 1 minuto en agitador y hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.

Llevar la suspensión a 100 esporas/ μL = 1×10^5 esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

Inoculación de hongos filamentosos en placa

Abrir cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro. En forma equidistante.

Tomar 30 μL de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días.

Hacer un total de 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo.

Las cajas control constituyen cajas de agar Sabouraud (13.5 ml) con 1.5 ml de Alcohol al 70%. Es decir que llevan el mismo procedimiento que se emplea para realizar cajas de agar-planta solamente que en lugar de llevar la suspensión con el extracto, llevan etanol al 70%.

Lectura e interpretación de los resultados

Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.

Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.

Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

Preparación de medio de cultivo

Preparar tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.0 mL de extracto de la planta a probar (Dilución 1:10) Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL.

Verter en cajas de Petri estériles, dejar solidificar, e incubar a 36°C por 24 horas para chequear esterilidad.

Guardar en refrigeración hasta el momento de uso.

Preparación del inóculo

Sembrar la cepa en una caja con agar Sabouraud e incubar a 36°C por 48 horas.

Tomar un inóculo del cultivo fresco, sembrar en 5 mL de caldo Tripticasa Soya e incubar 24-48 horas. Tomar con una pipeta estéril 0.5 mL y suspender en 4.5 mL de solución salina estéril (dilución 1:10).

Inoculación de levaduras en placa

Inocular con asa la suspensión de levaduras en cada sección según plantilla.

Incubar a 36°C durante 48 horas

Para el control negativo, sembrar por estrías la levadura en una caja con agar Sabouraud.

Lectura e interpretación de los resultados

Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Preparación de Agar-Planta

Preparar tubos con 3.6, 3.8, 3.9, 4 mL de agar Mueller-Hinton.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y agregar la solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadriplate de la siguiente manera:

3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg/mL

3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/mL

3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/mL

Un cuadrante con 4.0 mL de agar como control negativo.

Dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.

Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

Preparación del inóculo

Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Muller Hinton inclinado, incubar 36°C durante 24 horas.

Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Trypticasa soya, incubar a 36°C durante 48 horas.

Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1: 100).

Demostración de la concentración inhibitoria mínima

Inocular tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja e incubar a 36°C por 24 horas. Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36°C durante 24 horas.

Interpretación de resultados

Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

6.5 Diseño del estudio

Se realizó un muestreo por conveniencia, ya que se colectó en dos lugares establecidos para la distribución de *Litsea guatemalensis*, a saber: Florencia y Cerro Alux.

6.5.1 Muestra: Las muestras que se trabajaron fueron colectadas en dos épocas del año (época húmeda y época seca), con un peso de 1 Kg de hojas frescas cada una.

6.5.2 Réplicas: Se realizaron tres repeticiones de *Litsea guatemalensis* de dos lugares, para los aceites y extractos.

6.5.3 Análisis de Resultados: El análisis de los datos se realizó de forma descriptiva.

6.5.3.1 Aceites: Para comparar entre lugares y épocas se realizó de forma descriptiva.

6.5.3.2 Pruebas Fisicoquímicas: Para comparar entre lugares y épocas, se realizó de forma descriptiva.

6.5.3.3 Pruebas Fitoquímicas: Se compararon entre lugares y épocas, y se realizó de forma descriptiva.

6.5.3.4 Actividad Biológica: Para la actividad antimicrobiana y actividad antioxidante se realizó a partir de los datos de concentración inhibitoria mínima; y para la actividad insecticida se realizó con concentración letal 100, la citotoxicidad se evaluó con concentración letal 50.

Utilizando el programa BIOSTAT probit.

7. RESULTADOS

Tabla No. 7.1: *Recolección e Identificación botánica de la materia vegetal*

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta recolectada	Cantidad de materia vegetal recolectada	Época	Procedencia	Coordenadas Geográficas
<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	Hojas	1.5 kg	Húmeda	Cerro Alux	N 14°36.580' W 90° 38.318' 2,222 m
<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	Hojas	1.5 Kg	Húmeda	Florencia	N 14°33.952' W 90° 40.752' 1,973 m
<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	Hojas	1.5 Kg	Seca	Cerro Alux	N 14°36.580' W 90° 38.318' 2,222 m
<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	Hojas	1.5 Kg	Seca	Florencia	N 14°33.952' W 90° 40.752' 1,973 m

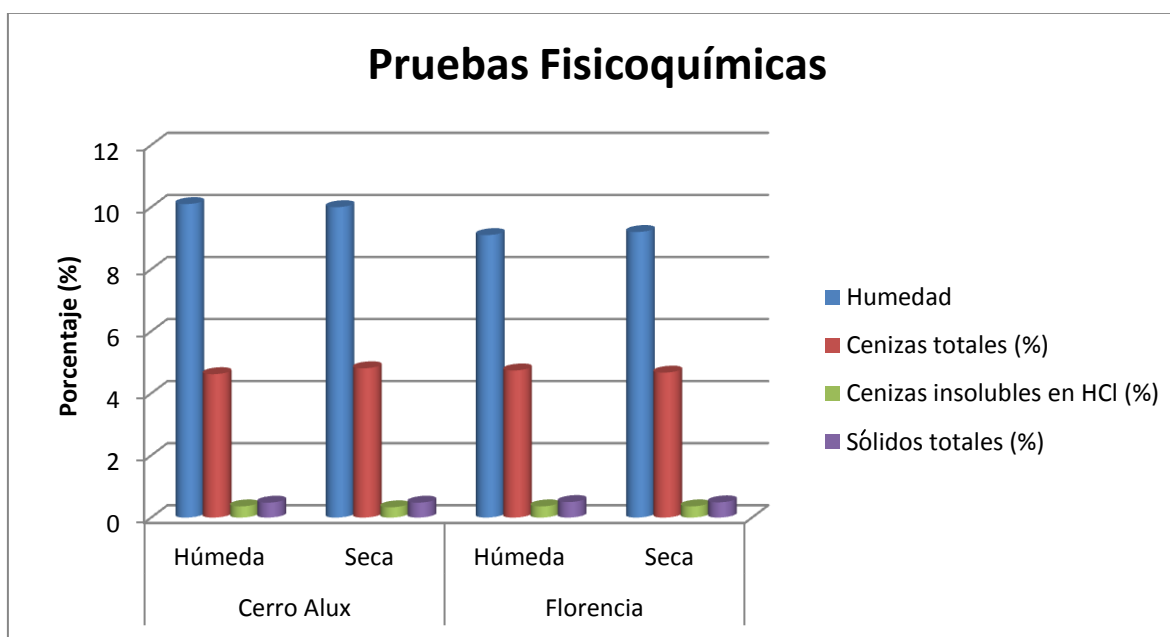
Fuente: Datos experimentales (Ver Anexo 12.1, 12.2)

Tabla No. 7.2: Pruebas fisicoquímicas realizadas en la materia vegetal

Lugar	Época	Humedad	Cenizas totales (%)	Cenizas insolubles en HCl (%)	Prueba de Mejor Solvente	
					Sólidos totales (%)	Mejor solvente de extracción
Cerro Alux	Húmeda	10.1	4.62 ± 0.06	0.36 ± 0.06	0.48	Etanol 95%
	Seca	10.0	4.81 ± 0.07	0.33 ± 0.04	0.48	Etanol 95%
Florencia	Húmeda	9.1	4.74 ± 0.01	0.36 ± 0.15	0.50	Etanol 95%
	Seca	9.2	4.67 ± 0.16	0.36 ± 0.07	0.49	Etanol 95%

Fuente: Datos experimentales

Gráfica No. 7.1: Comparación de Pruebas fisicoquímicas realizadas en la materia vegetal



Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.3: *Determinación de minerales en material vegetal*

Elemento	Época Húmeda		Época Seca	
	Cerro Alux	Florencia	Cerro Alux	Florencia
Potasio (K)	Presente	Presente	Presente	Presente
Calcio (Ca)	Presente	Presente	Presente	Presente
Hierro (Fe)	Presente	Presente	Presente	Presente
Zinc (Zn)	Presente	Presente	Presente	Presente
Estroncio (Sr)	Presente	Presente	Presente	Presente
Azufre (S)	Ausente	Ausente	Presente	Presente
Manganeso (Mn)	Ausente	Ausente	Presente	Presente

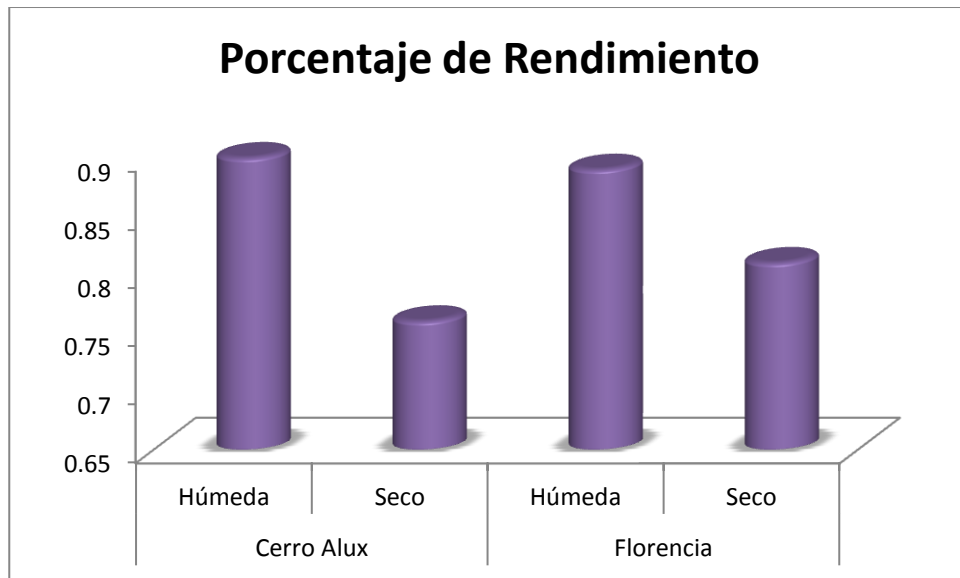
Fuente: Datos experimentales (Ver Anexo 12.3, 12.4, 12.5, 12.6)

Tabla No. 7.4: *Extracción de Aceite Esencial por Neoclevenger*

Lugar	Época	Rendimiento (%)
Cerro Alux	Húmeda	0.90 ± 0.08
	Seca	0.76 ± 0.09
Florencia	Húmeda	0.89 ± 0.04
	Seca	0.81 ± 0.09

Fuente: Datos experimentales

Gráfica No. 7.2: *Comparación del rendimiento de Extracción de Aceite Esencial por Neoclevenger*



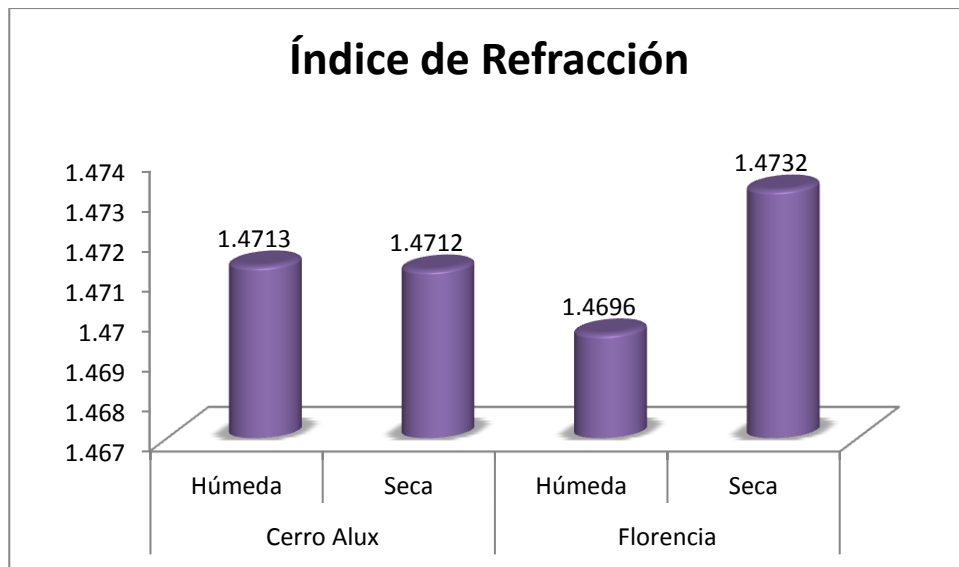
Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.5: Índice de refracción del aceite esencial

Lugar	Época	Temperatura (°C)	Índice
Cerro Alux	Húmeda	20	1.1274
	Seca	20	1.1274
Florencia	Húmeda	20	1.1176
	Seca	20	1.1246

Fuente: Datos experimentales

Grafica No. 7.3: Comparación del Índice de refracción del aceite esencial



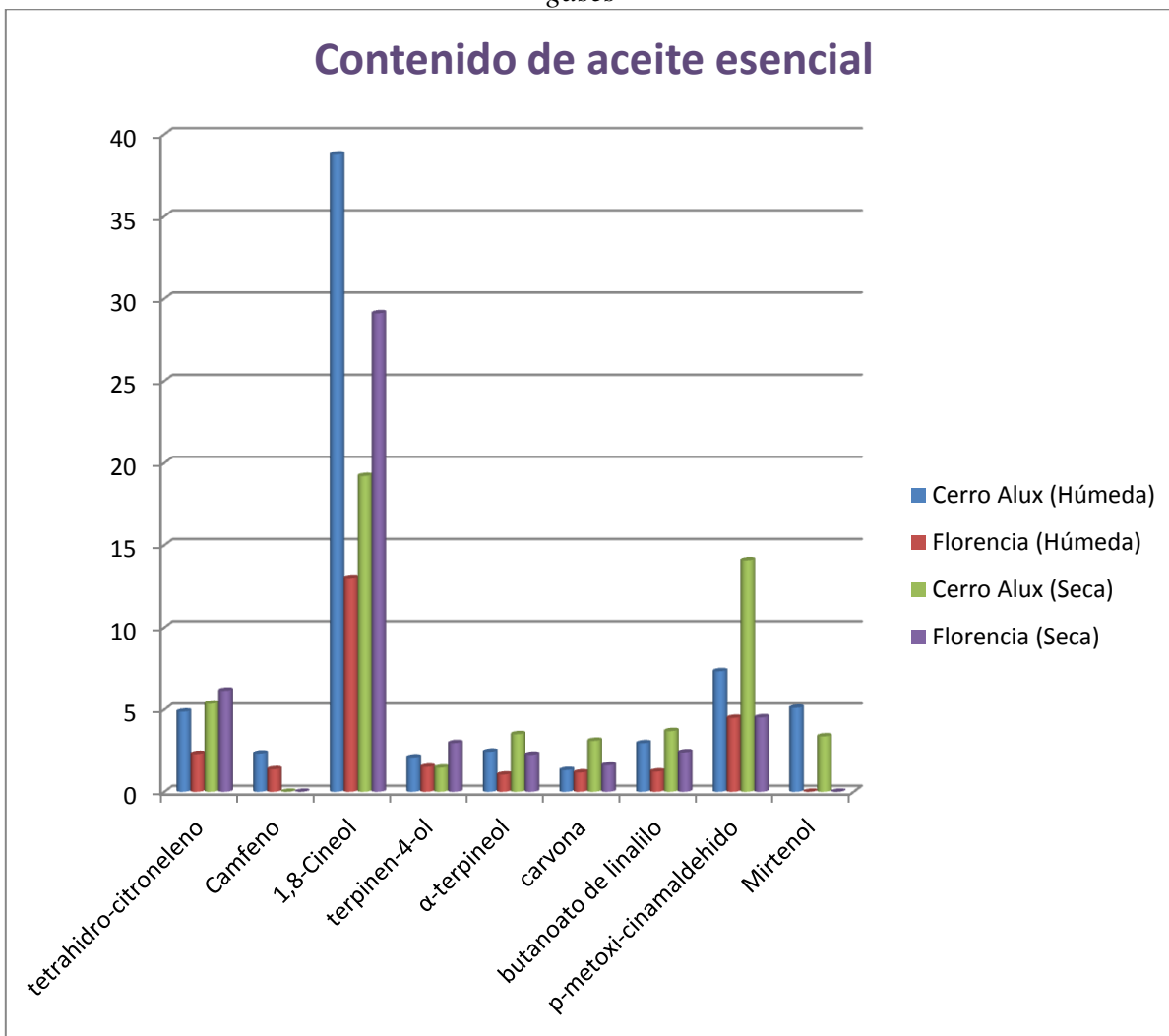
Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.6: Porcentaje de contenido del aceite esencial por cromatografía de gases

Compuesto	Índice de retención	Época Húmeda				Época Seca			
		Cerro Alux		Florencia		Cerro Alux		Florencia	
		Tiempo de retención (min)	Porcentaje	Tiempo de retención (min)	Porcentaje	Tiempo de retención (min)	Porcentaje	Tiempo de retención (min)	Porcentaje
tetrahidro-citroneleno	937	6.659	4.87773	6.672	2.30076	6.513	5.36482	6.505	6.15275
Camfeno	953	7.095	2.32853	7.107	1.36871	--	--	--	--
1,8-Cineol	1031	9.997	38.76996	9.960	13.01205	9.665	19.21112	9.663	29.11312
terpinen-4-ol	1177	15.512	2.08856	15.551	1.51623	15.722	1.46615	15.723	6.15275
α -terpineol	1189	16.017	2.43484	16.038	1.04621	16.310	3.50715	16.309	2.25351
carvona	1243	18.937	1.32246	18.978	1.17060	18.638	3.10092	18.645	1.61686
butanoato de linalilo	1423	26.993	2.95274	27.002	1.22887	26.629	3.69269	26.631	2.40024
p-metoxi-cinamaldehído	1564	33.080	7.33074	33.155	4.49511	32.627	14.08692	32.611	4.52718
β - pineno	976	7.968	2.40662	--	--	7.806	2.38868	7.798	2.85064
p-cimeno	1025	9.311	1.17937	--	--	--	--	--	--
γ -terpineno	1060	10.927	2.49453	--	--	10.697	1.41916	10.694	2.5051
Tetrahidro-linalool	1099	12.110	1.00379	--	--	12.330	17.38471	12.326	16.70238
β -citroneleno	950	--	--	--	--	6.952	3.22384	6.944	3.40616
limoneno	1029	--	--	--	--	9.570	10.31602	9.569	15.64805
δ -terpineol	1166	--	--	--	--	15.234	2.9929	--	--
mirtenol	1196	16.663	5.10900	--	--	16.533	3.37096	--	--
longiborneol	1599	--	--	--	--	33.956	1.43842	--	--
α -terpineno	1017	--	--	--	--	9.121	--	9.115	1.04923
cis-sesquisabineno hidrato	1544	--	--	--	--	31.790	1.26873	--	--

Fuente: Datos experimentales (Ver Anexo 12.7, 12.8, 12.9, 12.10)

Grafica No. 7.4: Comparación del contenido de aceite esencial por cromatografía de gases



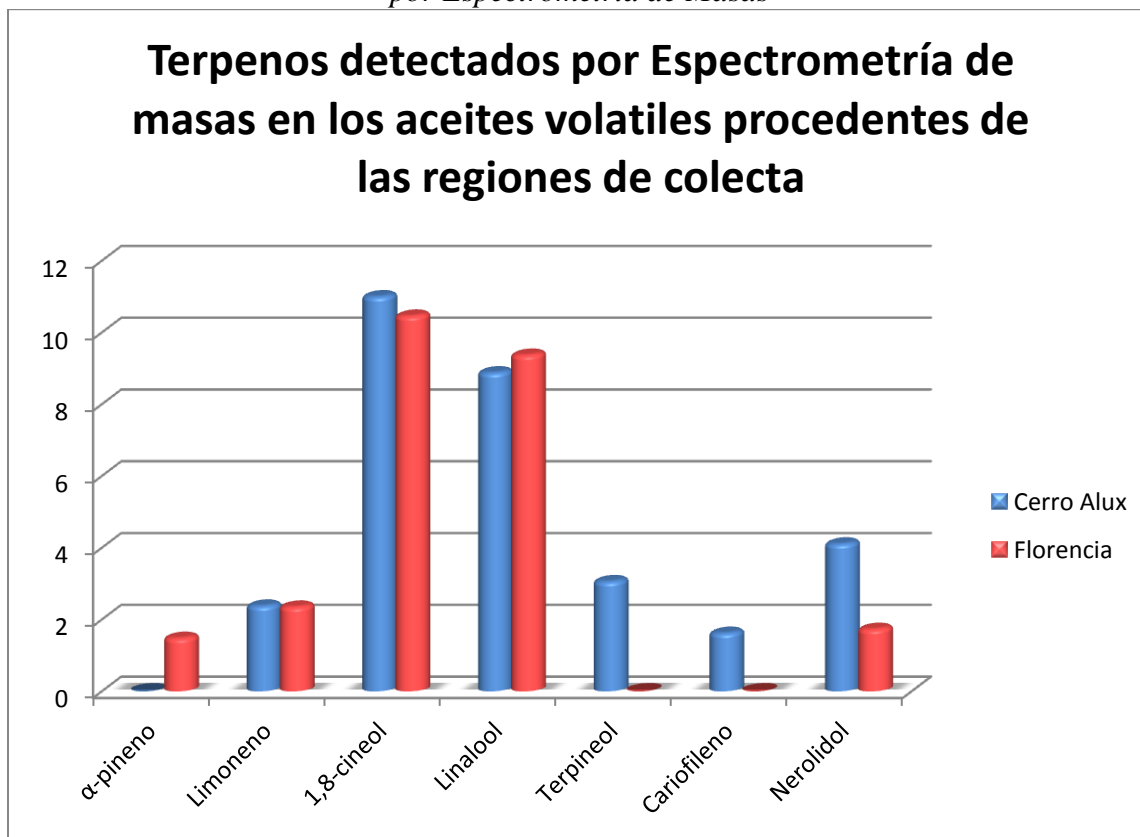
Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.7: Evaluación del aceite esencial por Espectrometría de masas

COMPUESTO	Cerro Alux		Florencia	
	Tiempo de Retención	Porcentaje	Tiempo de Retención	Porcentaje
α -pineno	-	-	6.32	1.48
Limoneno	8.87	2.38	8.85	2.35
1,8-cineol	8.97	11.00	8.95	10.46
Linalool	10.67	8.88	10.65	9.37
Terpineol	13.22	3.06	-	-
Cariofileno	18.83	1.62	-	-
Nerolidol	21.49	4.11	21.50	1.73

Fuente: Datos experimentales (Ver Anexos 12.11, 12.12)

Grafica No. 7.5: Comparación del contenido de compuestos en el aceite esencial por Espectrometría de Masas



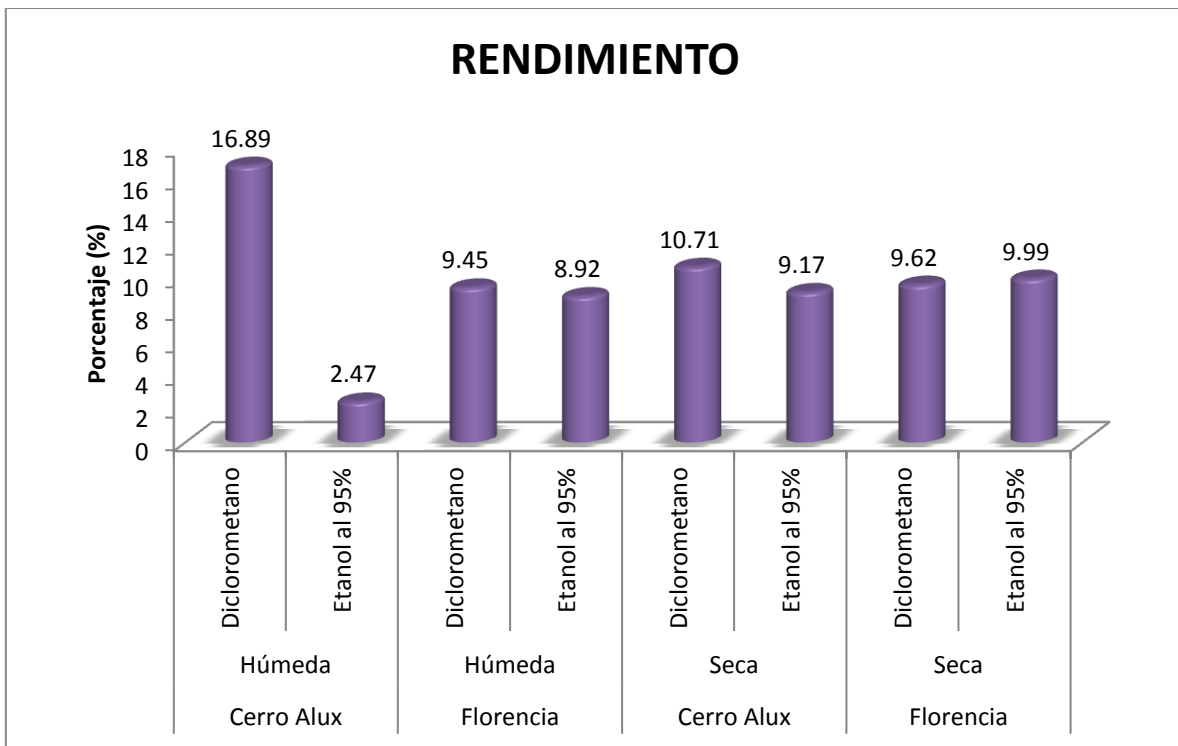
Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.8: Concentración mediante evaporador rotatorio y obtención de extractos

Lugar	Época	Solvente	Rendimiento (%)
Cerro Alux	Húmeda	Diclorometano	16.89
		Etanol al 95%	2.47
Florencia	Húmeda	Diclorometano	9.45
		Etanol al 95%	8.92
Cerro Alux	Seca	Diclorometano	10.71
		Etanol al 95%	9.17
Florencia	Seca	Diclorometano	9.62
		Etanol al 95%	9.99

Fuente: Datos experimentales

Gráfica No. 7.6: Comparación del porcentaje de rendimiento en la obtención de extractos, mediante evaporador rotatorio



Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.9: *Determinación fitoquímica de extractos etanólico y diclorometanico por cromatografía de capa fina (CCF)*

Lugar	Época	Alcaloides	Saponinas	Flavonoides	Cumarinas	Aceites volátiles
Cerro Alux	Húmeda	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Seca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Florencia	Húmeda	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Seca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Fuente: Datos experimentales (Ver Anexo 12.13, 12.14, 12.15)

Tabla No. 7.10: *Evaluación de la actividad antioxidante en extractos etanólico y diclorometanico y aceite esencial por cromatografía de capa fina*

Lugar	Época	Extracto	Aceite
Cerro Alux	Húmeda	Positivo	Positivo
	Seca	Positivo	Positivo
Florencia	Húmeda	Positivo	Positivo
	Seca	Positivo	Positivo

Fuente: Datos experimentales (Ver Anexo 12.16, 12.17)

Tabla No.7. 11: *Determinación de actividad anticolinesterasa en extractos etanólico y diclorometanico y aceite esencial por cromatografía de capa fina*

Lugar	Época	Extracto	Aceite
Cerro Alux	Húmeda	Positivo	Positivo
	Seca	Positivo	Positivo
Florencia	Húmeda	Positivo	Positivo
	Seca	Positivo	Positivo

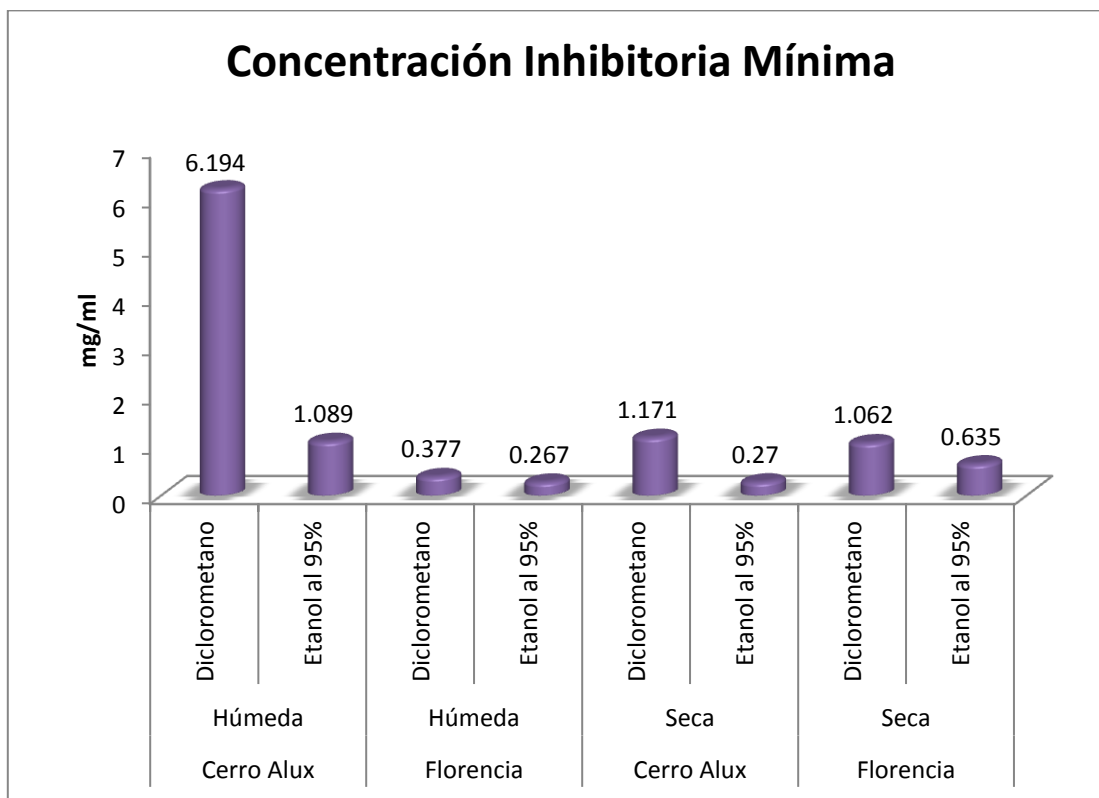
Fuente: Datos experimentales (Ver Anexo 12.18)

Tabla No.7. 12: Concentración inhibitoria mínima de la actividad antioxidante total por el reactivo de DPPH (Ensayo Macrométrico)

Lugar	Época	Solvente	[mg/ml]	Valor Max.*	Valor Min.*
Cerro Alux	Húmeda	Diclorometano	6.194	8.246	4.142
		Etanol al 95%	1.089	3.141	-0.963
Florencia	Húmeda	Diclorometano	0.377	2.429	-1.675
		Etanol al 95%	0.267	2.319	-1.785
Cerro Alux	Seca	Diclorometano	1.171	3.223	-0.881
		Etanol al 95%	0.270	2.322	-1.782
Florencia	Seca	Diclorometano	1.062	3.114	-0.990
		Etanol al 95%	0.635	2.687	-1.417
Vitamina "C", Estándar			0.013	--	--

Fuente: Datos experimentales (Ver Anexo 12.19-12.26)

Grafica No. 7.7: Concentración inhibitoria mínima de la actividad antioxidante total en extractos



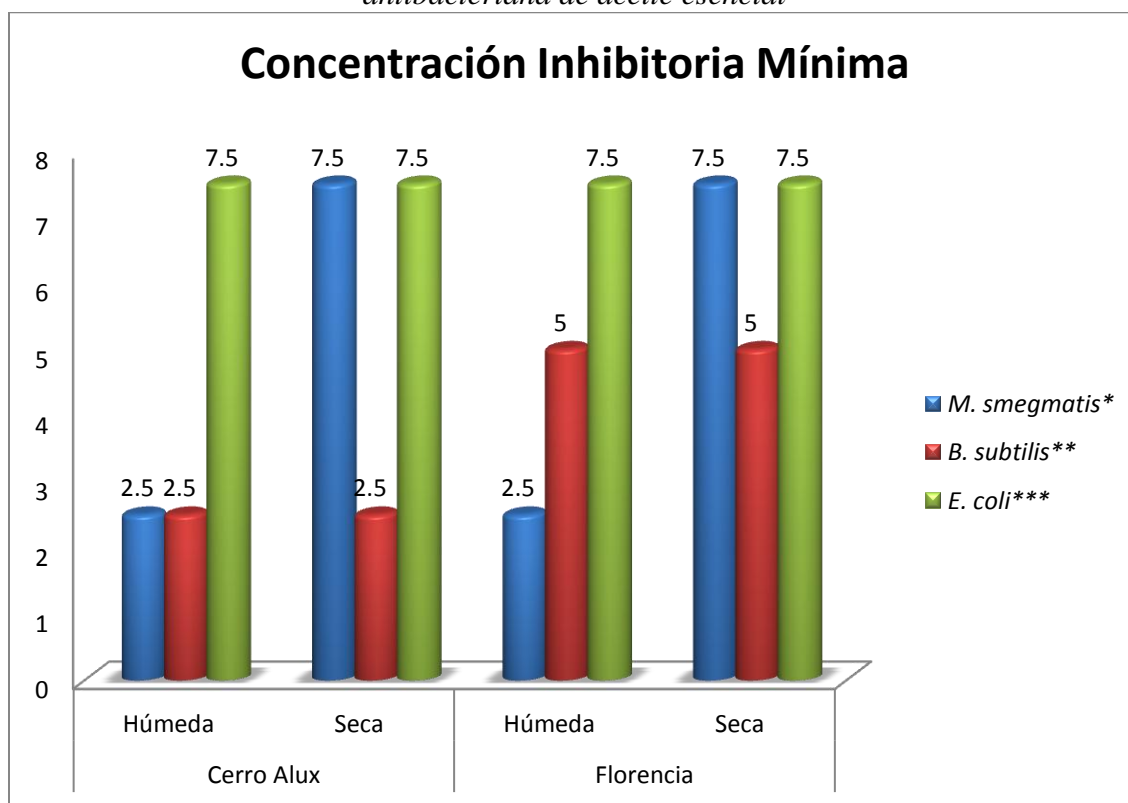
Fuente: Datos experimentales

Tabla No.7. 13: Actividad antibacteriana: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de aceite esencial

Concentración Inhibitoria Mínima [µg/ml]				
Lugar	Época	<i>M. smegmatis</i> *	<i>B. subtilis</i> **	<i>E. coli</i> ***
Cerro Alux	Húmeda	2.5	2.5	7.5
	Seca	7.5	2.5	7.5
Florencia	Húmeda	2.5	5.0	7.5
	Seca	7.5	5.0	7.5
Control	Eritromicina	15	15	15
	Vancomicina	30	30	-

Fuente: Datos experimentales **Mycobacterium smegmatis*, ** *Bacillus subtilis**** *Escherichia coli* (Ver anexo 12.33, 12.35)

Grafica No. 7.8: Comparación de la concentración inhibitoria mínima de la actividad antibacteriana de aceite esencial



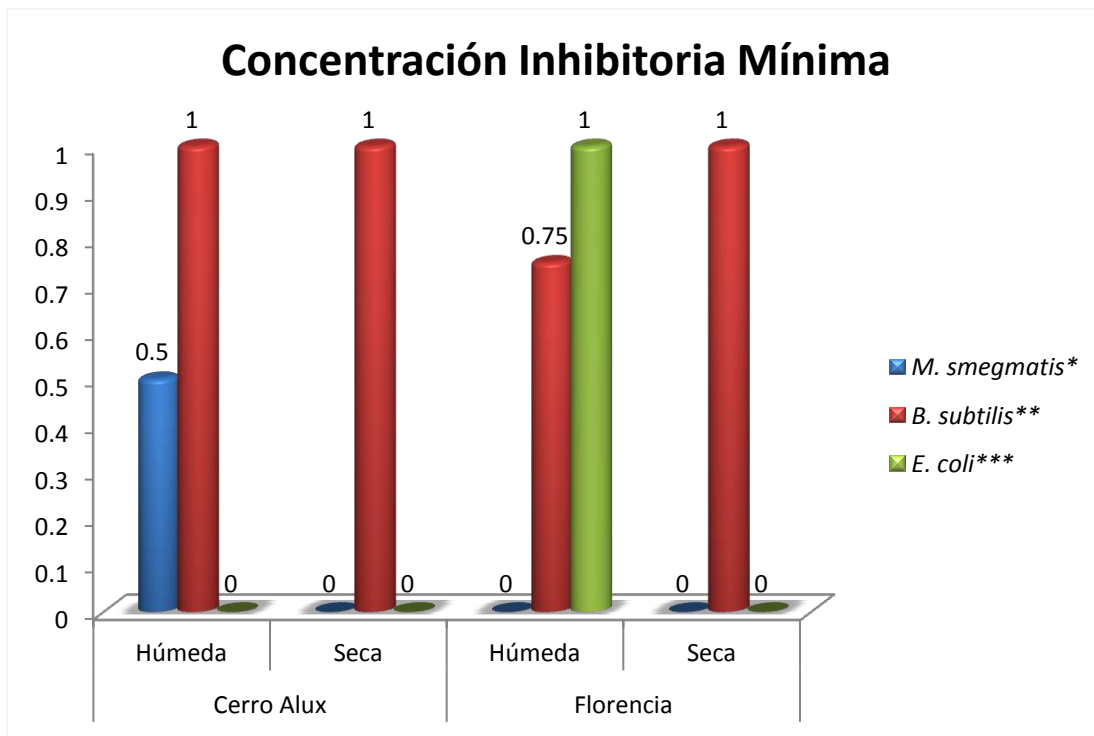
Fuente: Datos experimentales **Mycobacterium smegmatis*, ** *Bacillus subtilis**** *Escherichia coli*

Tabla No.7.14: Actividad antibacteriana: Concentración inhibitoria mínima del extracto de diclorometano

Concentración Inhibitoria Mínima [mg/ml]				
Lugar	Época	<i>M. smegmatis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Cerro Alux	Húmeda	0.5	1.0	-
	Seca	-	1.0	-
Florencia	Húmeda	-	0.75	1.0
	Seca	-	1.0	-
Control	Eritromicina	0.015	0.015	0.015
	Vancomicina	0.03	0.03	-

Fuente: Datos experimentales. **Mycobacterium smegmatis*, ** *Bacillus subtilis**** *Escherichia coli*. (Ver Anexo 12.27, 12.31)

Grafica No. 7.9: Actividad antibacteriana: Comparación de la concentración inhibitoria mínima de la de extractos de diclorometano



Fuente: Datos experimentales. **Mycobacterium smegmatis*, ** *Bacillus subtilis**** *Escherichia coli*

Tabla No.7. 15: *Actividad antibacteriana: Concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico*

Concentración Inhibitoria Mínima [mg/ml]		
Lugar	Época	<i>B. subtilis</i> *
Florencia	Seca	2.5

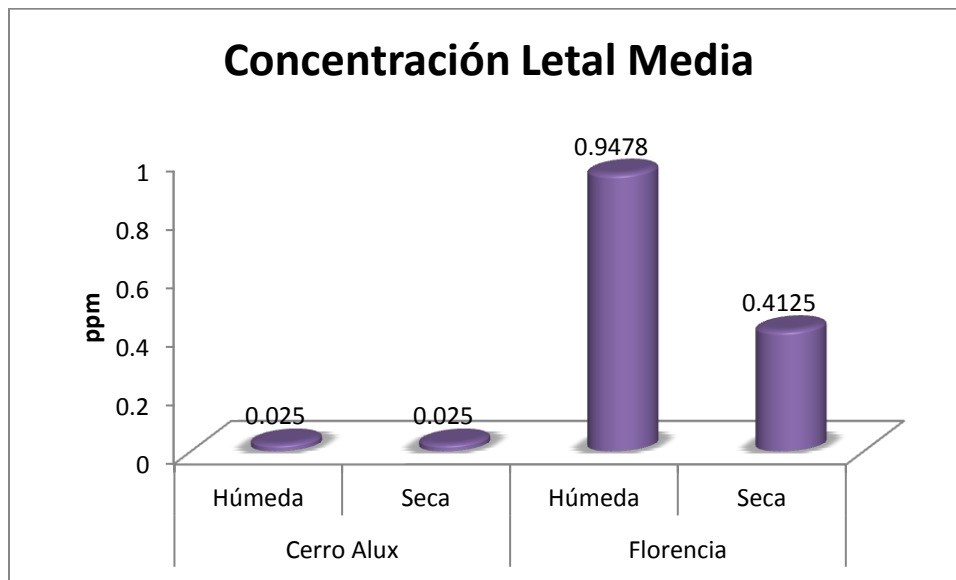
Fuente: Datos experimentales. **Bacillus subtilis* (Ver Anexos 12.29)

Tabla No. 7.16: *Actividad citotóxica de aceite esencial contra Artemia salina, concentración letal media CL₅₀*

Lugar	Época	CL ₅₀ * (ppm)
Cerro Alux	Húmeda	0.025
	Seca	0.025
Florencia	Húmeda	0.947
	Seca	0.412

Fuente: Datos experimentales. *Concentración letal media (Ver Anexo 12.36, 12.37, 12.38, 12.39)

Grafica No. 7.10: *Comparación de la concentración letal media (CL₅₀) para la actividad citotóxica de aceite esencial contra Artemia salina.*



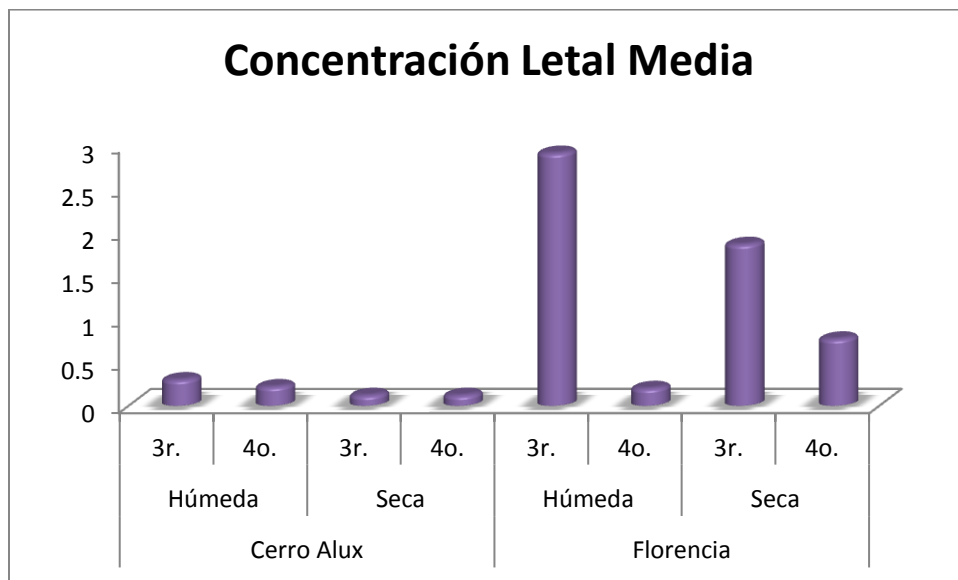
Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.17: Concentración letal media (CL_{50}) del aceite esencial contra *Anopheles albimanus*

Lugar	Época	Estadío	CL_{50} (ppm)
Cerro Alux	Húmeda	3r.	0.30
		4o.	0.22
	Seca	3r.	0.12
		4o.	0.12
Florencia	Húmeda	3r.	2.91
		4o.	0.20
	Seca	3r.	1.86
		4o.	0.77
Temephos Estándar		3r.	0.0001
		4o.	No aplica

Fuente: Datos experimentales. (Ver anexo 12.42-12.57)

Grafica No. 7.11: Comparación de la concentración letal media del aceite esencial contra *Anopheles albimanus*



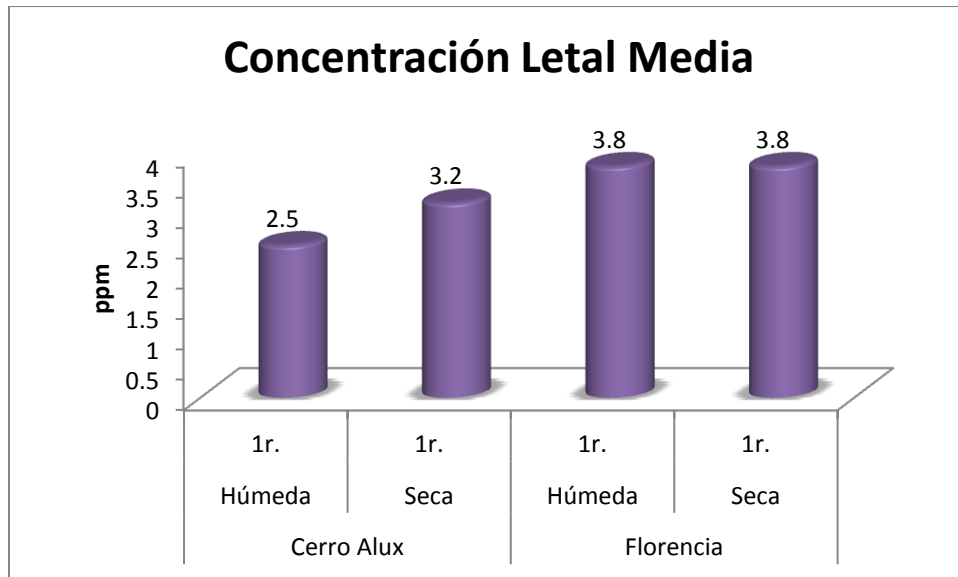
Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.18: Actividad larvicida: concentración letal media (CL_{50}) de aceite esencial contra *Aedes aegypti*

Lugar	Época	Estadio	CL_{50} (ppm)
Cerro Alux	Húmeda	1r.	2.5
	Seca	1r.	3.2
Florencia	Húmeda	1r.	3.8
	Seca	1r.	3.8

Fuente: Datos experimentales. (Ver anexo 12.58-12.65)

Grafica No. 7.12: Comparación de la concentración letal media del aceite esencial contra *Aedes aegypti*



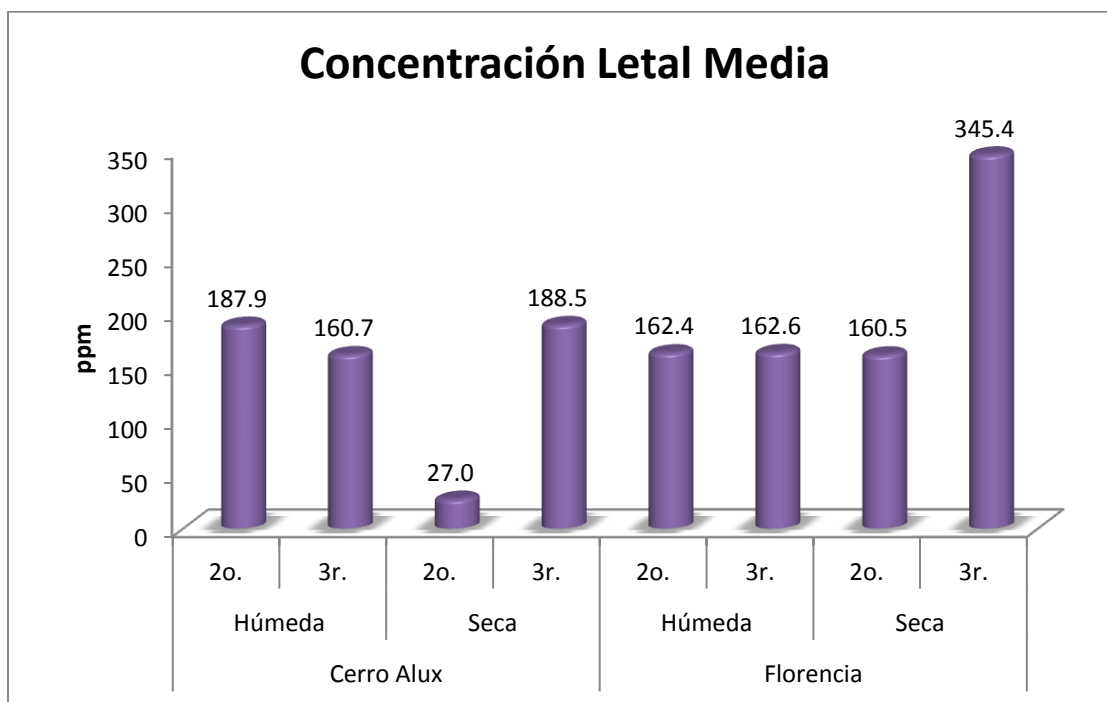
Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.19: *Actividad larvicida: Concentración letal media (CL₅₀) del extracto diclorometano contra Anopheles albimanus*

Lugar	Época	Estadio	DL50 (ppm)
Cerro Alux	Húmeda	2o.	187.9
		3r.	160.7
	Seca	2o.	27.0
		3r.	188.5
Florencia	Húmeda	2o.	162.4
		3r.	162.6
	Seca	2o.	160.5
		3r.	345.4
Control	Temephos Estándar	2°.	0.0001
		3r.	0.0001

Fuente: Datos experimentales. (Ver Anexo 12.66-12.81)

Grafica No. 7.13: *Comparación de la concentración letal media del extracto diclorometano contra Anopheles albimanus*



Fuente: Datos experimentales

Tabla No. 7.20: *Ficha técnica de calidad*

	Prueba	Especificación
Droga vegetal		
Caracteres organolépticos	Olor	característico
	Color	verde grisáceo
Caracteres Macroscópicos	Humedad	Menor al 10%
	Cenizas totales	4.71% ± 0.072
	Cenizas insolubles en HCL	0.3525% ± 0.012
Metabolitos Secundarios Presentes	Alcaloides	Positivo
	Saponinas	Positivo
	Cumarinas	Positivo
	Flavonoides	Positivo
	Aceites volátiles	Positivo
Caracteres Fisicoquímicos	Minerales	Potasio (K) Calcio (Ca) Hierro (Fe) Zinc (Zn) Estroncio (Sr)
Aceite esencial		
Caracteres organolépticos	Olor	característico
	Color	Amarillo translucido
Caracteres Fisicoquímicos	Porcentaje de aceite esencial	0.84% ± 0.058
	Índice de refracción	1.1240 a 20°C
Componente Mayoritario	1,8- Cineol	25.027 ± 9.79

Fuente: Datos experimentales

8. DISCUSIÓN

Se realizó la recolección e identificación botánica de *Litsea guatemalensis* partiendo de 2 puntos; Cerro Alux y Florencia; realizando la primera colecta en septiembre, época húmeda, y durante la época seca en el mes de marzo.

La tabla 7.1 resume los datos generales sobre la recolección e identificación botánica de *Litsea guatemalensis*. Las coordenadas geográficas fueron tomadas en los distintos puntos de colecta, para que las muestras fueran lo más cercanamente posible dentro de la región establecida y en los puntos de referencia implantados pero en diferente época; de esta manera se homogenizó la muestra. En el Cerro Alux las coordenadas geográficas fueron N14°36.580' W90°38.318' 2,222m. El área se caracteriza por un bosque latifoliado muy húmedo, con helechos, ariligas, musgos, melastomataga. La especie es un árbol con tronco principal, de 5 a 6 m, hojas muy suaves, poca exposición a la luz, lo cubren árboles más grandes.

En Florencia las coordenadas geográficas fueron N14°33.952' W90°40.752' 1,973m. Se trata de un bosque de encino, latifoliado, con poca humedad. Arbusto de 3 m de alto, no presenta tallo central, poca exposición a la luz debido al follaje de encino, se encuentra ubicado en pendiente.

Después de realizada la colecta de 1.5 kg de *Litsea guatemalensis* en los distintos puntos establecidos, se procedió a secar el material vegetal y realizar la molienda para realizar las pruebas fisicoquímicas, que se observan en la tabla 7.2.

El porcentaje de humedad residual es un parámetro que no debe ser mayor al 10 % y se entiende como la cantidad de agua libre que contiene el material vegetal para su buena conservación, ya que si es mayor a este límite, los principios activos pueden sufrir degradación por medio de hidrólisis, además de favorecer el crecimiento de microorganismos. Las muestras evaluadas se encontraron en el rango permitido. Cenizas totales es un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de

calcinar la materia orgánica y es una medida del contenido mineral total. Este parámetro indica el contenido de minerales, metales pesados, arcilla y material orgánico presentes en la muestra vegetal, lo cual es importante para obtener una idea general de la calidad de la muestra. Este parámetro no debe sobrepasar el 5%. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el material vegetal no sobrepasa los límites establecidos (ver tabla 7.2). Se determinó como mejor disolvente de extracción al etanol 95%, debido a que el resultado de sólidos totales es de una media de 0.48%, esto indica que dicho solvente extrae la mayor parte de residuos de material después de que se evapora la muestra. La grafica 7.1, presenta la comparación de pruebas fisicoquímicas realizadas en la materia vegetal de *Litsea guatemalensis*. Se observa que las muestras recolectadas en Cerro Alux y Florencia, tanto en época húmeda como seca; no presentaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros fisicoquímicos evaluados (sólidos totales, cenizas totales, cenizas insolubles en HCl y humedad).

Los suelos constan de muchos componentes, entre ellos materia mineral y orgánica, agua y aire, que generalmente yacen en un fino estado de subdivisión e íntimamente mezclados. Junto con las sales disueltas, el agua del suelo forma la solución del suelo, importante como medio para abastecer de principios nutritivos a las plantas que en él se desarrollan (Buckman Harry O. & Nyle C. Brady. 1970). Existe un intercambio constante de principios nutritivos entre los sólidos y la solución del suelo, y, a su vez, entre ésta y las plantas. Estos cambios están influenciados gradualmente por la concentración de sales en la disolución, la cual, a su vez, es determinada por las sales totales en el suelo y por el contenido de agua (Buckman Harry O. & Nyle C. Brady. 1970). Ordinariamente, del 94 al 95% de los tejidos de las plantas frescas están constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno, y sólo de un 0.54 y hasta quizá un 5 ó 6 % es de los constituyentes del suelo. A pesar de esto, son los elementos nutritivos obtenidos del suelo lo que comúnmente limitan el desarrollo de los cultivos. Los elementos usados en cantidades relativamente grandes son considerados como macronutrientes, estos pueden ser provenientes del aire y del agua: carbono, hidrogeno, oxígeno, o provenientes del suelo: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Por otra parte, los micronutrientes, son usados en cantidades relativamente pequeñas, entre estos: hierro, manganeso, boro, molibdeno, cobre, zinc y

cloro, siendo ambos grupos vitales en el desarrollo óptimo de las plantas (Buckman Harry O. & Nyle C. Brady. 1970).

El análisis de minerales en la droga vegetal, por medio de Fluorescencia de Rayos X evidencia la presencia de algunos minerales nutritivos obtenidos comúnmente del suelo y que, como se mencionó anteriormente, son parte importante en el desarrollo de las plantas. La Tabla 7.3 muestra la presencia de potasio, calcio, hierro, zinc, estroncio, presentes en ambas épocas y ambos lugares de colecta. Puede observarse la ausencia de azufre y manganeso durante la época húmeda en ambos lugares de colecta.

Un análisis químico de suelos superficiales típicos de una región húmeda y de una parda de región árida, respectivamente, muestra que los suelos de las regiones áridas son, en general, más altas en todos los constituyentes importantes, a excepción de materia orgánica y nitrógeno (Buckman Harry O. & Nyle C. Brady. 1970). El patrón anterior puede relacionarse con los resultados obtenidos, puesto que es durante la época seca en donde se observa la presencia de todos los minerales analizados por Rayos X, a diferencia de la época húmeda en donde se observa la ausencia de azufre y manganeso (Ver Tabla 7.3). Así mismo, en las tierras pardas áridas hay altos porcentajes en las formas de azufre, magnesio, calcio y potasio (Buckman Harry O. & Nyle C. Brady. 1970). El estudio descriptivo de los minerales no evidencia el porcentaje de los mismos en la materia vegetal, sin embargo, puede determinarse claramente la presencia de azufre durante la época seca y la ausencia del mismo durante la época húmeda, de acuerdo a lo anterior.

El aceite esencial constituye la fracción volátil de estudio en plantas aromáticas y medicinales, compuestas por terpenos y derivados, derivados del benceno y otros. La tabla 7.4 y la gráfica 7.2 evidencia que el aceite esencial tiene mayor rendimiento en la época húmeda ($0.90\% \pm 0.06$) que en la época seca ($0.79\% \pm 0.09$), esto se debe a que en la época seca las altas temperaturas logran volatilizar estos componentes perdiendo de esta manera cierto porcentaje en las hojas. Se determinó el índice de refracción que es la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. Es valioso en la identificación de sustancias y en la detección de impurezas (España. Ministerio de Sanidad

y Consumo, 2002). La tabla 7.5 se muestra que el aceite esencial obtenido tiene un índice de refracción promedio de 1.1274 a 20 °C. La grafica 7.3, permite comparar los distintos índices de refracción que presenta el aceite obtenido en los distintos lugares de colecta y épocas. Los aceites esenciales están formados en su mayoría por terpenos, fenilpropanos y compuestos alifáticos de bajo peso molecular. Para la identificación de estos componentes mayoritarios de los aceites esenciales se utilizó la cromatografía de gases (CG), por comparación de los tiempos de retención de los picos eluidos con los patrones puros y con datos bibliográficos. Como se muestra en la tabla 7.6, las cuatro muestras de *Litsea guatemalensis* contienen tetrahidro-citroneleno; 1,8-cineol; terpinen-4-ol; α -terpineol; carvona; butanoato de linalilo; p-metoxi-cinamaldehido. Estos siete compuestos presentan diferentes porcentajes, que dependen del lugar y la época de colecta, lo cual se observa en la gráfica 7.4. En la época húmeda se detecta mayor cantidad de terpenos: trece en el aceite obtenido de las muestras colectadas en Cerro Alux; mientras que el aceite obtenido de Florencia presenta ocho, teniéndolos en común en ambos puntos de colecta. El aceite obtenido en la época seca de Cerro Alux sigue presentando un mayor porcentaje de compuestos y en este caso presenta dieciséis compuestos, el aceite esencial obtenido de la muestra colectada de Florencia presenta catorce compuestos, teniendo en común trece de ellos. Sin embargo entre épocas, la seca presenta una mayor cantidad de compuestos (tetrahidro-citroneleno, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, α -terpineol, carvona, butanoato de linalino, p-metoxi-cinamaldehido, β -pineno, γ -terpineno, tetrahidro-linalool, β -citroneleno, limoneno, δ -terpineol, mirtenol, longiborneol, α -terpineno, cis-sesquisabineno hidrato), esto se debe a que en este clima hay una menor cantidad de agua en el ambiente y los aceites volátiles son fáciles de detectar y de obtener. En la época húmeda se encuentran una menor cantidad de compuestos ya que esta tiene mayor contenido de agua, y al momento del secado en horno se necesita más tiempo para llegar a obtener el porcentaje de humedad requerido, por lo cual en este proceso pueden perderse terpenos presentes en el aceite. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los lugares de colecta; debido a que Cerro Alux, presenta mayor cantidad de compuestos en ambas épocas de colecta. Esto se debe a que en este lugar se encontraron solamente árboles, mientras que en Florencia son árboles jóvenes (Ver anexo 12.1 y 12.2). Entre más joven es la sintetiza mayor cantidad de

metabolitos primarios pero menor cantidad de metabolitos secundarios, ya que está en proceso de crecimiento.

Para identificar los componentes mayoritarios del aceite esencial se utilizó espectrometría de masas, como método confirmatorio para su detección. La tabla 7.7 describe los siete terpenos identificados, teniendo en común entre lugares cuatro componentes, el aceite obtenido del muestreo de Cerro Alux presentan una mayor cantidad de compuestos. En ambas metodologías la cromatografía de gases y espectrometría de masas se logró identificar como componente característico de esta especie al 1,8-cineol.

Para la obtención de extractos se utilizó la percolación, con dos solventes, para obtener la fase polar (etanol 95%) y para la fase apolar (diclorometano); obteniendo distintos porcentajes de rendimientos que se encuentra en la tabla 7.8.

Se realizó el tamizaje fitoquímico, alcanzando así un resultado positivo de la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, saponinas, flavonoides, cumarinas, aceites volátiles en ambos lugares y épocas de colecta, como lo indica la literatura (Cáceres A, 1996, p. 227). Éste es un parámetro importante para la detección de los marcadores de la materia vegetal (ver tabla 7.9). Los alcaloides son el grupo de principios activos de mayor interés en el estudio de plantas medicinales. Son sustancias orgánicas de origen vegetal nitrogenadas con carácter básico de estructura generalmente compleja y que presentan actividades farmacológicas muy diversas, no exentas de toxicidad (Vanaclocha. 2003, p.40). Las saponinas se caracterizan por su actividad tensio-activa, se disuelven en agua formando disoluciones espumosas, la mayor parte de los saponósidos poseen propiedades hemolíticas y son tóxicos para los animales de sangre fría principalmente los peces (Bruneton. 2001, p.664). Los flavonoides son compuestos polifenólicos que están ampliamente distribuidos entre las plantas superiores, principalmente en las partes aéreas: hojas flores y frutos. Estos inhiben la agregación plaquetaria y muchos de ellos son protectores hepáticos, algunos además presentan propiedades diuréticas, espasmolíticas, antiinflamatorias y antimicrobianas (Vanaclocha. 2003, p.32). Las principales acciones de las cumarinas son

antiespasmódica, vasodilatadora, antiinflamatoria y vasoprotectora. (Vanaclocha. 2003, p .35)

Después de evaluar y comparar las propiedades fisicoquímica de aceites esenciales y extractos de *Listea guatemalensis* obteniendo resultados positivos, se comparó la actividad biológica. Para esto se determinó la actividad antioxidante, por medio de cromatografía de capa fina, presentando esta actividad tanto aceite como extractos, como se muestra en la tabla 7.10. La importancia del estudio de los antioxidantes es debido a que ellos se añaden a aceites y grasas, así como a los alimentos para prevenir la formación de colores y sabores no deseables y de otros compuestos que se originan de la oxidación de los lípidos. Ante la creciente oposición al empleo de antioxidantes sintéticos en la alimentación, las investigaciones se han dirigido a encontrar productos naturales con actividad antioxidante, lo cual permitirá sustituirlos o por lo menos disminuir la cantidad necesaria para proteger los alimentos (Maestro Duran y Borja Padilla. 1993).

Tanto los extractos como los aceites analizados mediante cromatografía de capa fina, presentan actividad antioxidante. Del mismo modo se realizó un análisis macrométrico, en el cual los resultados fueron expresados en base al valor de la CI_{50} (concentración inhibitoria mínima). Esta es una medida para evaluar la actividad antioxidante. Un valor menor en esta concentración indica una mayor capacidad antioxidante presentada por el extracto, tal y como se puede observar en la gráfica 7.7, el extracto etanólico de la especie procedente de Florencia en época húmeda presenta una menor concentración, esto significa que dicho extracto necesita ser utilizado en bajas proporciones para realizar la actividad antioxidante. Como se describe en la tabla 7.11 tanto los extractos como el aceite analizado en cromatografía en capa fina presentan una actividad anticolinesterasa, la determinación de esta actividad es de suma importancia ya que representa un potencial para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. 2005).

Como parte del estudio se realizó un análisis en el aceite y extractos para determinar la actividad antibacteriana. Los resultados obtenidos fueron expresados en términos de la concentración mínima inhibitoria -CIM-. Esto quiere decir que se utiliza la menor

concentración del extracto para inhibir el crecimiento de las distintas bacterias utilizadas en el análisis y estos resultados se comparan con un control, para este caso los antibióticos eritromicina y vancomicina (ver tabla 7.14). La concentración inhibitoria mínima del aceite fue menor que la de los controles, presentando así una mayor acción antibacteriana que estos últimos. Al contrario de ello, la concentración inhibitoria mínima de los extractos fue mayor que la de los controles. Esto quiere decir que los extractos presentan actividad inhibitoria pero en menor grado sobre estas bacterias y por lo cual estos no son efectivos.

Muchas de las plagas de cultivos son microorganismos e insectos que terminan alimentándose de las plantaciones, con consecuencias económicas desastrosas y muchas veces difíciles de controlar. Dado que normalmente se utilizan sustancias sintéticas que pueden terminar contaminando las tierras y los productos alimenticios, entonces los aceites esenciales se constituyen en una alternativa potencial como plaguicidas naturales biodegradables (Flores, Ester y Velazco, Patricia. 1999). Concentración letal media que presenta el aceite esencial contra *Artemia salina* es de 0.025 ppm de la muestra colectada en Cerro Alux en ambas épocas, y en Florencia es mayor siendo este de 0.948 para la época húmeda y 0.412 para la época seca (Tabla 7.16 y Grafica 7.10). Dichos datos revelan que el aceite posee actividad citotóxica ya que su concentración es menor a 100 ppm. Esto confirma que el aceite esencial de *Litsea guatemalensis* presenta actividad citotóxica.

En cuanto a la actividad larvicida contra *Anopheles albimanus*, para el primer y segundo estadio, las larvas expuestas a una concentración de 0.025ppm y las diluciones evaluadas de los aceites esenciales de *L. guatemalensis* ocasionó la muerte total en las larvas de dichos estadios. Como se observa en la tabla 7.17 y grafica 7.11; el aceite obtenido de Cerro Alux de ambas épocas mata a una mayor cantidad de larvas con una concentración muy baja demostrando un mejor rendimiento en la actividad larvicida. Mientras que el aceite extraído de las muestras de Florencia, necesita una mayor cantidad de mismo para obtener un buen resultado, lo cual produce un rendimiento menor en la actividad larvicida. Sin embargo la actividad larvicida que presenta el aceite esencial contra *Aedes aegypti* (ver tabla 18) es únicamente para el primer estadio y tiene una concentración letal media mayor a 2 ppm, este dato es elevado en comparación con el

insecticida organofosforado empleado como control Temephos que se utiliza actualmente, ya que la concentración letal máxima es de 0.0001ppm y es utilizado para la muerte de estas larvas en estadio uno a tres. El extracto de diclorometano utilizado para determinar la actividad larvicida, (ver tabla 7.19) actúa en el segundo y tercer estadio con concentraciones arriba de 100ppm siendo estas muy elevadas al compararlas con el Temephos que actualmente se utiliza para erradicar este vector. Al utilizar el extracto de Diclorometano contra *Anopheles albimanus* no hay muertes significativas en las larvas expuestas, por lo tanto no se evidencia dicha actividad.

Uno de los objetivos de esta investigación es la estandarización y validación para la propuesta de una Ficha de Control de Calidad para *Litsea guatemalensis*, para establecer parámetros característicos de la especie. Como se observa en la tabla 7.20 se establecieron los caracteres más importantes para facilitar el registro de productos para su comercialización y exportación. Esta ficha está encaminada a confirmar la identidad de materias primas vegetales de *Litsea guatemalensis* como a valorar su calidad y pureza. Cuando las materias primas no reúnen los requisitos, deben ser rechazadas. Para este tipo de control se emplean ensayos fisicoquímicos cuantitativos de tipo general (humedad, cenizas) o de tipo específico, útiles para cuantificar o valorar determinados principios activos relacionados con la actividad biológica que han sido aislados previamente (alcaloides, saponinas, etc.). La Tabla 7.20 muestra los procedimientos analíticos a llevar a cabo.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 *Litsea guatemalensis* proveniente de dos lugares de colecta: Cerro Alux, Florencia y dos épocas; no presentan diferencias significativas en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (sólidos totales, cenizas totales, cenizas insolubles en HCl y humedad).
- 9.2 La presencia de potasio, calcio, hierro, zinc, estroncio son característicos de *Litsea guatemalensis* ya que estos minerales se detectaron en ambas épocas y ambos lugares de colecta.
- 9.3 Se obtiene un mayor rendimiento de aceite esencial en la época húmeda, que presentó un 0.9%, mientras que la época seca un 0.8%.
- 9.4 El análisis de aceites por medio de Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas identifica como componente característico de esta especie al 1,8-cineol; evidenciando otros compuestos como: Tetrahidro-citroneleno; terminen-4-ol; α -terpineol; carvona; butanoato de linalilo; p-metoxi-cinamaldehído, presentes en ambas épocas y ambos lugares de colecta.
- 9.5 Los metabolitos secundarios característicos de la especie son: Alcaloides, saponinas, flavonoides, cumarinas, aceites volátiles; identificados en ambos lugares y épocas de colecta.
- 9.6 Los extractos como los aceites analizados en cromatografía de capa fina, presentan actividad antioxidante.
- 9.7 El extracto etanólico de Florencia en época húmeda para la actividad antioxidante presenta el mejor IC₅₀ siendo este de 0.267.

- 9.8 Los extractos y aceites de *Litsea guatemalensis* presentan actividad anticolinesterasa en ambas épocas y lugares de colecta.
- 9.9 El aceite esencial de *Litsea guatemalensis* presenta actividad antibacteriana contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 2.5 y 7.5 µmg/ml para época húmeda y época seca, respectivamente; *Bacillus subtilis* a una concentración de 2.5 y 5.0 µmg/ml para Cerro Alux y Florencia respectivamente; *Escherichia coli* de 7.5 µmg/ml para ambas épocas y lugares.
- 9.10 Los extractos de *Litsea guatemalensis* no presentan actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- 9.11 Los aceites esenciales de *Litsea guatemalensis* presentan actividad citotóxica contra *Artemia salina* principalmente el recolectado en Cerro Alux determinándose una DL 50 de 0.025 ppm.
- 9.12 Los aceites esenciales presentan mayor actividad larvicida que los extractos contra *Anopheles albimans* y *Aedes aegypti*.
- 9.13 Se establecieron parámetros de calidad para *Litsea guatemalensis* mediante una ficha técnica.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Evaluar fracciones y componentes del aceite esencial de *Litsea guatemalensis* como agentes antibacterianos.
- 10.2 Realizar estudio del aceite esencial por cromatografía de gases para comprar las tres distintas especies de laurel (*Litsea guatemalensis*, *Litsea glaucescens*, *Litsea neesiana*).
- 10.3 Realizar un estudio de Fluorescencia de Rayos X para la determinación de minerales en muestras que se encuentren suelos húmedos o áridos.
- 10.4 Profundizar en el estudio de antioxidantes ya que *Litsea guatemalensis* presenta esta actividad y así poder realizar preparados tanto fitocosméticos como farmacéuticos.
- 10.5 Realizar un análisis sobre el contenido de pesticidas organofosforados para determinar la toxicidad que la planta genere en el ser humano.
- 10.6 Realizar otros estudios específicos para la actividad citotóxica e insecticida que presenta el aceite esencial de *Litsea guatemalensis*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buckman Harry O. & Nyle C. Brady (1970). *Naturaleza y Propiedades de los Suelos*.
Barcelona: Montaner y Simon, S.A. pp. 9-15, 18-41.
- Bruneton, Jean; (2001). *Farmacognosia: Fitoquímica de plantas medicinales*. 2ª Edición.
España: Editorial Acribia, S. A. pp. 664.
- Cáceres A. (1996). Laurel. En *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Vol. 1, pp. 42-58.
Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A. (2003). Laurel. En *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. pp. 63-66.
Guatemala: Editorial Universitaria de San Carlos de Guatemala.
- Carolus Mez, Jahrb. Bot. Gart. Berlin (1889). *Estudios en la Lauraceae. Preliminarmente estudiada en especies de México y Centro América*. Journ. Arnold Arb. pp. 280-434.
- España. Ministerio de Sanidad y Consumo (2002) Real Farmacopea Española. 2ª. Edición.
Agencia española del Mediamento pp. 39,198-205,2801
- Flores, Ester y Velazco, Patricia. (1999). *Aceites Esenciales con actividad citotóxica como indicador de propiedades insecticidas*. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Fármaco, Universidad Mayor de San Andrés. Recuperado de: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa99070705.pdf>
- Galán, P. de Liberto. (1977). Análisis por fluorescencia de Rayos X en la exploración geoquímica. *Revista de Univ. Nal. Autón. México, Inst. Geología*. vol. 1, núm. 2. Pp.191-194p.
- Gómez López, A. L. (2008). *Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de piperáceas (P. Jacquemontianum, P. Oradendron y P. Umbellatum)*. (Tesis de maestría).
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2716.pdf
- Hernández Méndez, I.L. (2007). *Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio, de la hoja de Solanum hartwegii Benth. (Huiz), de hoja de Litsea guatemalensis Mez. (Laurel), y de hoja de Piper jacquemontianum Kunth. (Cordoncillo)*. (Tesis de

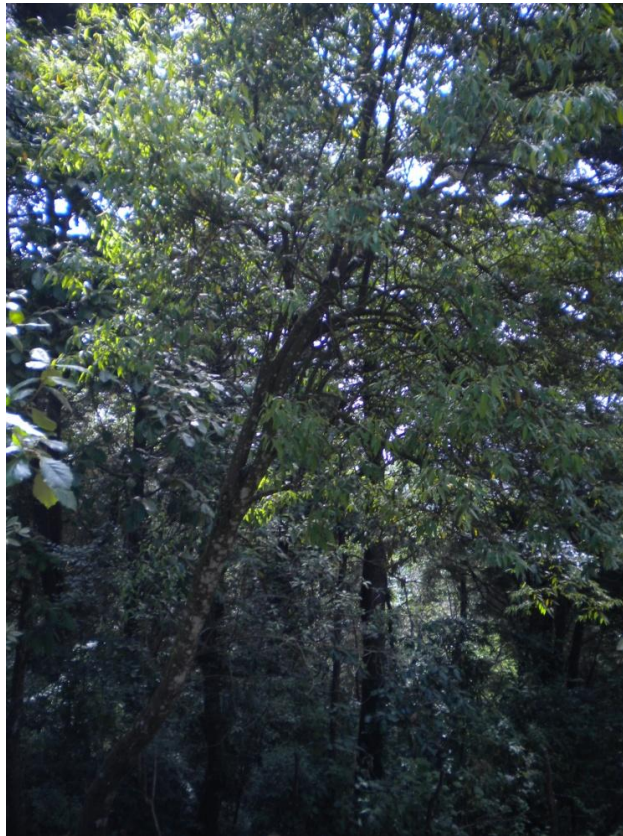
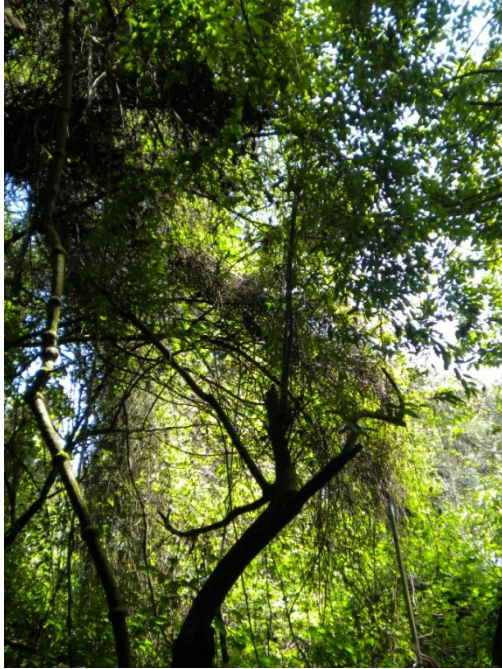
- maestría). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2575.pdf
- Lima S. (2003). *Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (Solanum americanum) y mamey (Mammea americana)*. (Tesis de maestría). Facultad de ciencias químicas y farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2157.pdf
- López Mazín, J. G. (2004). *Evaluación del rendimiento de oleorresina de las hojas de laurel (litsea guatemalensis) de Tecpán, Chimaltenango en función del tamaño de partícula, utilizando dos solventes distintos a nivel planta piloto*. (Tesis de maestría). Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Maestro Duran y Borja padilla. (1993) *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos*. Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C.). España. Vol.44 Fasc. 2 Recuperado de <http://grasasyaceites.revistas.csic.es>
- Morales María José Morales. (2008). *Estudio del efecto de Polypogon australis sobre las propiedades fisicoquímicas de un sustrato de relave minero de la planta Santo Domingo Paposo, II Región Chile*. (Tesis de maestría). Recuperado de http://www.digeo.cl/doc/Marin%20Roga_Ivania.pdf
- Procedimiento Estándar de Operación. Laboratorio de Bioensayos. (2005). *Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)*. Guatemala: Isabel Gaitán.
- Procedimiento Estándar de Operación. Laboratorio de Bioensayos. (2005). *Tamizaje de la Actividad Antibacteriana in vitro*. Guatemala: Isabel Gaitán.
- Procedimiento Estándar de Operación. Laboratorio de Bioensayos. (2005). *Tamizaje de la Actividad Antilevadura in vitro*. Guatemala: Isabel Gaitán.
- Procedimiento Estándar de Operación. Laboratorio de Bioensayos. (2005). *Tamizaje de la Actividad Antimicótica in vitro*. Guatemala: Isabel Gaitán.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Concentración Inhibitoria Mínima*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Concentración usando rotavapor*. Guatemala.

- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Determinación de Humedad utilizando una balanza de humedad Sartorius MA45*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Evaluación antioxidante por el método de DPPH*. Guatemala: Barrondo Ana.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Extracción continua por percolación*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Extracción de aceites esenciales por neoclevenger*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Extractos y tinturas*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Residuo seco de extractos*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Tamizaje de la actividad antibacteriana in vitro*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Tamizaje de la actividad larvívica*. Guatemala.
- Procedimiento Estándar de Operación. LIPRONAT. (2005). *Tamizaje Fitoquímico*. Guatemala.
- Standley, Paul C. & Steyermark, Julian. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany: 314-317p.
- Vanaclocha, Bernat; Cañigüeral, Salvador (2003). *Fitoterapia: Vademécum de prescripción*. (4ª. Edición). España: Masson, S. A. pp.32, 35.
- Y. Torres, J. Suárez, R. Martínez (1998). Estudio del análisis por fluorescencia de rayos X de minerales lateríticos usando perlas de fusión. *Re vista de Universidad de Holguín, Centro de Investigaciones de la Laterita*. Vol. X, N° 1-2. Pp. 54-28.

12. ANEXOS

12. ANEXOS

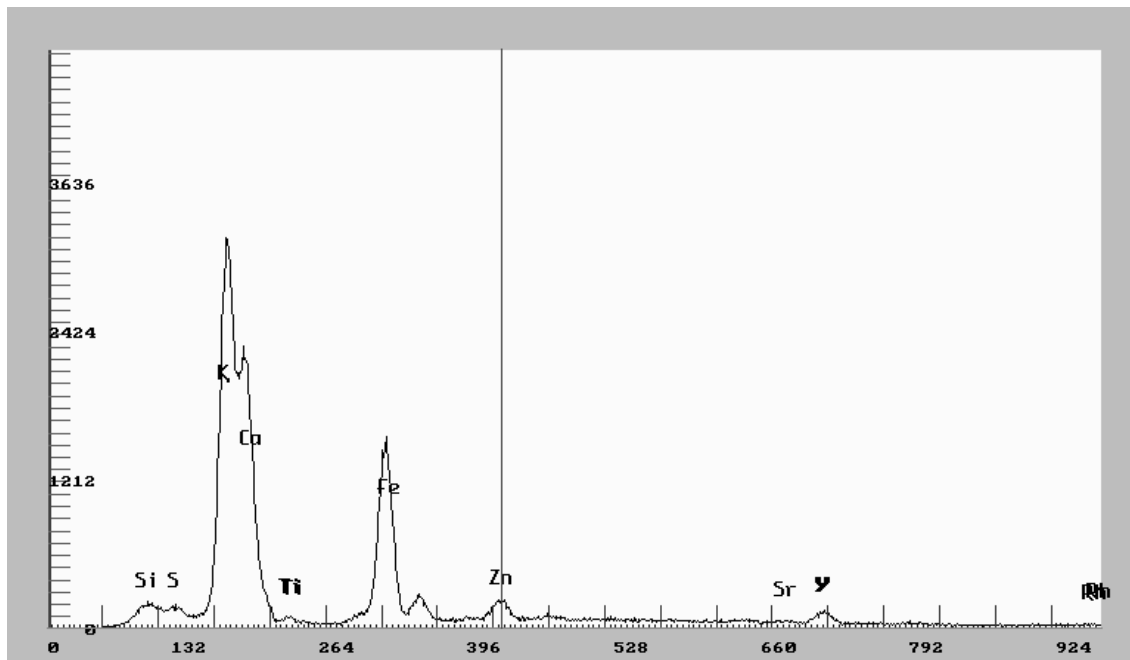
12.1 Árboles, *Litsea guatemalensis*, Cerro Alux



12.2 Arbusto, *Litsea guatemalensis*, Florencia

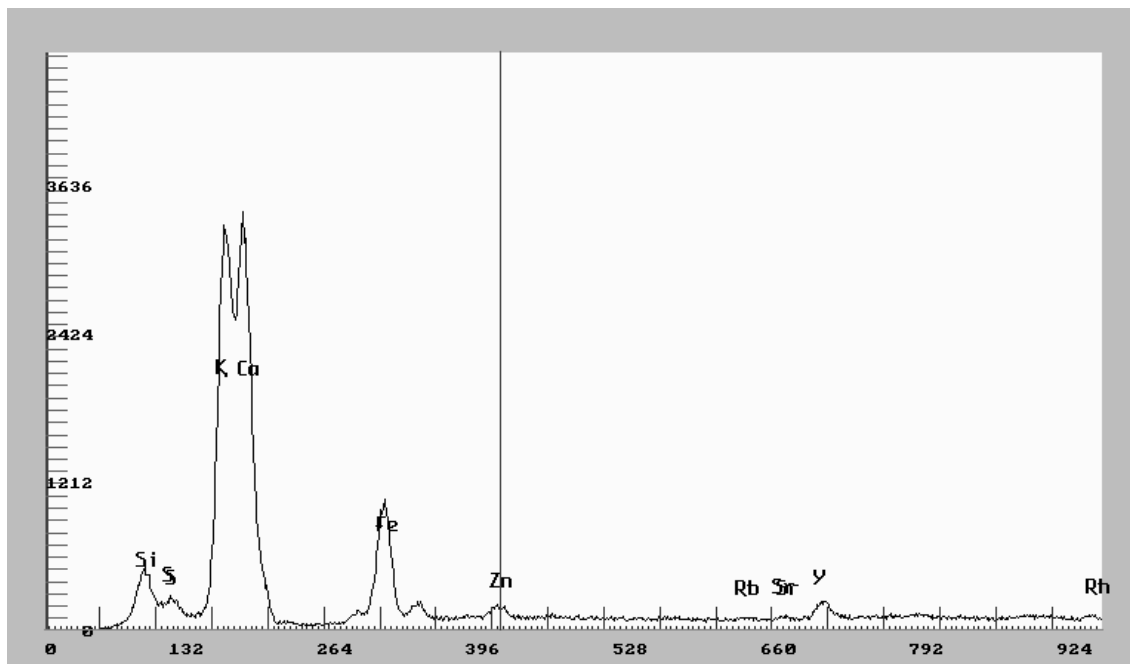


12.3 Análisis de minerales por medio de Fluorescencia de Rayos X, Cerro Alux, Época Húmeda.



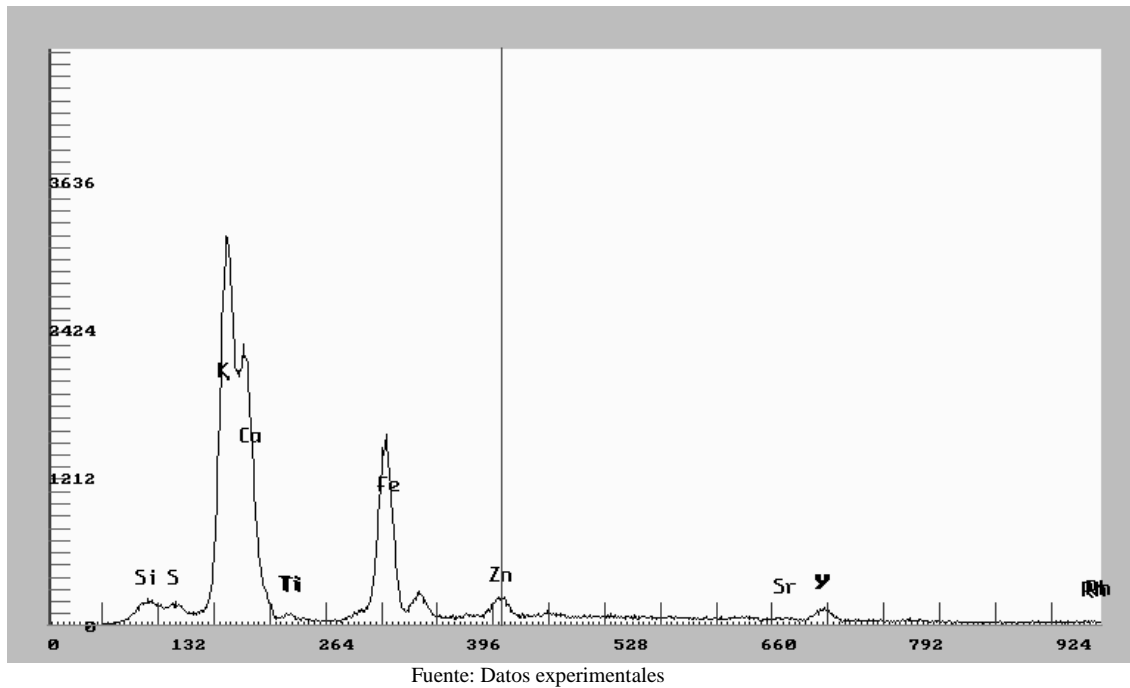
Fuente: Datos experimentales

12.4 Análisis de minerales por medio de Fluorescencia de Rayos X, Florencia, Época Húmeda

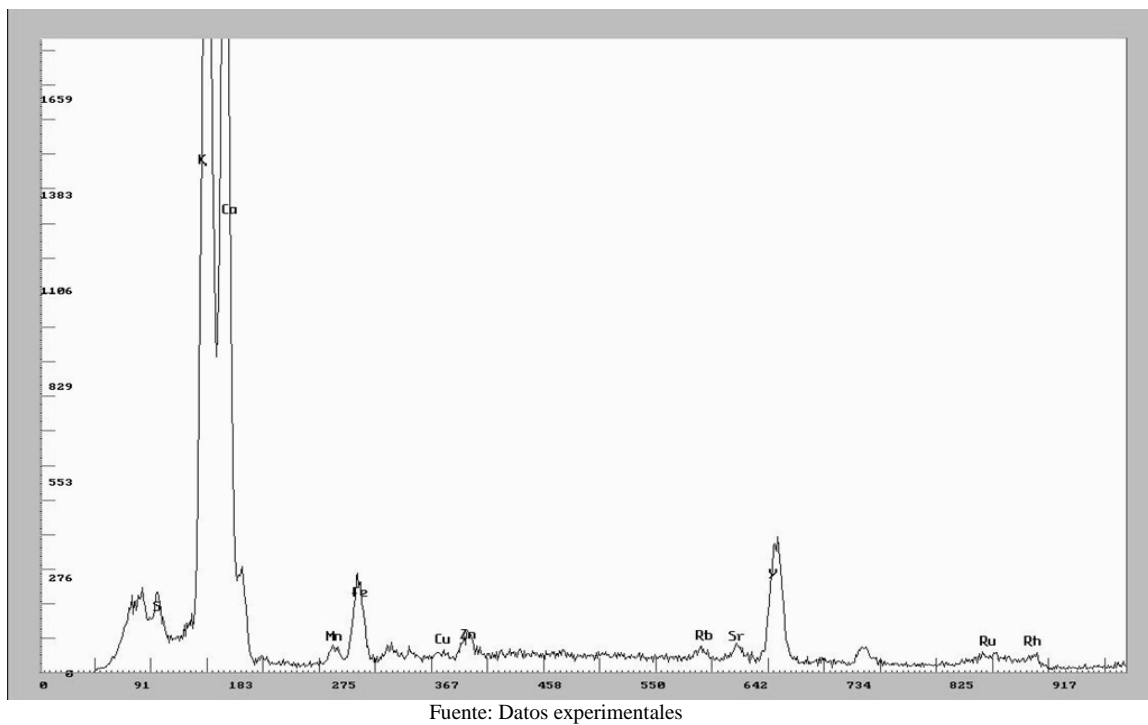


Fuente: Datos experimentales

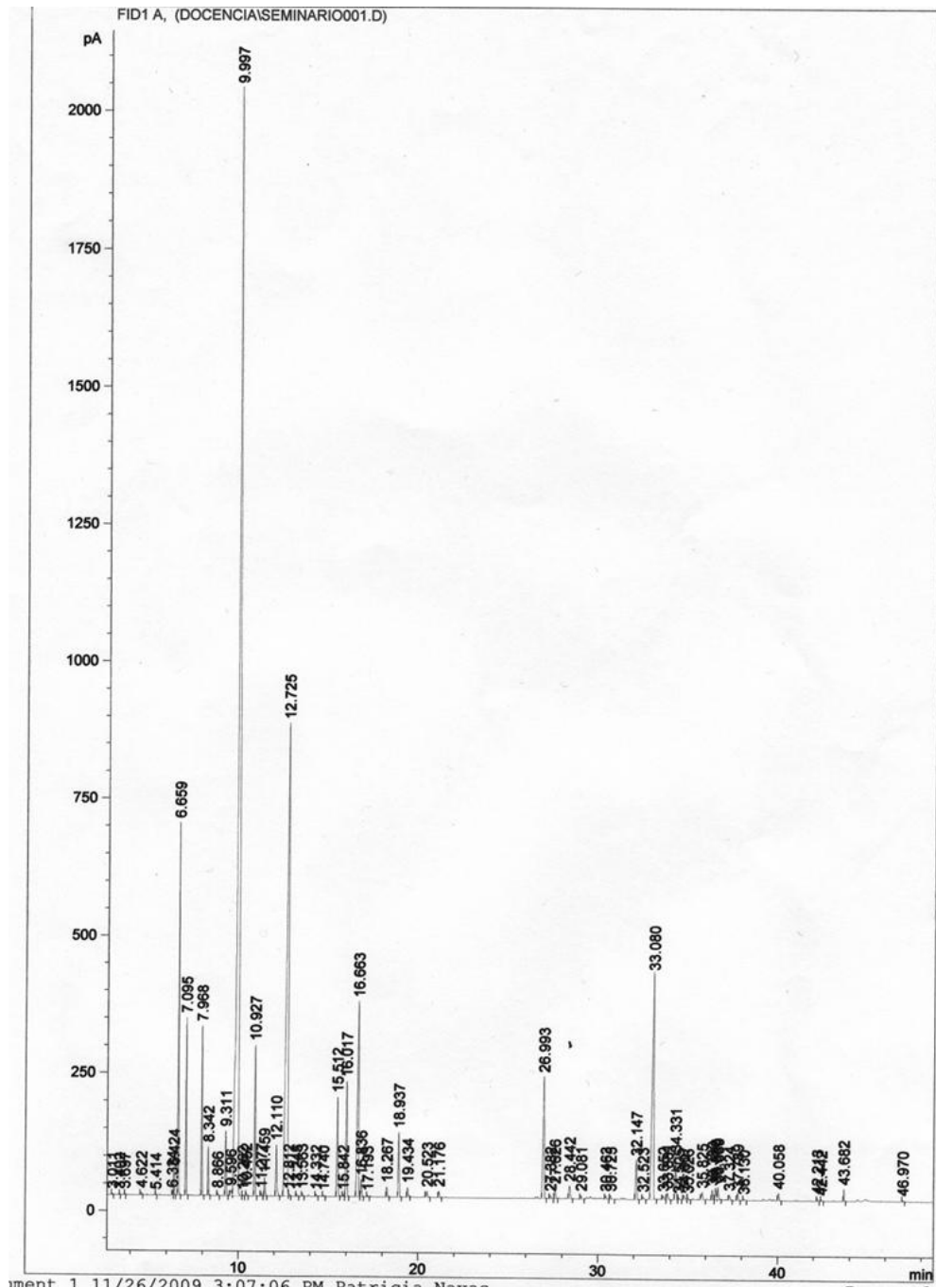
12.5 Análisis de minerales por medio de Fluorescencia de Rayos X, Cerro Alux, Época Seca.



12.6 Análisis de minerales por medio de Fluorescencia de Rayos X, Florencia, Época Seca.

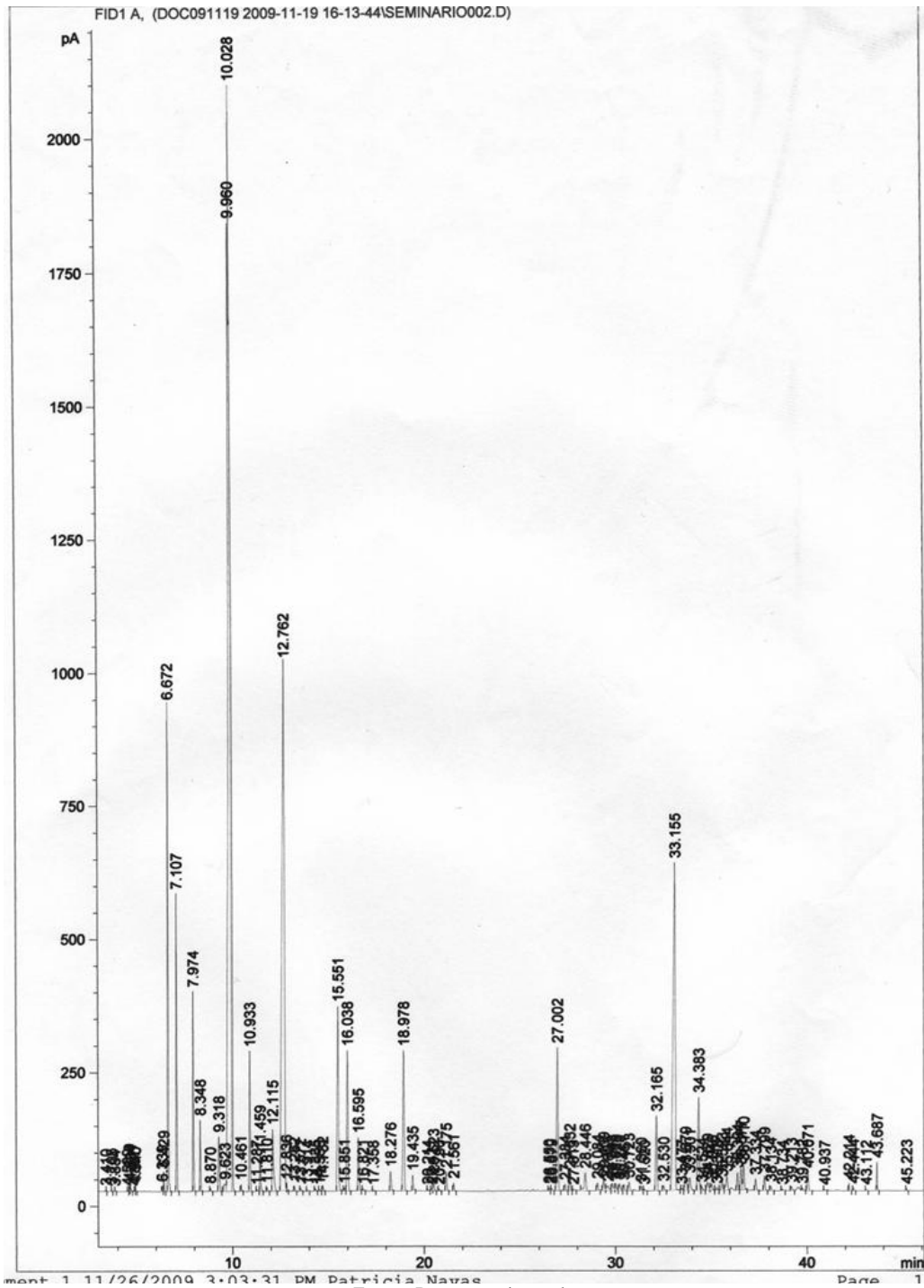


12.7 Cromatograma de gases, aceite esencial de *L. guatemalensis* en Cerro Alux, época húmeda



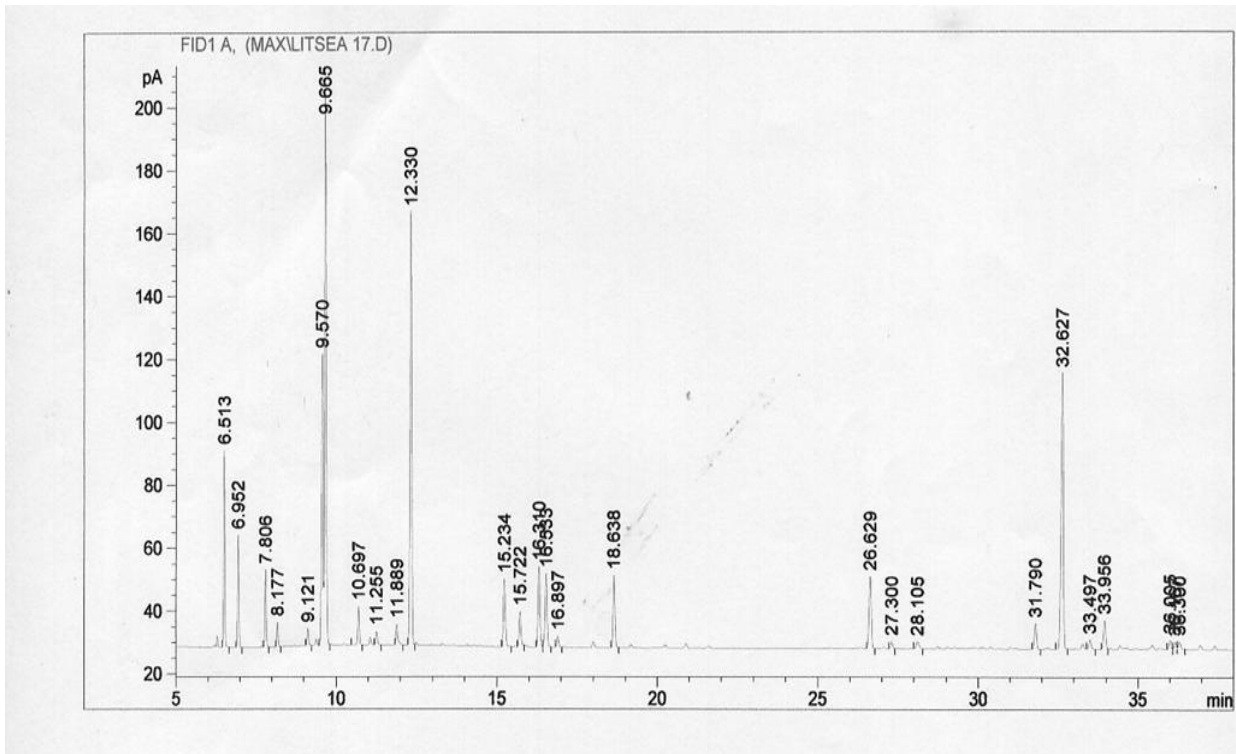
Fuente: Datos experimentales

12.8 Cromatograma de gases, aceite esencial de *L. guatemalensis* en Florencia, época húmeda



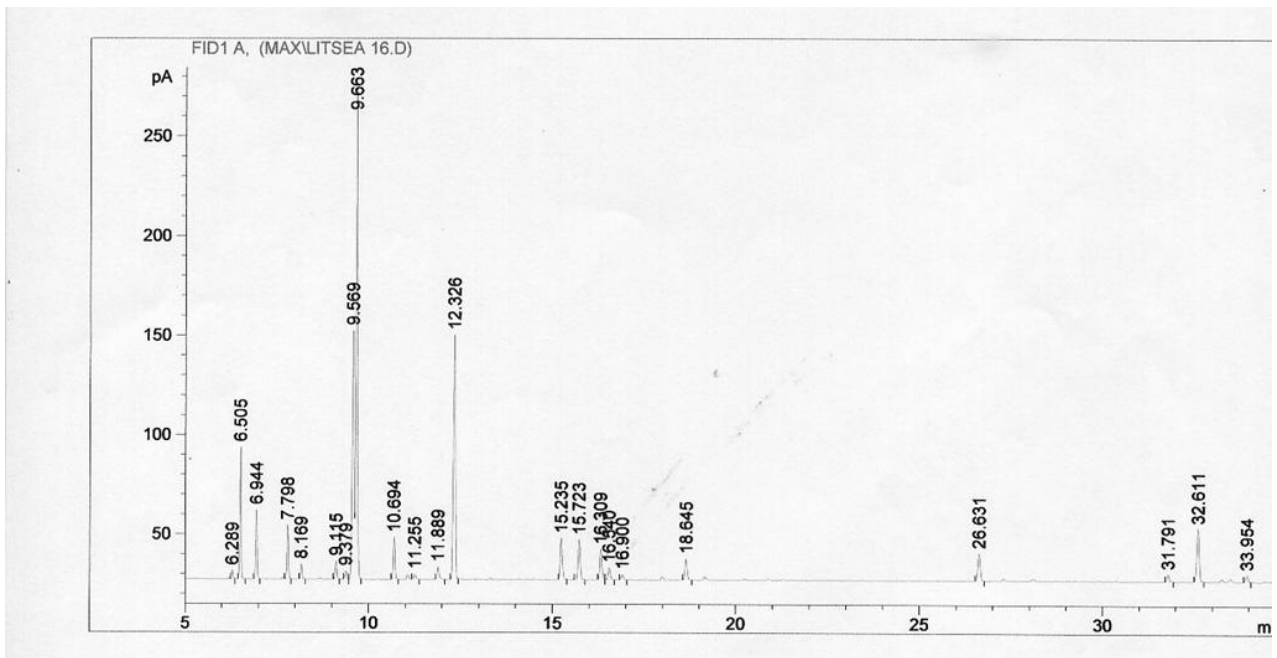
Fuente: Datos experimentales

12.9 Cromatograma de gases, aceite esencial de *L. guatemalensis* en Cerro Alux, época seca



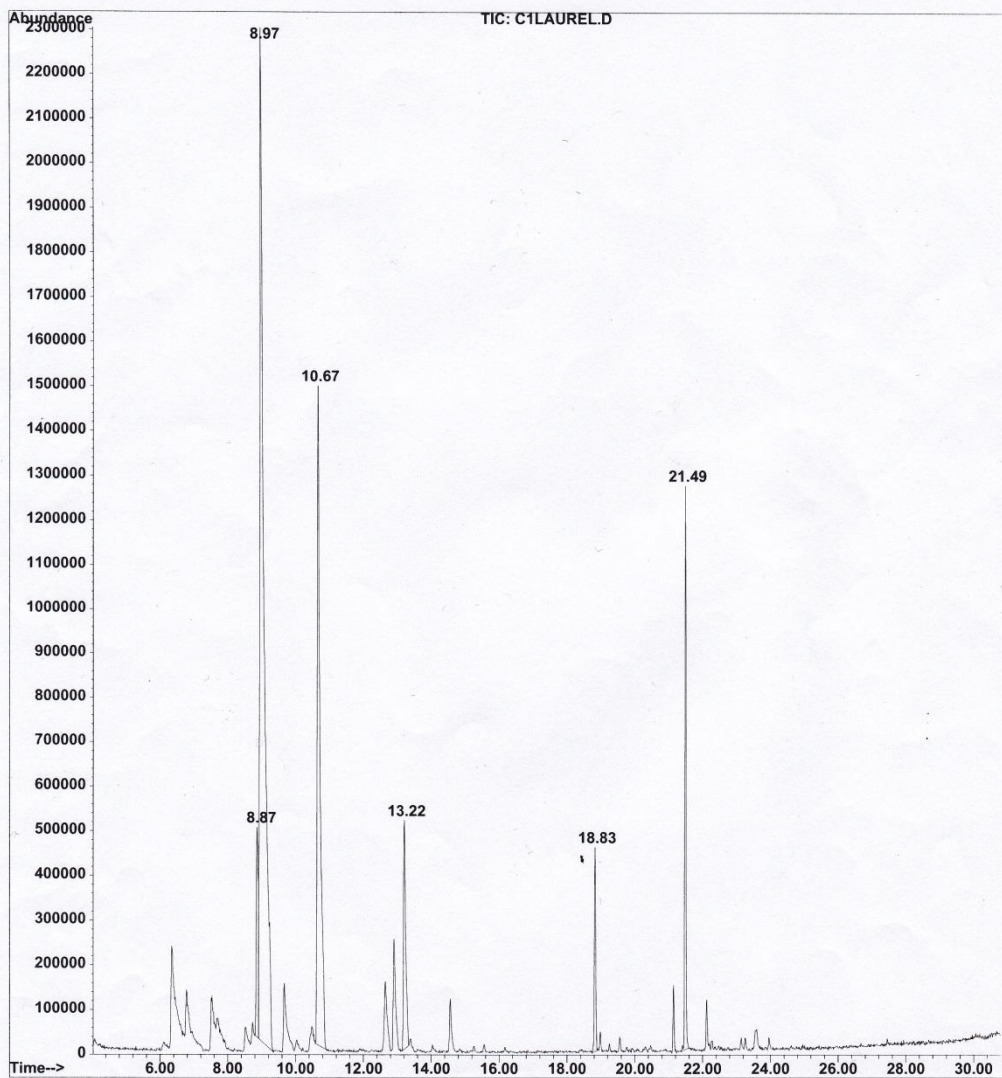
Fuente: Datos experimentales

12.10 Cromatograma de gases, aceite esencial de *L. guatemalensis* en Florencia, época seca.



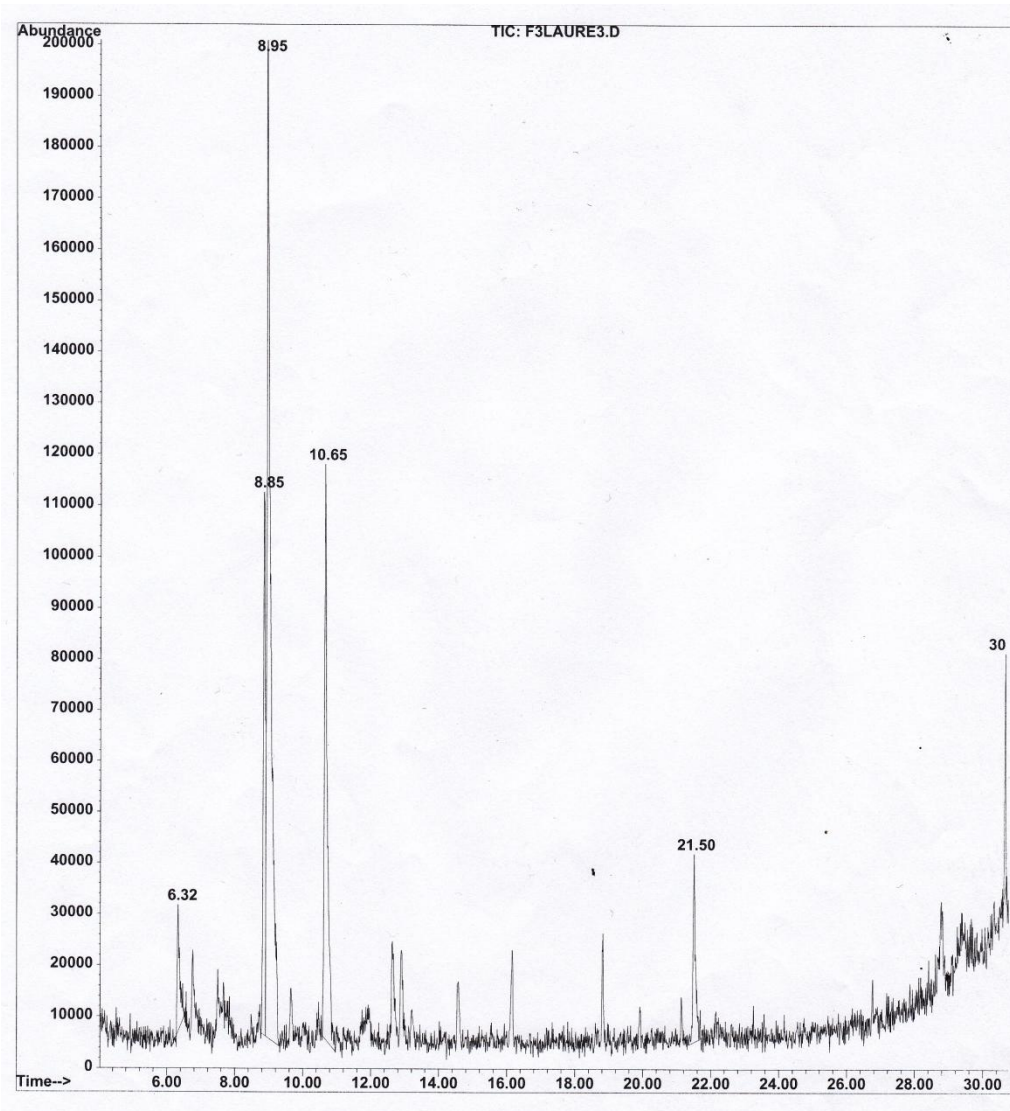
Fuente: Datos experimentales

12.11 Espectro de masa, aceite esencial de *L. guatemalensis*, Cerro Alux



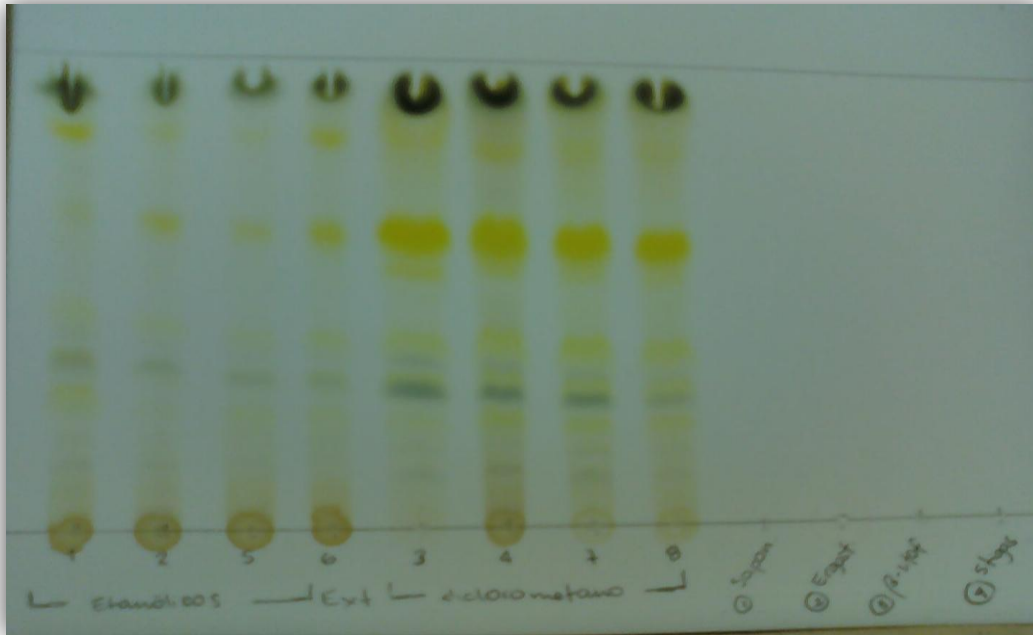
Fuente: Datos experimentales

12.12 Espectro de masa, aceite esencial de *L. guatemalensis*, Florencia



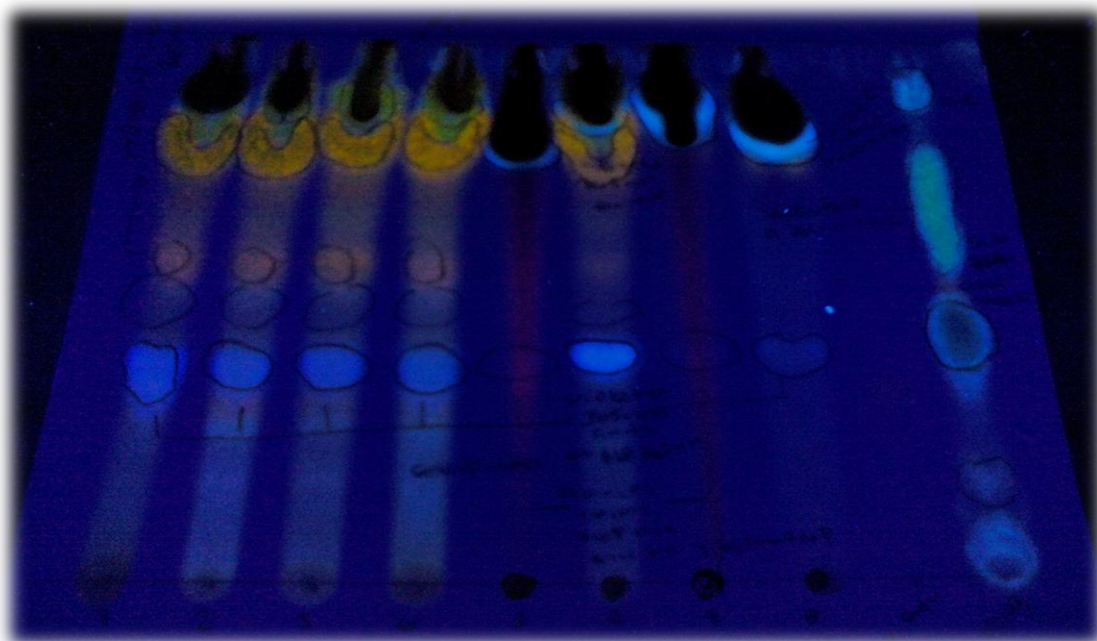
Fuente: Datos experimentales

12.13 Cromatoplaqa de saponinas revelado con anisaldehído ácido sulfúrico.



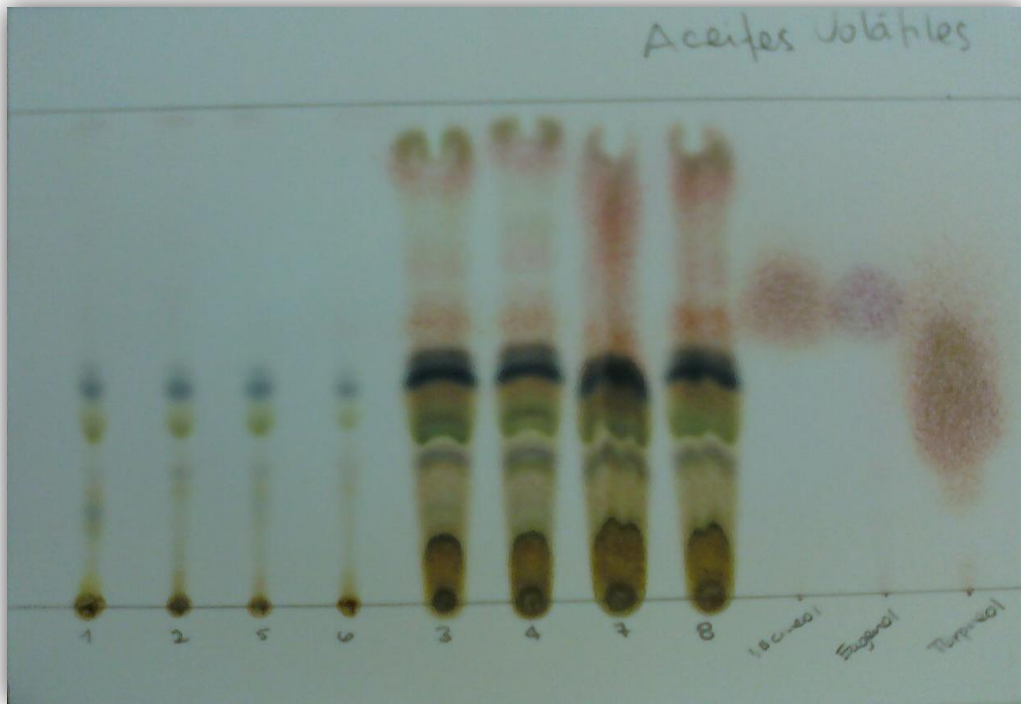
Fuente: Datos experimentales

12.14 Cromatoplaqa de Flavonoides y antocianinas revelada y vista a 365nm



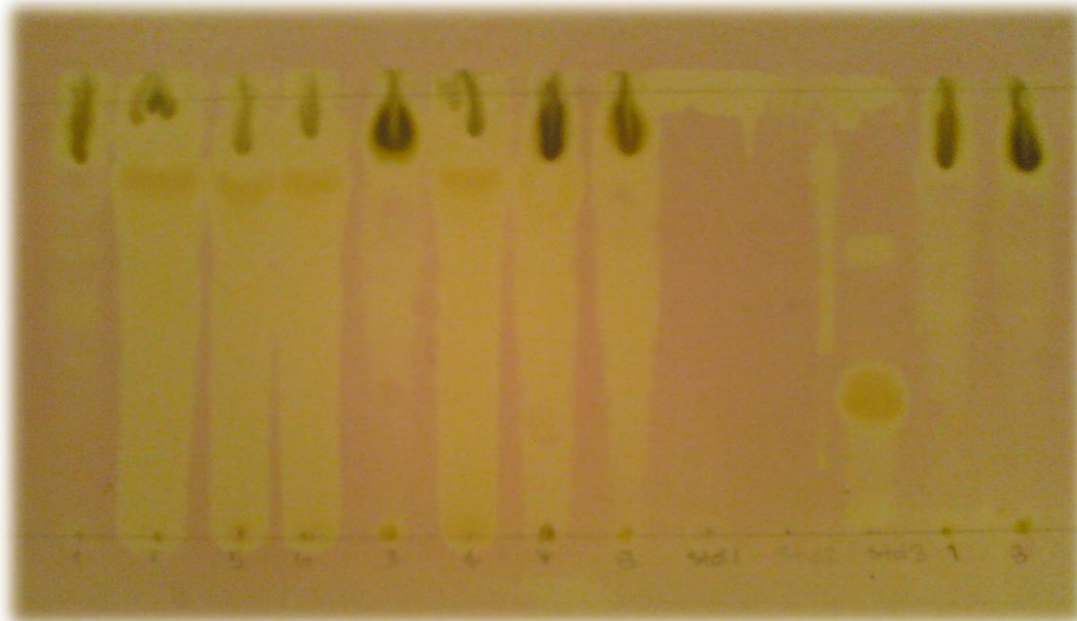
Fuente: Datos experimentales

12.15 Cromatoplaqa de aceites volátiles revelada con anisaldehído ácido sulfúrico



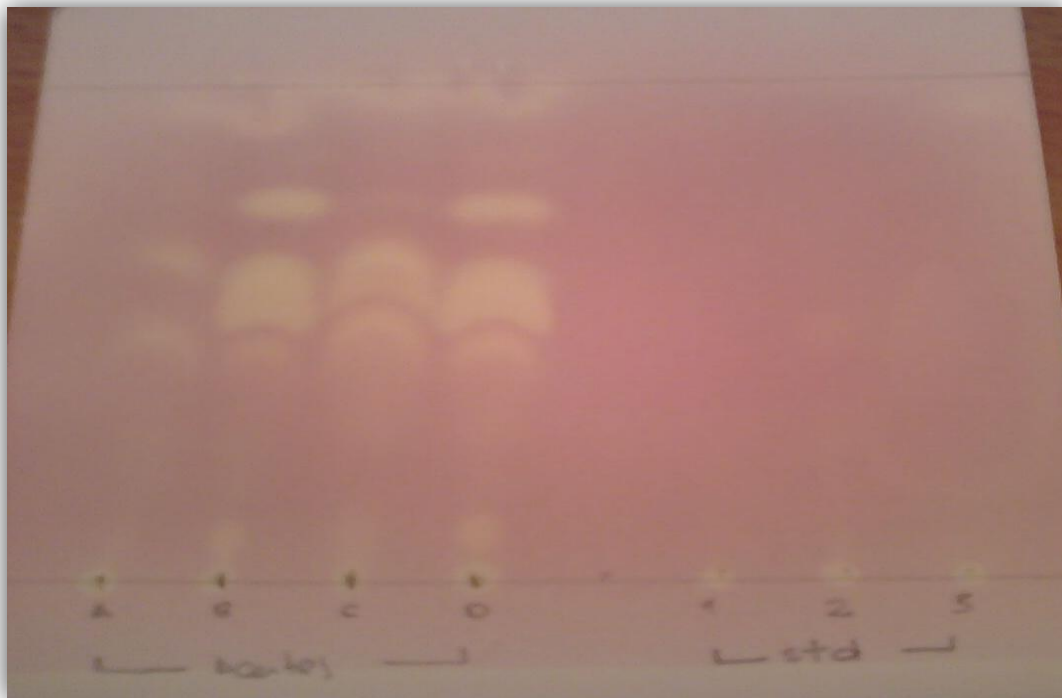
Fuente: Datos experimentales

12.16 Cromatoplaqa de actividad antioxidante en extractos revelada con DPPH



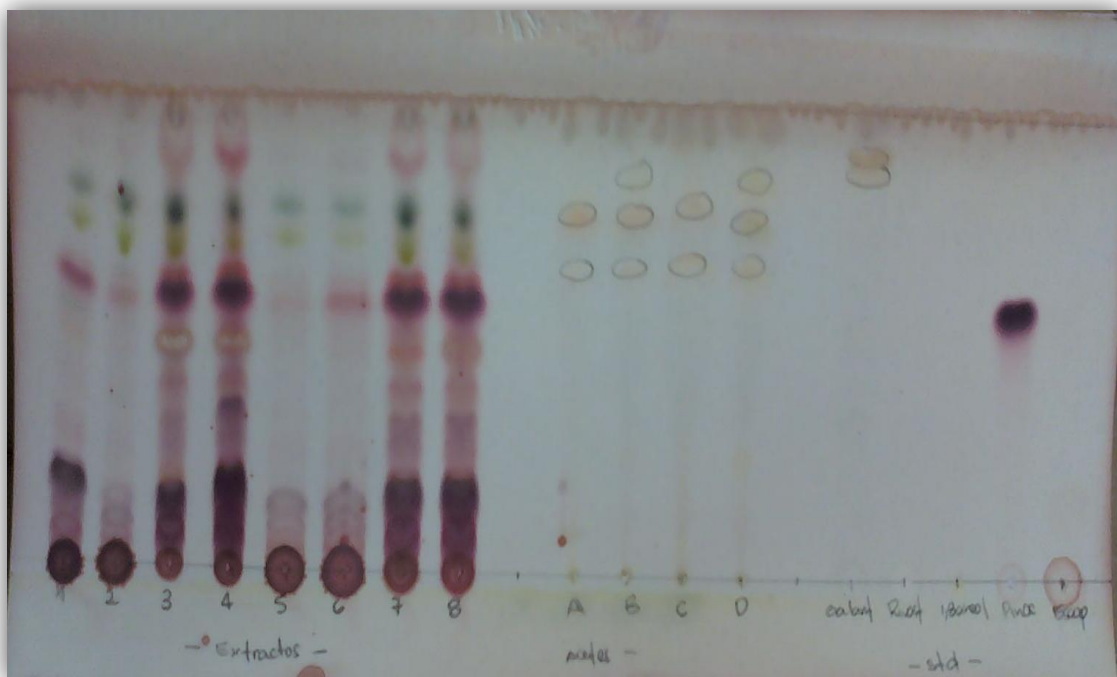
Fuente: Datos experimentales

12.17 Cromatoplaqa de actividad antioxidante en aceites revelada con DPPH



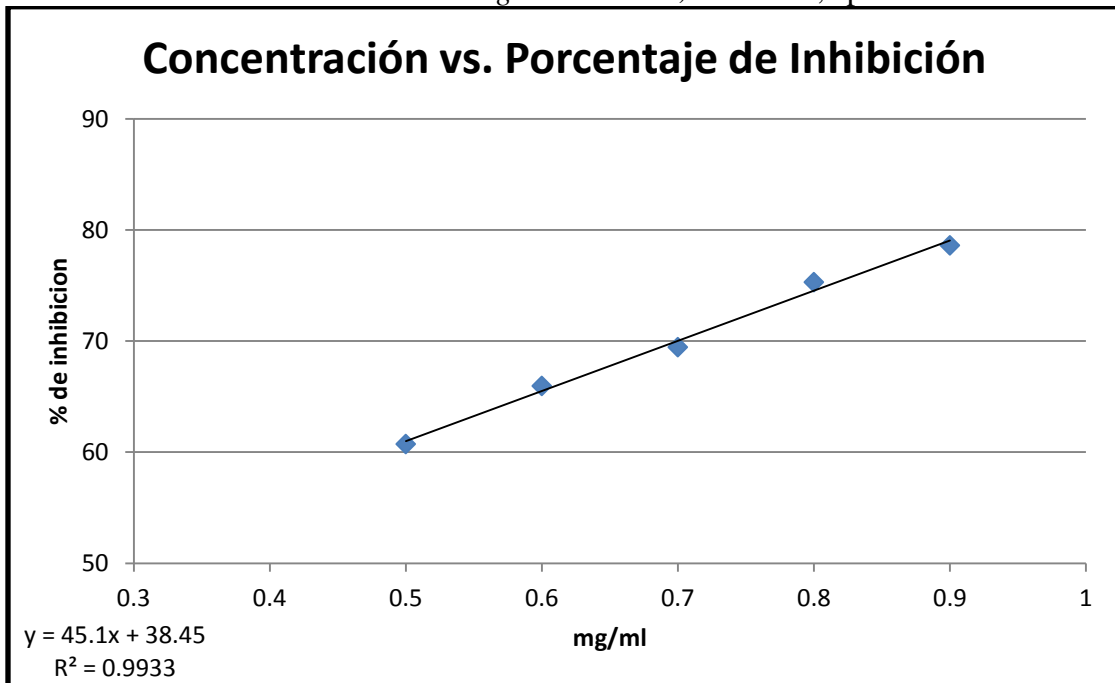
Fuente: Datos experimentales

12.18 Cromatoplaqa de actividad anticolinesterasa revelada



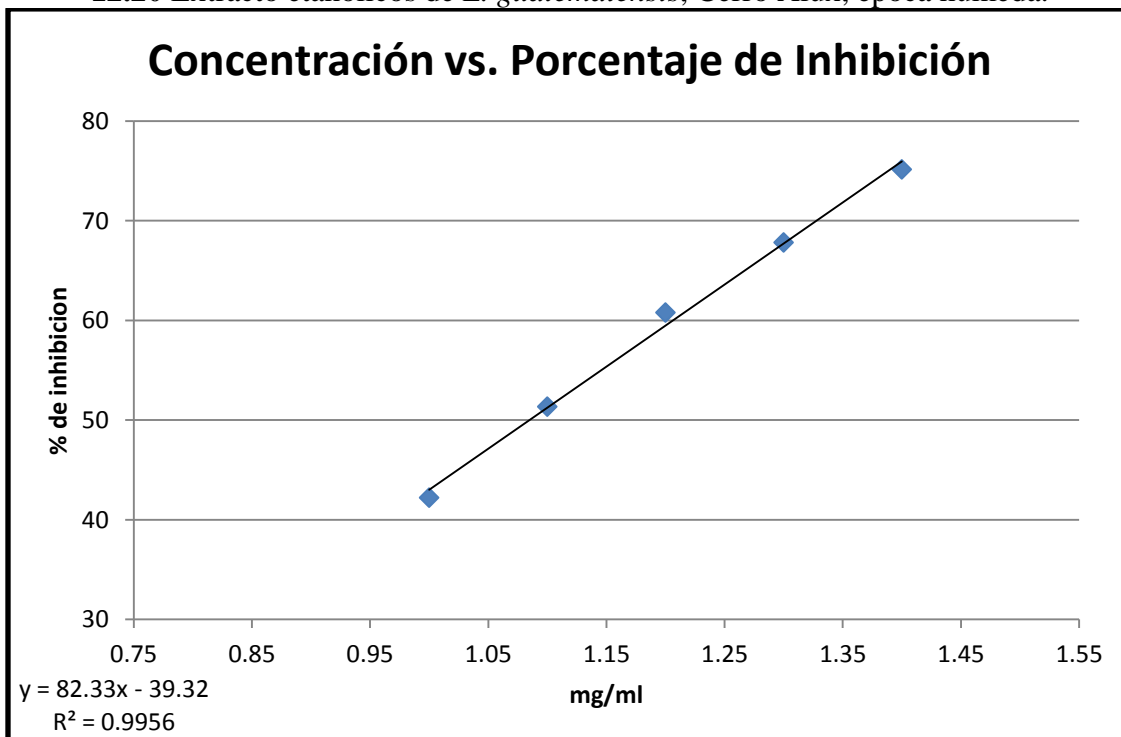
Fuente: Datos experimentales

12.19 Extracto etanólico de *L. guatemalensis*, Florencia, época húmeda.



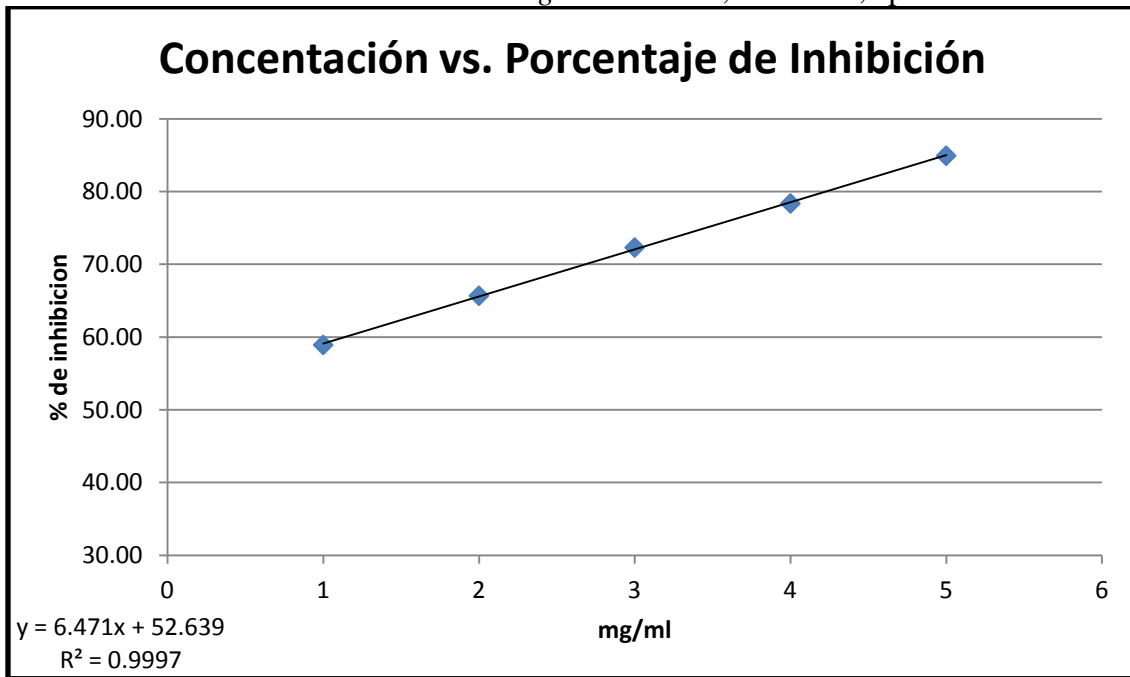
Fuente: datos experimentales

12.20 Extracto etanólicos de *L. guatemalensis*, Cerro Alux, época húmeda.



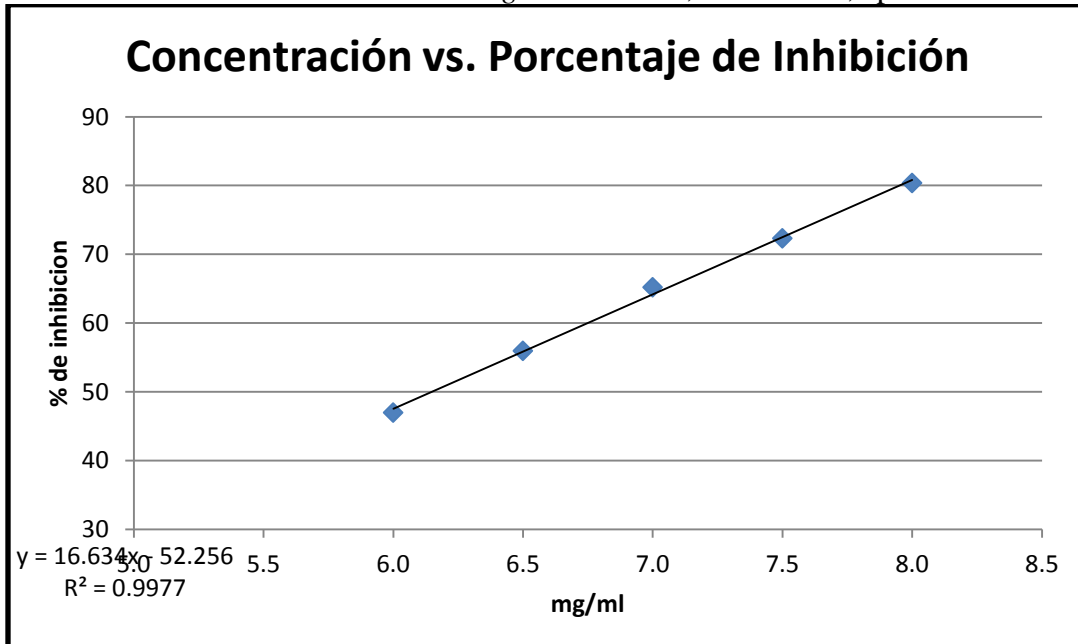
Fuente: datos experimentales

12.21 Extracto diclorometano de *L. guatemalensis*, Florencia, época húmeda.



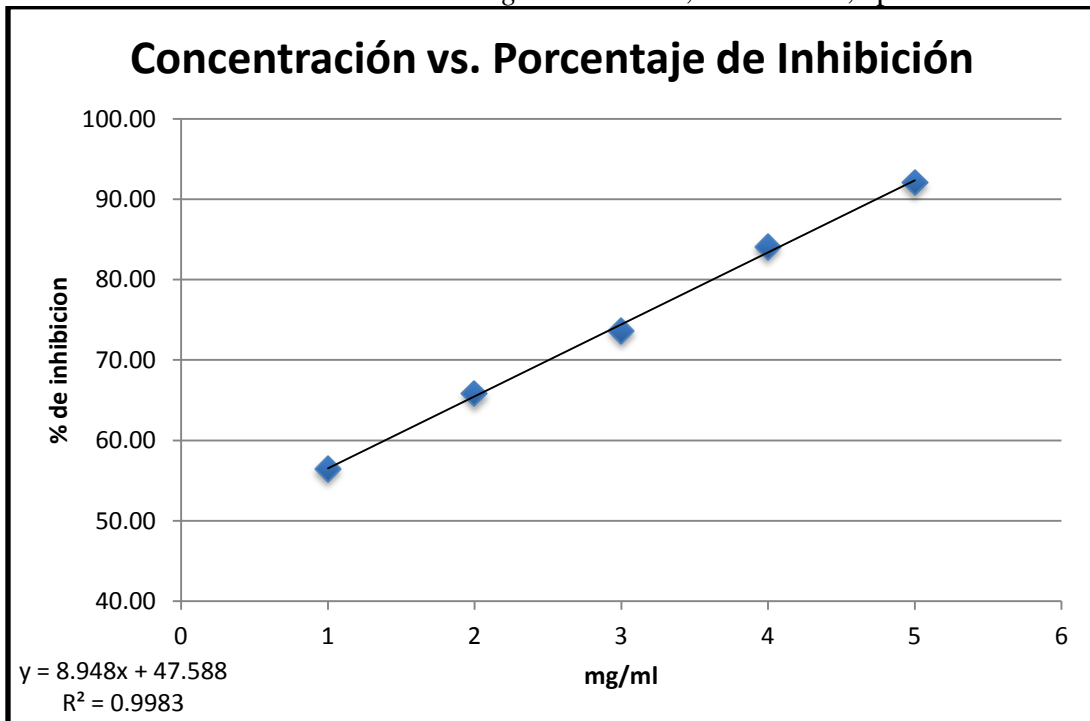
Fuente: Datos experimentales.

12.22 Extracto diclorometano de *L. guatemalensis*, Cerro Alux, época húmeda.



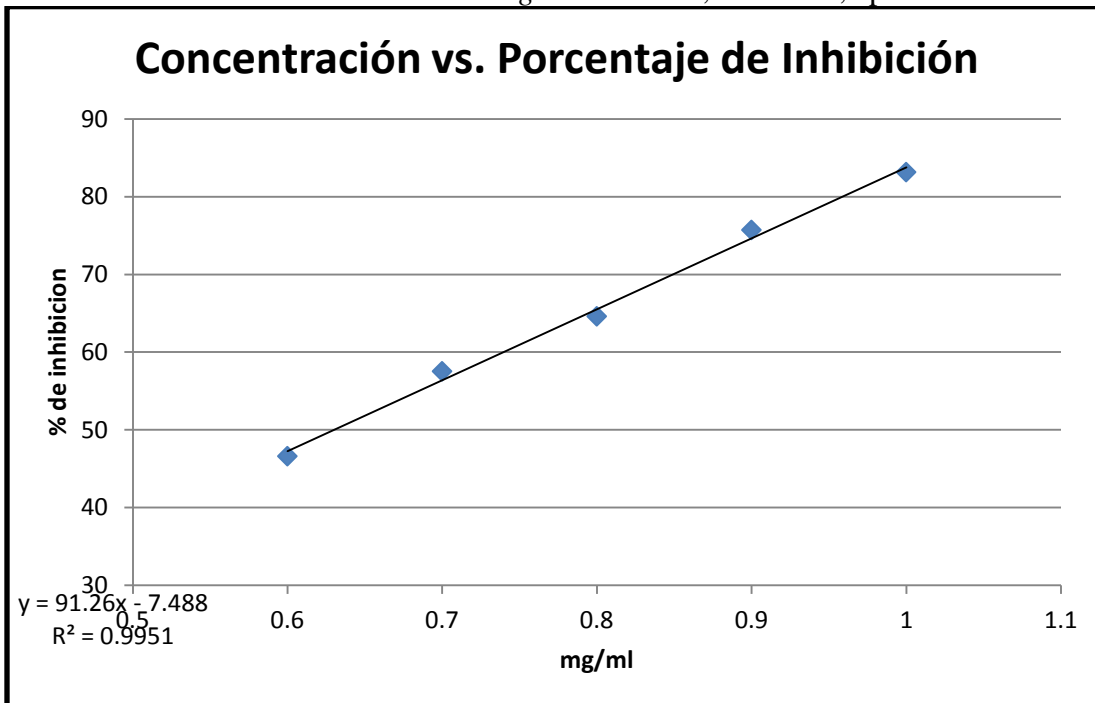
Fuente: Datos experimentales.

12.23 Extracto etanólicos de *L. guatemalensis*, Cerro Alux, época seca.



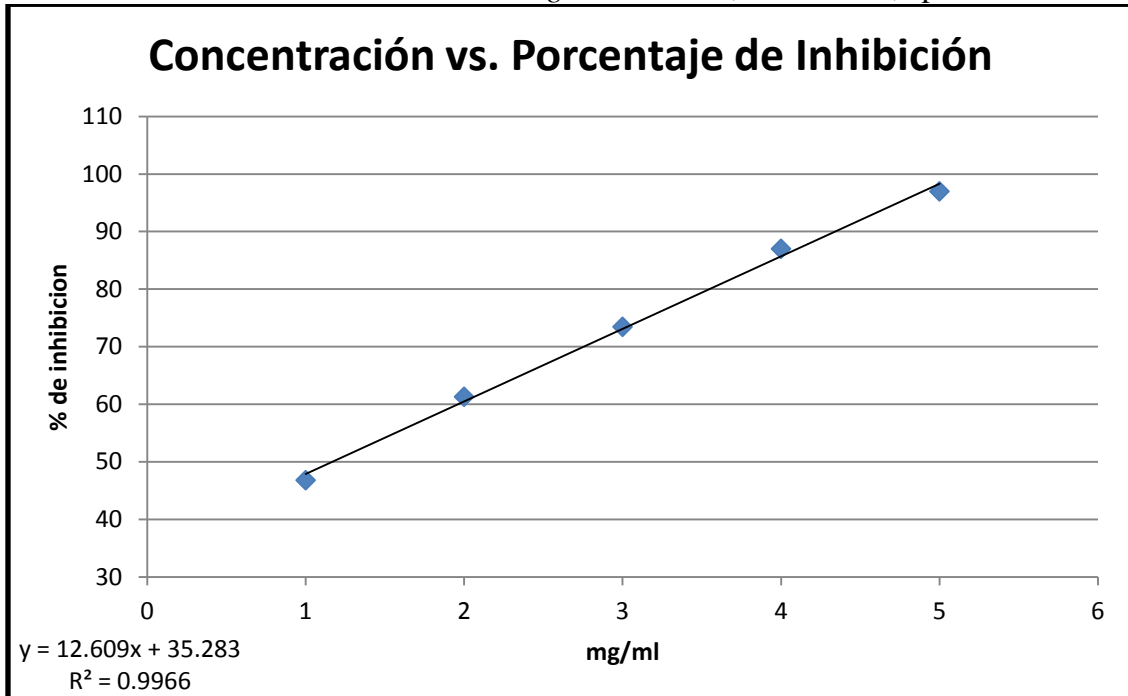
Fuente: Datos experimentales

12.24 Extracto etanólicos de *L. guatemalensis*, Florencia, época seca.



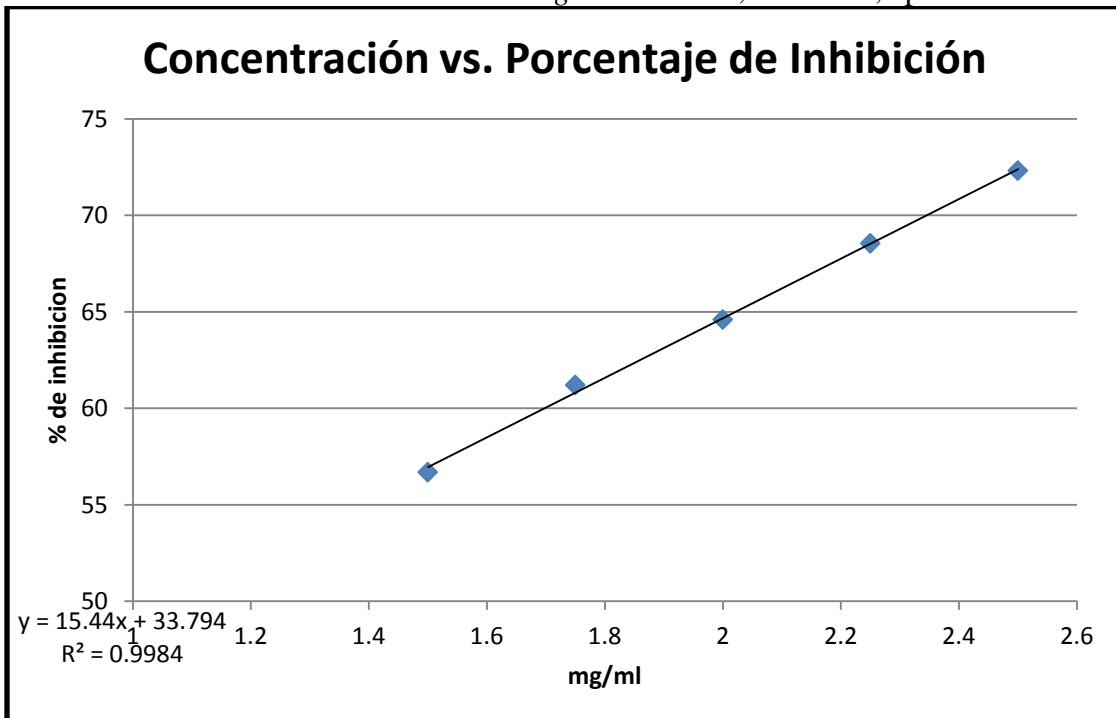
Fuente: Datos experimentales

12.25 Extracto diclorometano de *L. guatemalensis*, Cerro Alux, época seca.



Fuente: Datos experimentales

12.26 Extracto diclorometano de *L. guatemalensis*, Florencia, época seca.



Fuente: Datos experimentales

12.27 Actividad antibacteriana, tamizaje extracto diclorometano

	Época Seca				Época Húmeda				Control Negativo		Controles Positivos			
	Florencia		Cerro		Florencia		Cerro				Ampicilina Sulbactam		Vancomicina	
Bacterias	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>S. aureus</i> ¹	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	--	++	++
<i>S. typhi</i> ²	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	--	--	--
<i>M. smegmatis</i> ³	+++	+	+++	+	+++	+	---	-	+++	+	---	-	--	--
<i>B. subtilis</i> ⁴	---	-	---	-	---	-	---	-	+++	+	---	-	---	-
<i>P. aeruginosa</i> ⁵	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	--	--	--
<i>E. coli</i> ⁶		++++		----		++++		++++		++++		----		----

Fuente: Datos experimentales. 1. *Staphylococcus aureus*, 2. *Salmonella typhi*, 3. *Mycobacterium smegmatis* 4. *Bacillus subtilis*, 5. *Pseudomona aeruginosa*, 6. *Escherichia coli*.

Nota: la concentración de los extractos en el tamizaje es de 1mg/ml, incluyendo controles positivos y negativos

12.28 Actividad antimicótica, tamizaje de extracto diclorometano

	Época seca				Época húmeda				Control Negativo		Controles Positivos			
	Florencia		Cerro		Florencia		Cerro				Ampicilina Sulbactam		Vancomicina	
Hongo	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>C. albicans</i> ¹	+	+++	-	---	-	---	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++

Fuente: Datos experimentales. 1. *Candida albicans*.

Nota: la concentración de los extractos en el tamizaje es de 1mg/ml, incluyendo controles positivos y negativos

12.29 Tamizaje de actividad antibacteriana, extracto etanolico

Bacterias	Época seca				Época húmeda				Control Negativo		Controles Positivos			
	Florenia		Cerro		Florenia		Cerro				Ampicilina Sulbactam		Vancomicina	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>S. aureus</i> ¹	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	--	++	++
<i>S. typhi</i> ²	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	--	--	--
<i>M. smegmatis</i> ³	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	---	-	--	--
<i>B. subtilis</i> ⁴	---	-	+++	+	+++	+	+++	-	+++	+	---	-	---	-
<i>P. aeruginosa</i> ⁵	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--	--	--	--
<i>E. coli</i> ⁶		++++		++++		++++		++++		++++		----		----

Fuente: Datos experimentales. 1. *Staphylococcus aureus*, 2. *Salmonella typhi*, 3. *Mycobacterium smegmatis*, 4. *Bacillus subtilis*, 5. *Pseudomonas aeruginosa*, 6. *Escherichia coli*.

Nota: la concentración de los extractos en el tamizaje es de 1mg/ml, incluyendo controles positivos y negativos

12.30 Tamizaje de la actividad antimicótica, extracto etanolico.

Hongo	Época seca				Época húmeda				Control Negativo		Controles Positivos			
	Florenia		Cerro		Florenia		Cerro				Ampicilina Sulbactam		Vancomicina	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>C. albicans</i> ¹	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++

Fuente: Datos experimentales. 1. *Candida albicans*.

Nota: la concentración de los extractos en el tamizaje es de 1mg/ml, incluyendo controles positivos y negativos

12.31 Diluciones actividad antibacteriana, extracto de diclorometano

		Extractos de Diclorometano															
		Época Húmeda								Época Seca							
Bacterias	Diluciones [mg/ml]	Cerro				Florencia				Cerro				Florencia			
<i>B. subtilis</i> ¹	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.75	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ²	1.00	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	0.75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. smegamatis</i> ³	1.00	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.75	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.50	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Datos experimentales. 1. *Bacillus subtilis*, 2. *Escherichia coli*, 3. *Mycobacterium smegamatis*.

12.32 Diluciones actividad antimicótica, extracto de diclorometano

		Extractos de Diclorometano															
		Época Húmeda								Época Seca							
Hongo	Diluciones [mg/ml]	Cerro				Florencia				Cerro				Florencia			
<i>C. albicans</i> ¹	1.00	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	0.75	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.50	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Datos experimentales. 1. *Candida albicans*.

12.33 tamizaje de actividad antimicrobiana en aceite esencial

		Halo de inhibición (cm)															
		Época Húmeda								Época Seca							
Bacterias		Cerro				Florencia				Cerro				Florencia			
<i>S. aureus</i> ¹		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>S. typhi</i> ²		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>M. smegmatis</i> ³		1.0	1.0	1.1	1.0	1.2	1.2	1.1	1.3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>B. subtilis</i> ⁴		1.1	1.2	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.0	1.1	1.0	0.9
<i>P. aeruginosa</i> ⁵		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>E. coli</i> ⁶		1.0	0.8	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Fuente: Datos experimentales. 1. *Staphylococcus aureus*, 2. *Salmonella typhi*, 3. *Mycobacterium smegmatis*, 4. *Bacillus subtilis*, 5. *Pseudomonas aeruginosa*, 6. *Escherichia coli*.

12.34 Tamizaje de actividad antimicótica en aceite esencial

		Halo de inhibición (cm)															
		Época Húmeda								Época Seca							
Hongo		Cerro				Florencia				Cerro				Florencia			
<i>C. albicans</i> ¹		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Fuente: Datos experimentales. 1. *Candida albicans*.

12.35 Diluciones de actividad antibacteriana en aceite esencial

		Halo de inhibición (cm)															
		Epoca Húmeda								Epoca Seca							
Bacterias	Diluciones [µg/ml]	Cerro				Florencia				Cerro				Florencia			
<i>M. smegmatis</i> ¹	2.5	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	5.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6
	7.5	1.0	1.2	1.4	1.4	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
	10.0	1.3	1.4	1.3	1.3	0.9	0.9	0.9	1.0	1.8	1.8	1.8	1.8	0.9	0.8	0.9	0.8
<i>B. subtilis</i> ²	2.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
	5.0	0.8	0.9	0.8	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7
	7.5	0.9	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	0.8	1.2	1.2	1.2	1.2	0.8	0.8	0.9	0.9
	10.0	1.2	1.3	1.2	1.4	1.0	1.0	0.9	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0
<i>E. coli</i> ³	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7.5	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0
	10.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.0	1.1	1.0	1.0	1.2	1.1	1.0	1.2

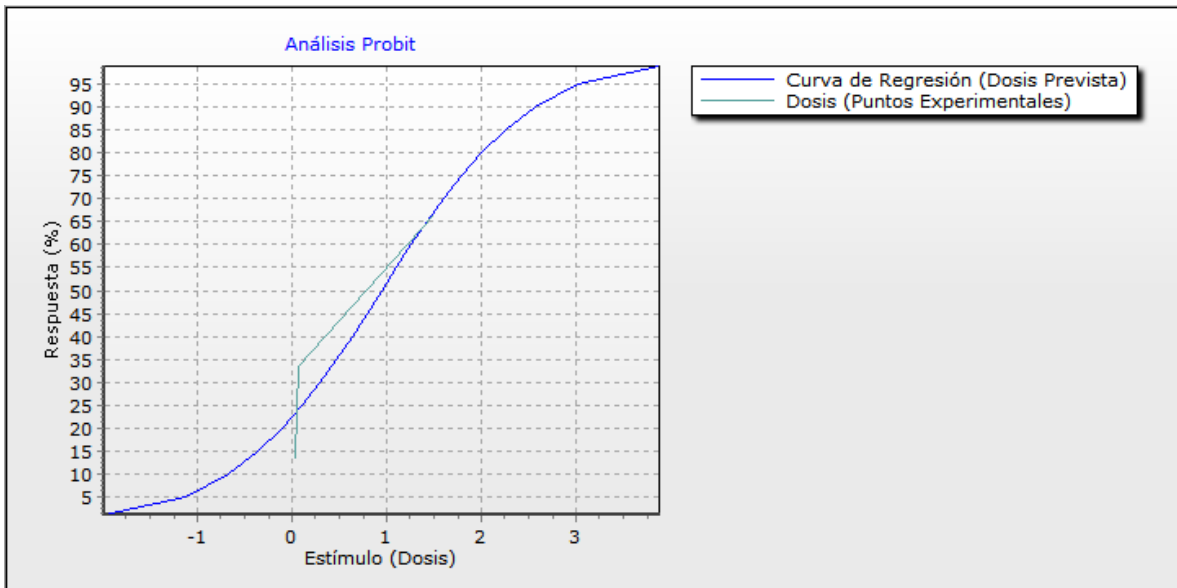
Fuente: Datos experimentales. 1. *Mycobacterium smegmatis*. 2. *Bacillus subtilis*. 3. *Escherichia coli*.

12.36 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Artemia salina*, concentración letal media. Florencia, época húmeda.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.1333	30	3.8892	3.1675
0.0625	0.3333	30	4.5697	4.5697
1.5	0.6667	30	5.4303	4.5697
Estadísticos de Regresión				
LD50	0.9478	LD50 Error Estándar	0.1883	
LD50 LCL	0.5736	LD50 UCL	1.3219	
Beta	0.7916	Intercepto	4.2497	
Beta Error Estándar	0.406			
LD10	-0.6713	LD16	-0.3154	
LD84	2.211	LD90	2.5669	
LD100	2.8426			

Fuente: Datos experimentales

12.37 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Artemia salina*, concentración letal media. Florencia, época húmeda.



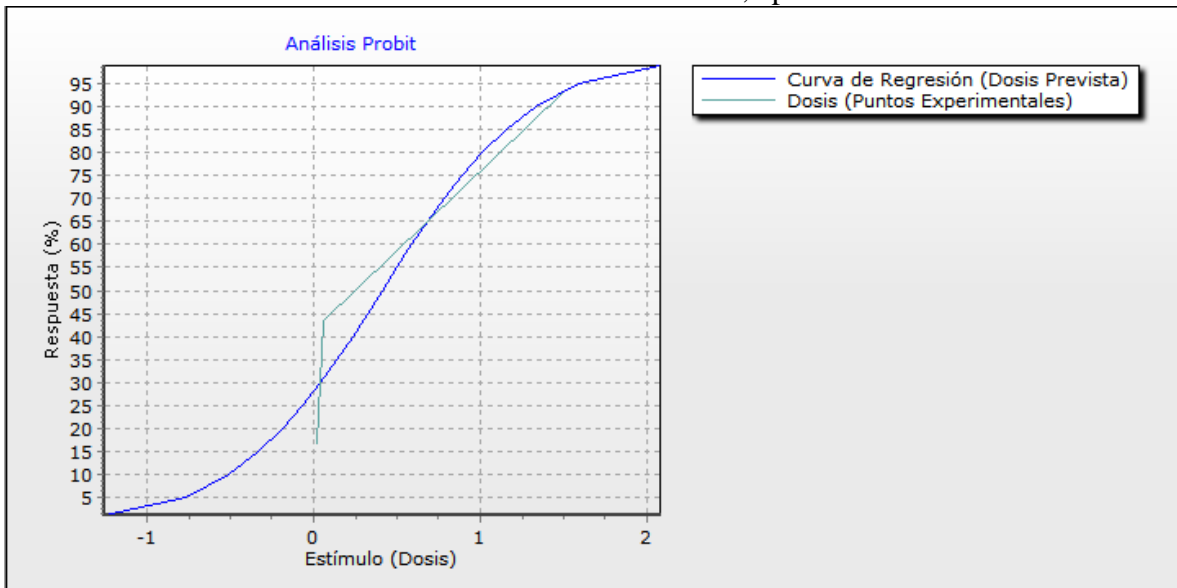
Fuente: Datos experimentales

12.38 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Artemia salina*, concentración letal media. Florencia, época seca.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.1667	30	4.0326	3.5653
0.0625	0.4333	30	4.8324	4.8324
1.5	0.9333	30	6.5014	1.9972
Estadísticos de Regresión				
LD50	0.4125	LD50 Error Estándar	0.1305	
LD50 LCL	0.1513	LD50 UCL	0.6737	
Beta	1.3988	Intercepto	4.423	
Beta Error Estándar	0.5414			
LD10	-0.5038	LD16	-0.3024	
LD84	1.1274	LD90	1.3288	
LD100	1.4848			

Fuente: Datos experimentales

12.39 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Artemia salina*, concentración letal media. Florencia, época seca.



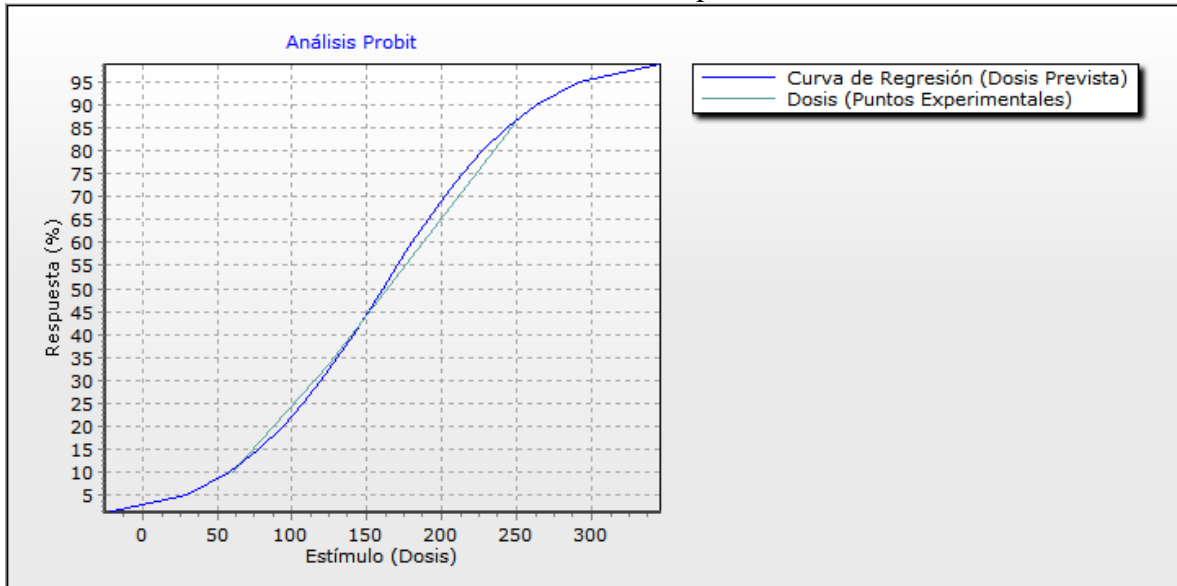
Fuente: Datos experimentales

12.40 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.1	30	3.7183	2.6548
125	0.3333	30	4.5697	4.5697
250	0.8667	30	6.1108	3.1675
Estadísticos de Regresión				
LD50	160.7012	LD50 Error Estándar	11.8928	
LD50 LCL	137.0704	LD50 UCL	184.332	
Beta	0.0125	Intercepto	2.9857	
Beta Error Estándar	0.0042			
LD10	58.4455	LD16	80.9217	
LD84	240.4807	LD90	262.9569	
LD100	280.3704			

Fuente: Datos experimentales

12.41 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 3.



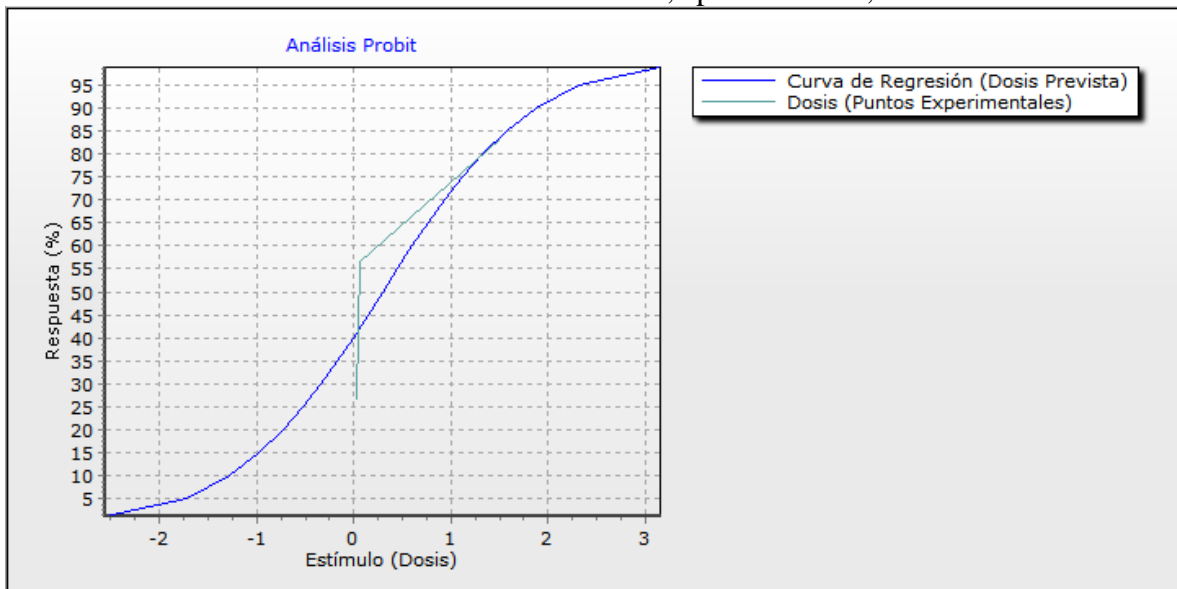
Fuente: Datos experimentales

12.42 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.2667	30	4.3774	4.2548
0.0625	0.5667	30	5.1676	4.8324
1.5	0.8333	30	5.9674	3.5653
Estadísticos de Regresión				
LD50	0.299	LD50 Error Estándar	0.1827	
LD50 LCL	-0.0641	LD50 UCL	0.6621	
Beta	0.8158	Intercepto	4.7561	
Beta Error Estándar	0.4294			
LD10	-1.2721	LD16	-0.9267	
LD84	1.5248	LD90	1.8701	
LD100	2.1377			

Fuente: Datos experimentales

12.43 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 3.



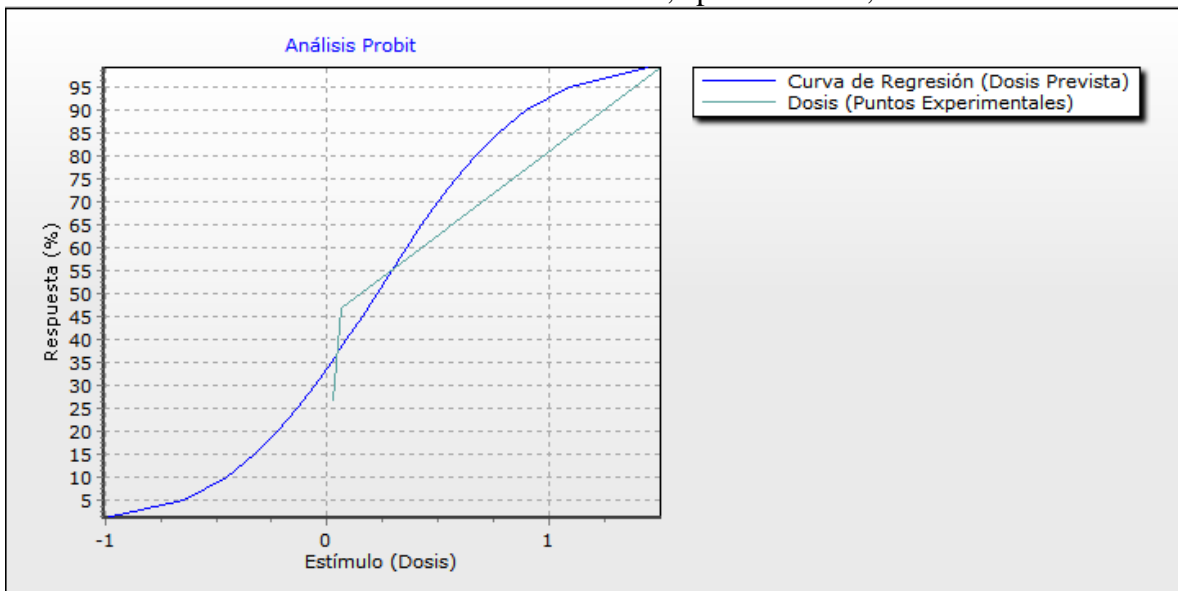
Fuente: Datos experimentales

12.44 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 4.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.2667	30	4.3774	4.2548
0.0625	0.4667	30	4.9166	4.9166
1.5	0.9917	30	7.3944	1
Estadísticos de Regresión				
LD50	0.2226	LD50 Error Estándar	0.0963	
LD50 LCL	0.0299	LD50 UCL	0.4153	
Beta	1.896	Intercepto	4.5779	
Beta Error Estándar	0.7232			
LD10	-0.4534	LD16	-0.3048	
LD84	0.75	LD90	0.8986	
LD100	1.0138			

Fuente: Datos experimentales

12.45 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 4.



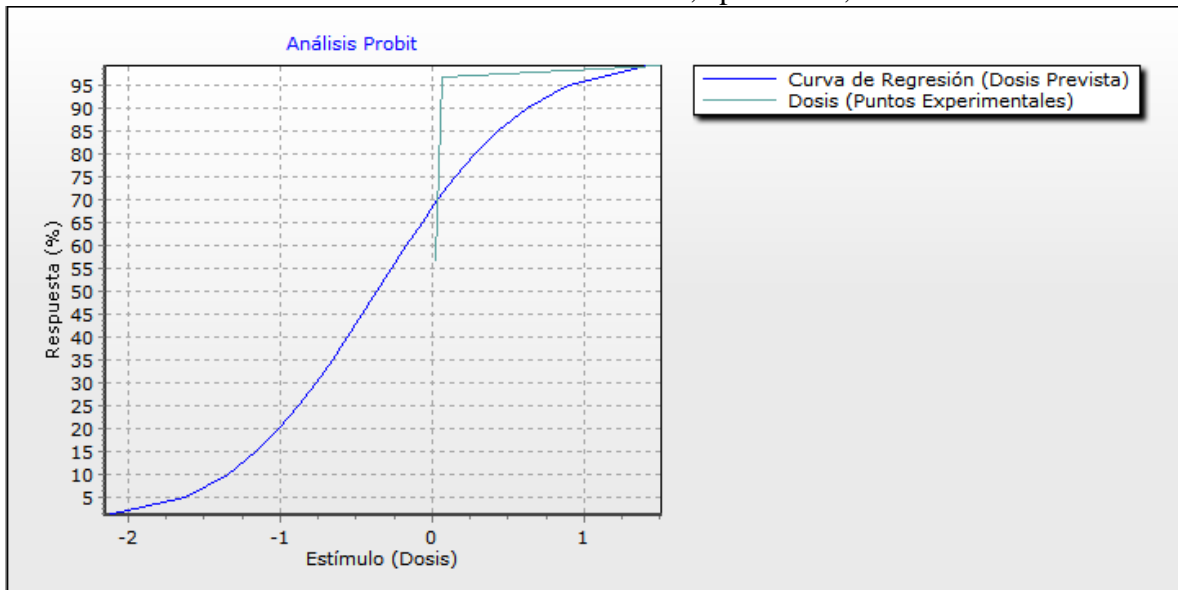
Fuente: Datos experimentales

12.46 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.5667	30	5.1676	4.8324
0.0625	0.9667	30	6.8343	1.3314
1.5	0.9917	30	7.3944	1
Estadísticos de Regresión				
LD50	-0.3652	LD50 Error Estándar	0.1976	
LD50 LCL	-0.7693	LD50 UCL	0.0388	
Beta	1.3068	Intercepto	5.4773	
Beta Error Estándar	0.7346			
LD10	-1.346	LD16	-1.1304	
LD84	0.4	LD90	0.6155	
LD100	0.7826			

Fuente: Datos experimentales

12.47 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 3.



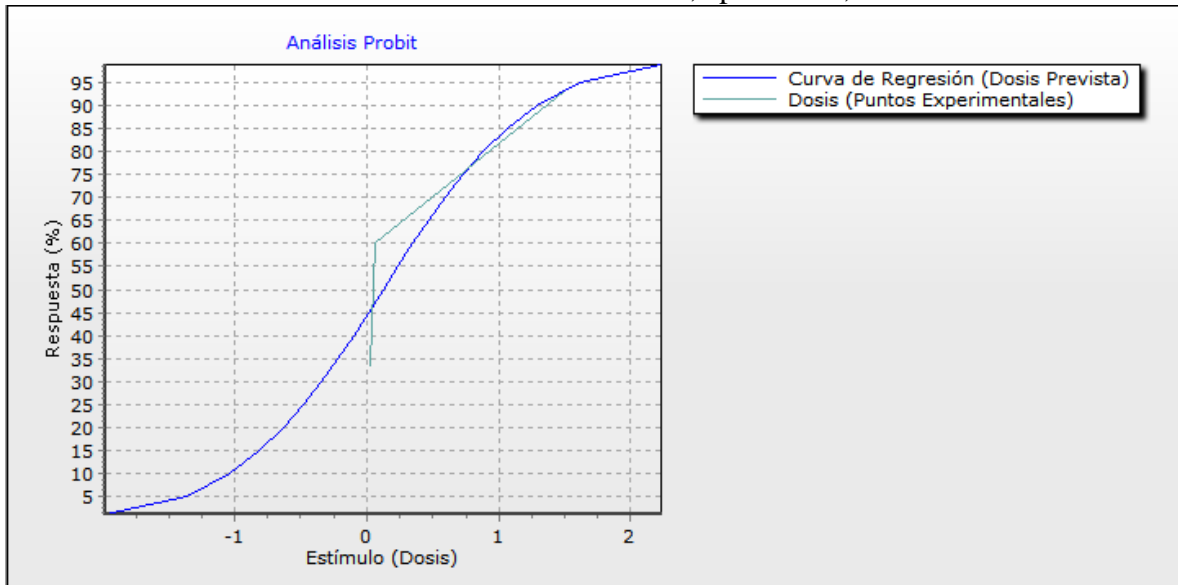
Fuente: Datos experimentales

12.48 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 4.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.3333	30	4.5697	4.5697
0.0625	0.6	30	5.2529	4.7471
1.5	0.9333	30	6.5014	1.9972
Estadísticos de Regresión				
LD50	0.1223	LD50 Error Estándar	0.1654	
LD50 LCL	-0.2087	LD50 UCL	0.4533	
Beta	1.1038	Intercepto	4.865	
Beta Error Estándar	0.5353			
LD10	-1.0389	LD16	-0.7837	
LD84	1.0283	LD90	1.2835	
LD100	1.4813			

Fuente: Datos experimentales

12.49 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 4.



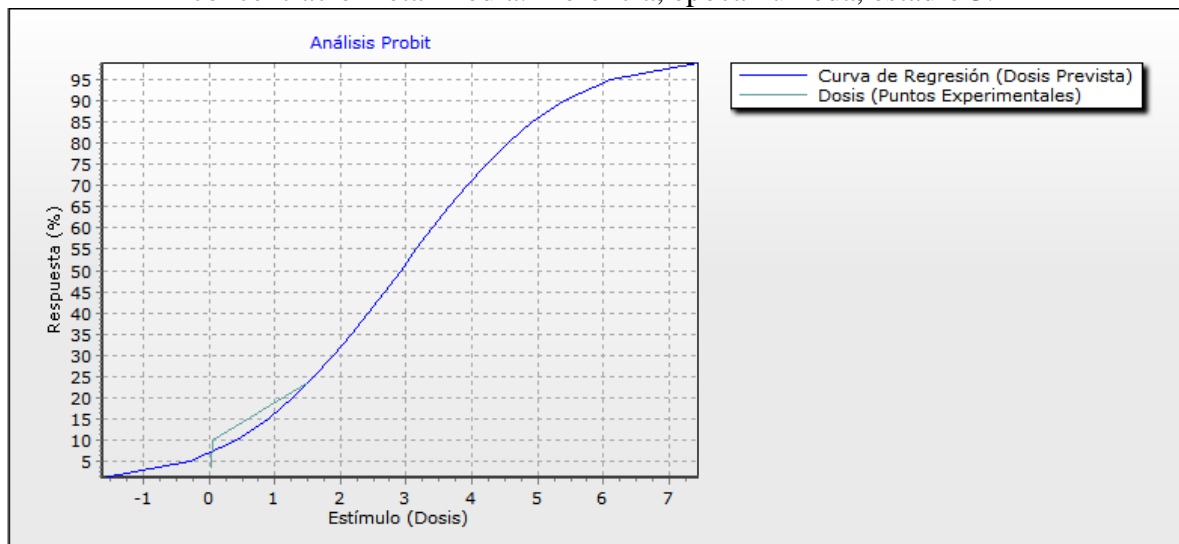
Fuente: Datos experimentales

12.50 Actividad citotóxica de aceite esencial contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.0333	30	3.1657	1.3314
0.0625	0.1	30	3.7183	2.6548
1.5	0.2333	30	4.2723	4.0447
Estadísticos de Regresión				
LD50	2.9109	LD50 Error Estándar	0.3555	
LD50 LCL	2.1996	LD50 UCL	3.6222	
Beta	0.5136	Intercepto	3.505	
Beta Error Estándar	0.4867			
LD10	0.4153	LD16	0.9638	
LD84	4.8579	LD90	5.4065	
LD100	5.8315			

Fuente: Datos experimentales

12.51 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 3.



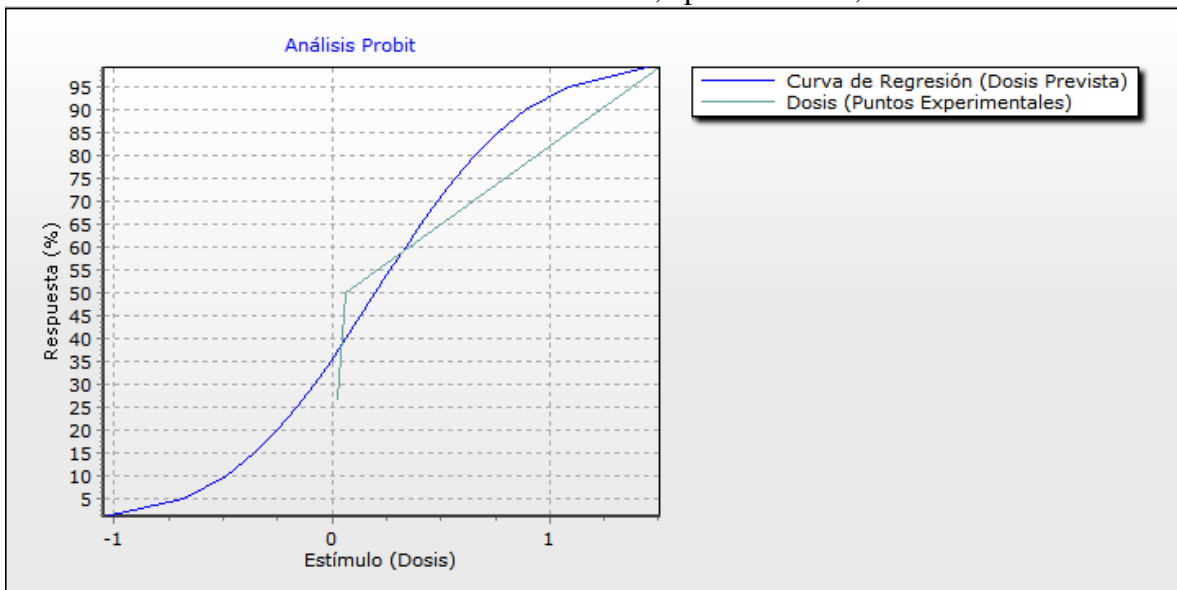
Fuente: Datos experimentales

12.52 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 4.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]					
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)	
0.025	0.2667	30	4.3774	4.2548	
0.0625	0.5	30	5	5	
1.5	0.9917	30	7.3944	1	
Estadísticos de Regresión					
LD50	0.2004	LD50 Error Estándar	0.0978		
LD50 LCL	0.0048	LD50 UCL	0.396		
Beta	1.8676	Intercepto	4.6257		
Beta Error Estándar	0.723				
LD10	-0.4859	LD16	-0.335		
LD84	0.7358	LD90	0.8867		
LD100	1.0036				

Fuente: Datos experimentales

12.53 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 4.



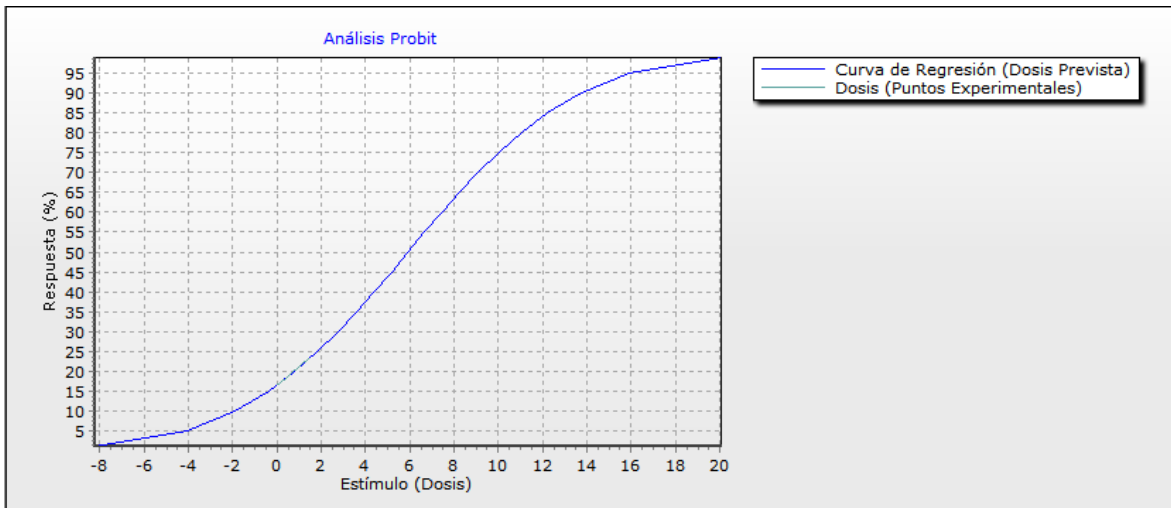
Fuente: Datos experimentales

12.54 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.1	30	3.7183	2.6548
125	0.1333	30	3.8892	3.1675
250	0.3333	30	4.5697	4.5697
Estadísticos de Regresión				
LD50	345.3835	LD50 Error Estándar	31.7273	
LD50 LCL	282.342	LD50 UCL	408.4251	
Beta	0.0047	Intercepto	3.3772	
Beta Error Estándar	0.0039			
LD10	72.5888	LD16	132.5501	
LD84	558.2169	LD90	618.1782	
LD100	664.6336			

Fuente: Datos experimentales

12.55 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 3.



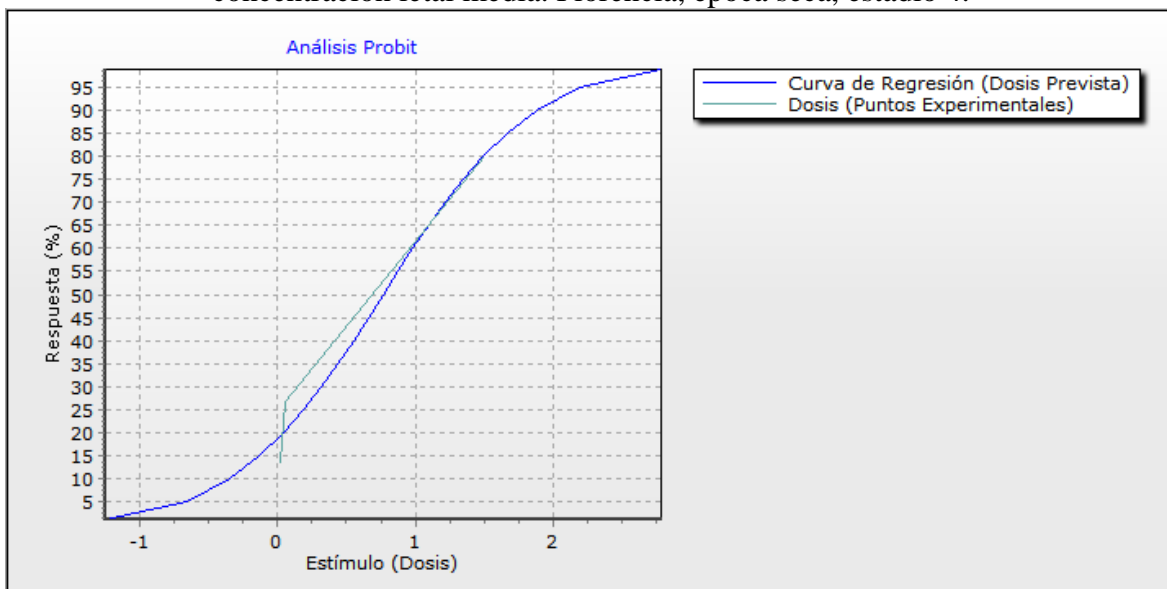
Fuente: Datos experimentales

12.56 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 4.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.1333	30	3.8892	3.1675
0.0625	0.2667	30	4.3774	4.2548
1.5	0.8	30	5.8415	3.8171
Estadísticos de Regresión				
LD50	0.7676	LD50 Error Estándar	0.1289	
LD50 LCL	0.5114	LD50 UCL	1.0237	
Beta	1.1563	Intercepto	4.1125	
Beta Error Estándar	0.4332			
LD10	-0.3409	LD16	-0.0973	
LD84	1.6324	LD90	1.876	
LD100	2.0648			

Fuente: Datos experimentales

12.57 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 4.



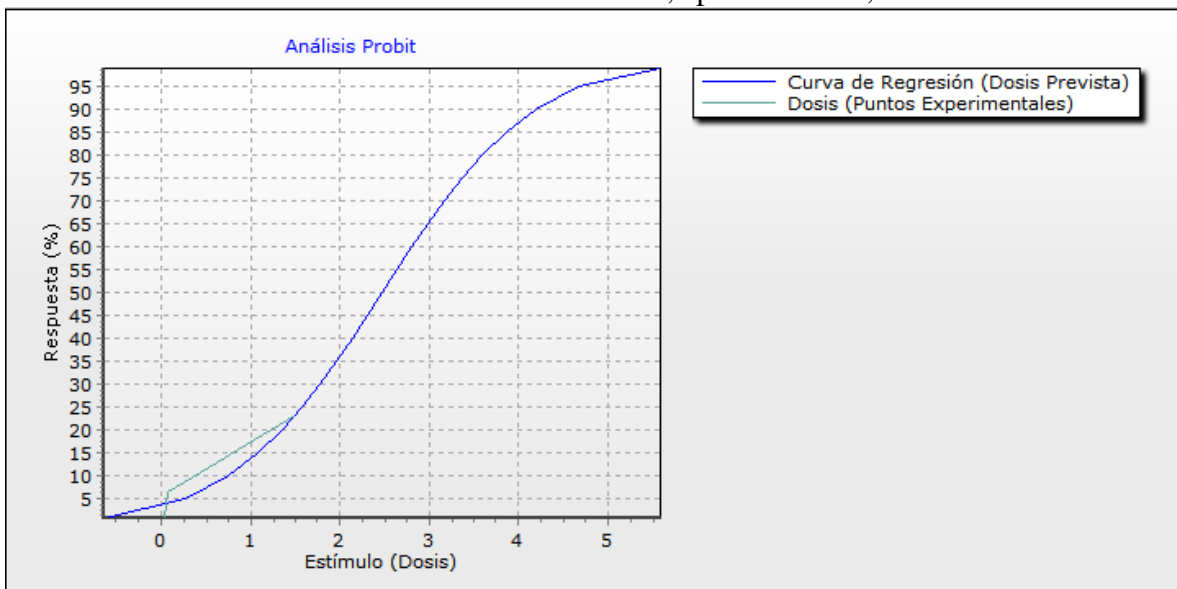
Fuente: Datos experimentales

12.58 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 1.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.0083	30	2.6056	1
0.0625	0.0667	30	3.4986	1.9972
1.5	0.2333	30	4.2723	4.0447
Estadísticos de Regresión				
LD50	2.4717	LD50 Error Estándar	0.3465	
LD50 LCL	1.7629	LD50 UCL	3.1805	
Beta	0.7451	Intercepto	3.1584	
Beta Error Estándar	0.5256			
LD10	0.7514	LD16	1.1295	
LD84	3.8139	LD90	4.192	
LD100	4.485			

Fuente: Datos experimentales

12.59 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 1.



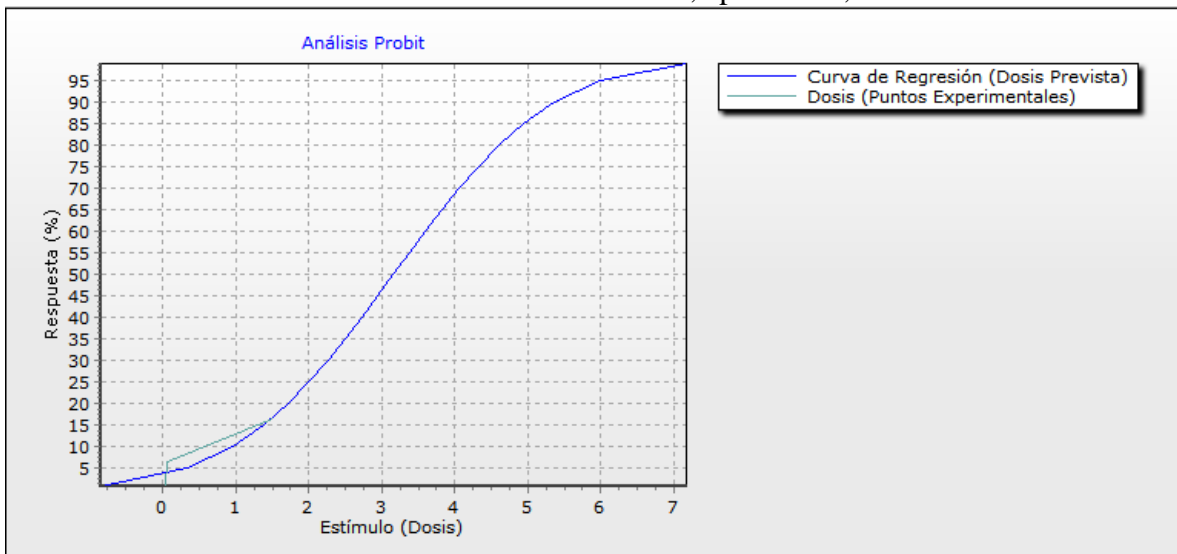
Fuente: Datos experimentales

12.60 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 1.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.0083	30	2.6056	1
0.0625	0.0667	30	3.4986	1.9972
1.5	0.1667	30	4.0326	3.5653
Estadísticos de Regresión				
LD50	3.1602	LD50 Error Estándar	0.4451	
LD50 LCL	2.25	LD50 UCL	4.0705	
Beta	0.5801	Intercepto	3.1667	
Beta Error Estándar	0.5404			
LD10	0.9509	LD16	1.4365	
LD84	4.884	LD90	5.3696	
LD100	5.7459			

Fuente: Datos experimentales

12.61 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 1.



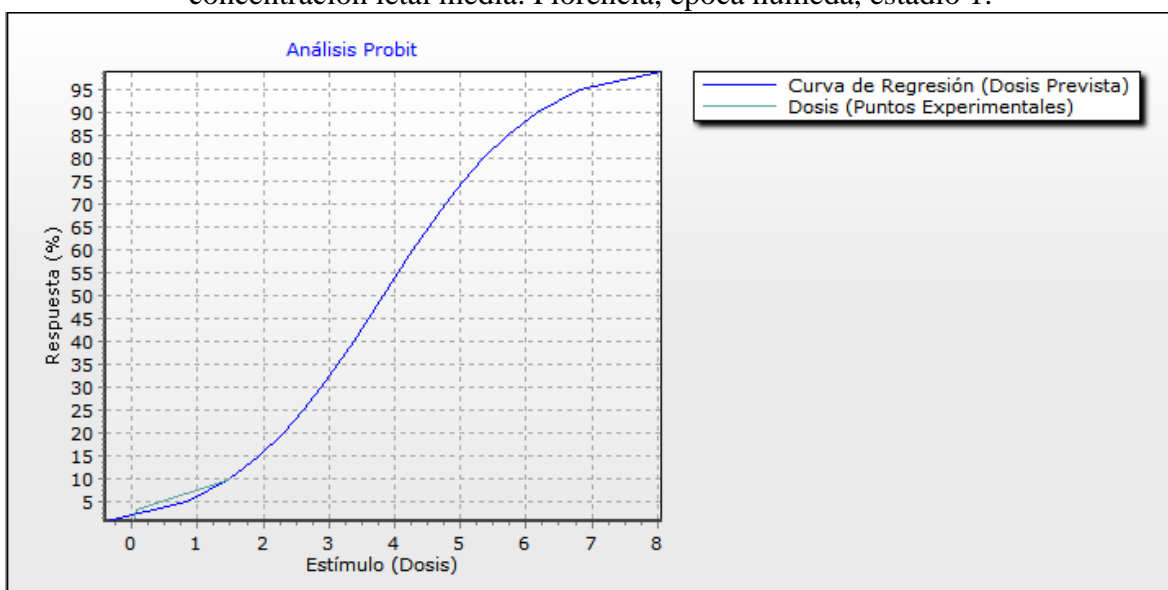
Fuente: Datos experimentales

12.62 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 1.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.0083	30	2.6056	1
0.0625	0.0333	30	3.1657	1.3314
1.5	0.1	30	3.7183	2.6548
Estadísticos de Regresión				
LD50	3.8256	LD50 Error Estándar	0.4696	
LD50 LCL	2.8652	LD50 UCL	4.7861	
Beta	0.5498	Intercepto	2.8965	
Beta Error Estándar	0.6174			
LD10	1.4946	LD16	2.0069	
LD84	5.6444	LD90	6.1567	
LD100	6.5537			

Fuente: Datos experimentales

12.63 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 1.



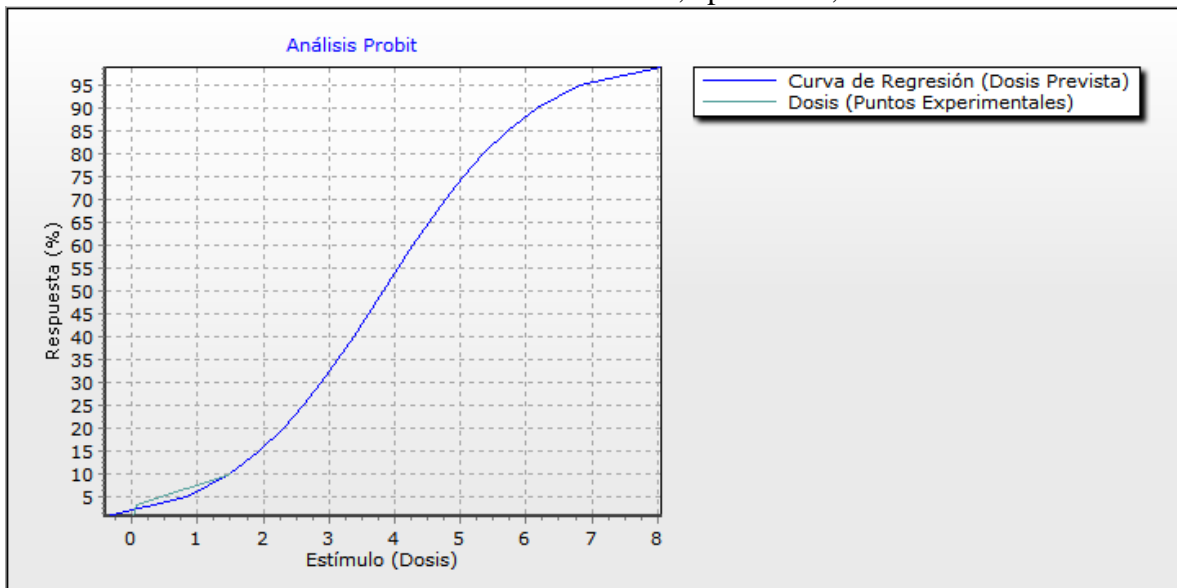
Fuente: Datos experimentales

12.64 Actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 1.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
0.025	0.0083	30	2.6056	1
0.0625	0.0333	30	3.1657	1.3314
1.5	0.1	30	3.7183	2.6548
Estadísticos de Regresión				
LD50	3.8256	LD50 Error Estándar	0.4696	
LD50 LCL	2.8652	LD50 UCL	4.7861	
Beta	0.5498	Intercepto	2.8965	
Beta Error Estándar	0.6174			
LD10	1.4946	LD16	2.0069	
LD84	5.6444	LD90	6.1567	
LD100	6.5537			

Fuente: Datos experimentales

12.65 Gráfica de actividad citotóxica de aceites esenciales contra *Aedes aegypti*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 1.



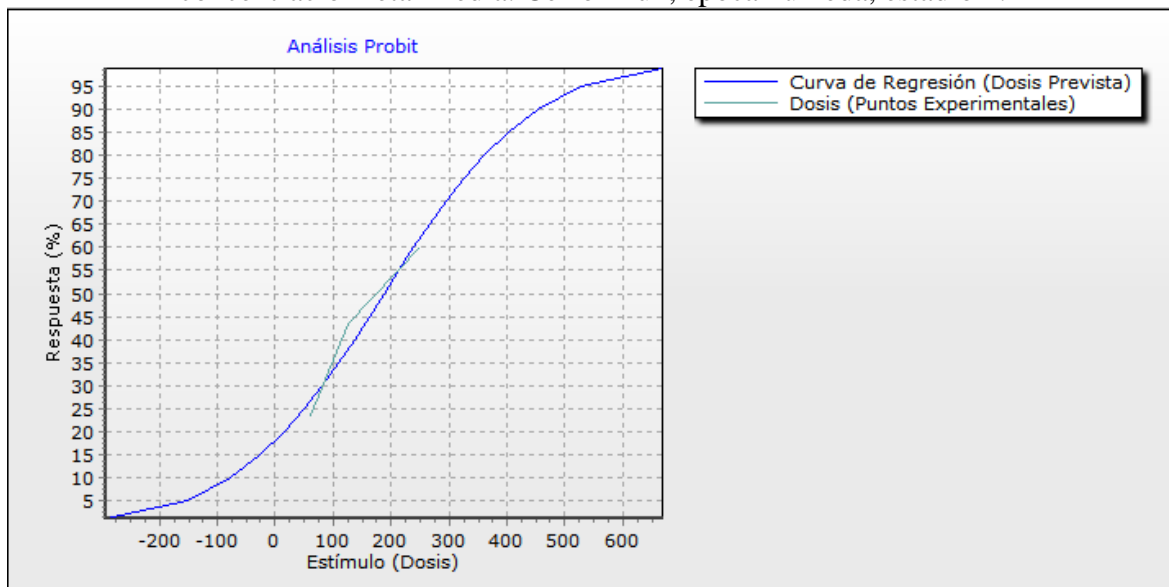
Fuente: Datos experimentales

12.66 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 2.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.2333	30	4.2723	4.0447
125	0.4333	30	4.8324	4.8324
250	0.6	30	5.2529	4.7471
Estadísticos de Regresión				
LD50	187.9228	LD50 Error Estándar	30.7701	
LD50 LCL	126.7832	LD50 UCL	249.0623	
Beta	0.0048	Intercepto	4.0896	
Beta Error Estándar	0.0035			
LD10	-76.6416	LD16	-18.4894	
LD84	394.3349	LD90	452.4872	
LD100	497.541			

Fuente: Datos experimentales

12.67 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 2.



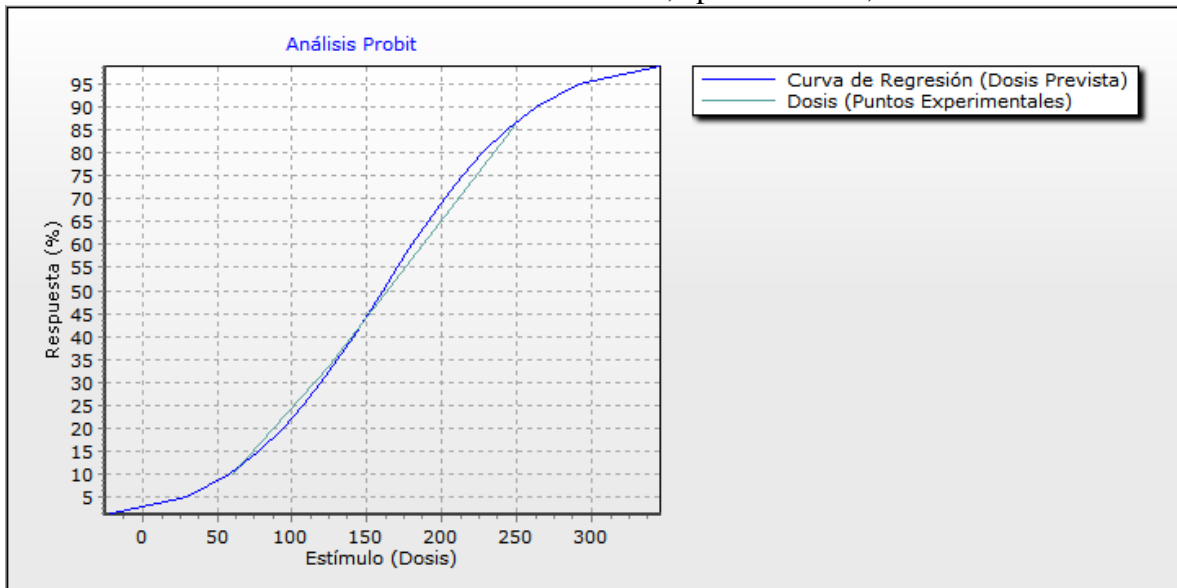
Fuente: Datos experimentales

12.68 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.1	30	3.7183	2.6548
125	0.3333	30	4.5697	4.5697
250	0.8667	30	6.1108	3.1675
Estadísticos de Regresión				
LD50	160.7012	LD50 Error Estándar	11.8928	
LD50 LCL	137.0704	LD50 UCL	184.332	
Beta	0.0125	Intercepto	2.9857	
Beta Error Estándar	0.0042			
LD10	58.4455	LD16	80.9217	
LD84	240.4807	LD90	262.9569	
LD100	280.3704			

Fuente: Datos experimentales

12.69 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época húmeda, estadio 3.



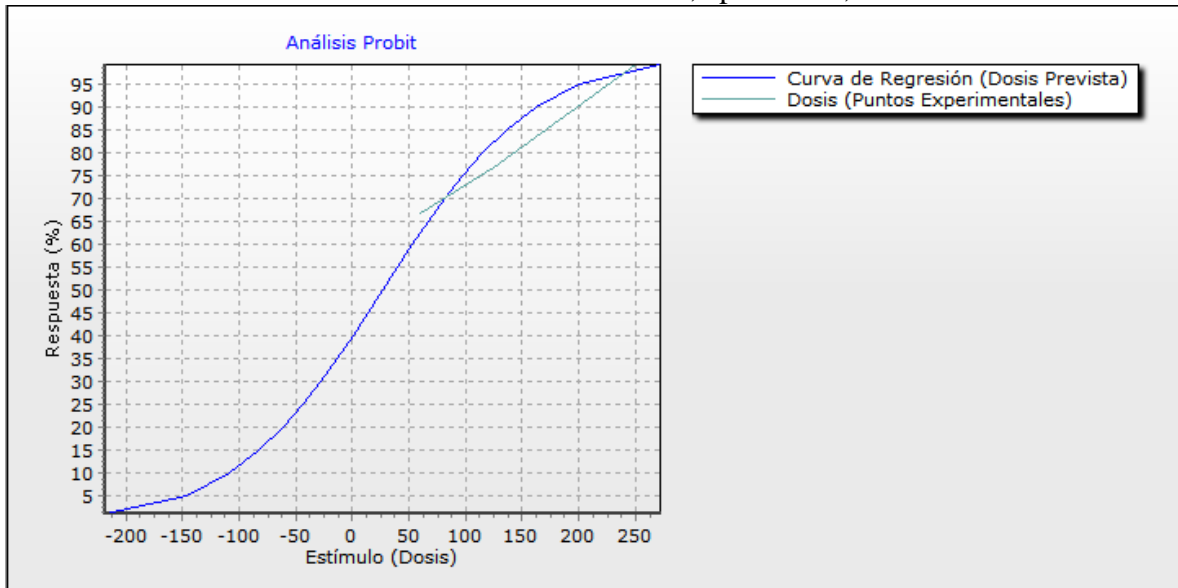
Fuente: Datos experimentales

12.70 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 2.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.6667	30	5.4303	4.5697
125	0.7667	30	5.7277	4.0447
250	0.9917	30	7.3944	1
Estadísticos de Regresión				
LD50	27.0264	LD50 Error Estándar	19.2458	
LD50 LCL	-11.4843	LD50 UCL	65.5372	
Beta	0.0095	Intercepto	4.7436	
Beta Error Estándar	0.0056			
LD10	-108.0852	LD16	-78.3871	
LD84	132.44	LD90	162.1381	
LD100	185.1468			

Fuente: Datos experimentales

12.71 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 2.



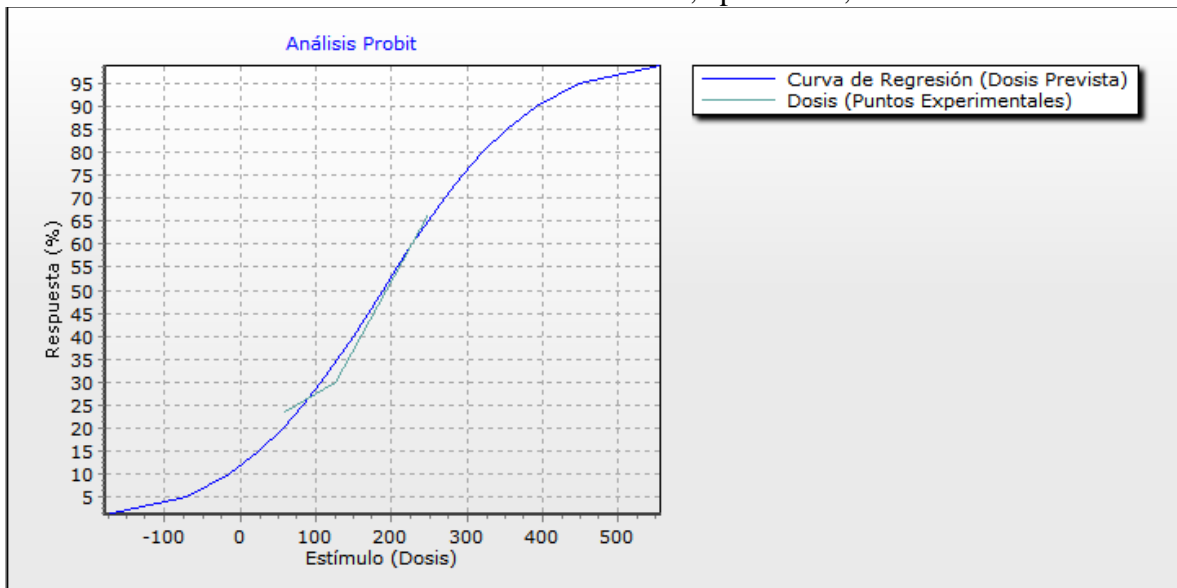
Fuente: Datos experimentales

12.72 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.2333	30	4.2723	4.0447
125	0.3	30	4.476	4.452
250	0.6667	30	5.4303	4.5697
Estadísticos de Regresión				
LD50	188.5263	LD50 Error Estándar	23.5001	
LD50 LCL	141.832	LD50 UCL	235.2205	
Beta	0.0063	Intercepto	3.8041	
Beta Error Estándar	0.0035			
LD10	-13.5301	LD16	30.8826	
LD84	346.1699	LD90	390.5826	
LD100	424.9917			

Fuente: Datos experimentales

12.73 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Cerro Alux, época seca, estadio 3.



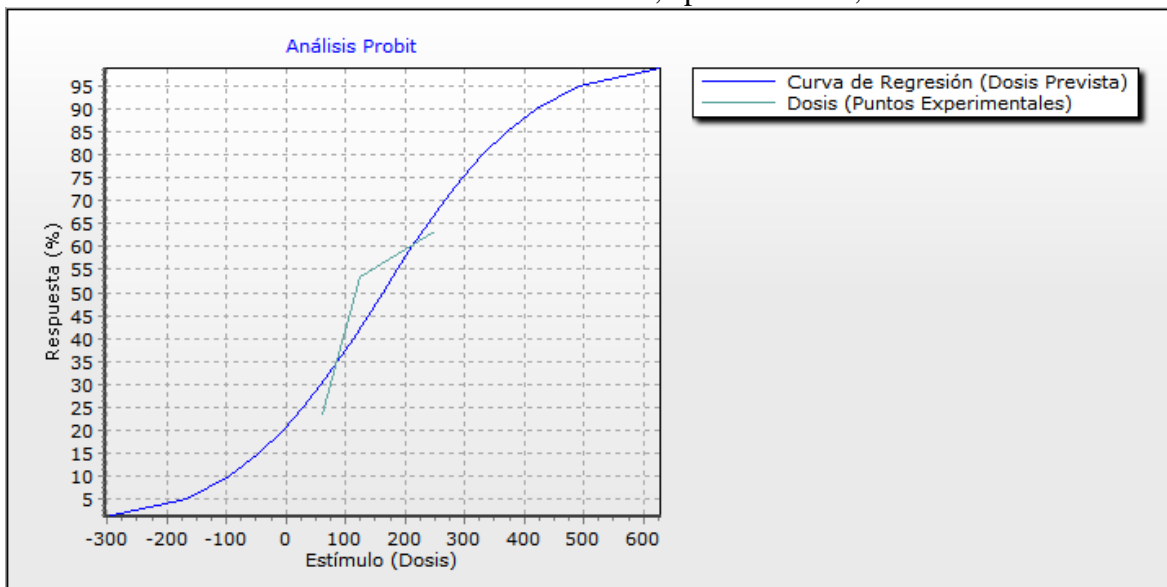
Fuente: Datos experimentales

12.74 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 2.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.2333	30	4.2723	4.0447
125	0.5333	30	5.0834	4.9166
250	0.6333	30	5.3403	4.6597
Estadísticos de Regresión				
LD50	162.3813	LD50 Error Estándar	29.8348	
LD50 LCL	103.1002	LD50 UCL	221.6624	
Beta	0.005	Intercepto	4.1887	
Beta Error Estándar	0.0035			
LD10	-94.1411	LD16	-37.7565	
LD84	362.5192	LD90	418.9038	
LD100	462.5881			

Fuente: Datos experimentales

12.75 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 2.



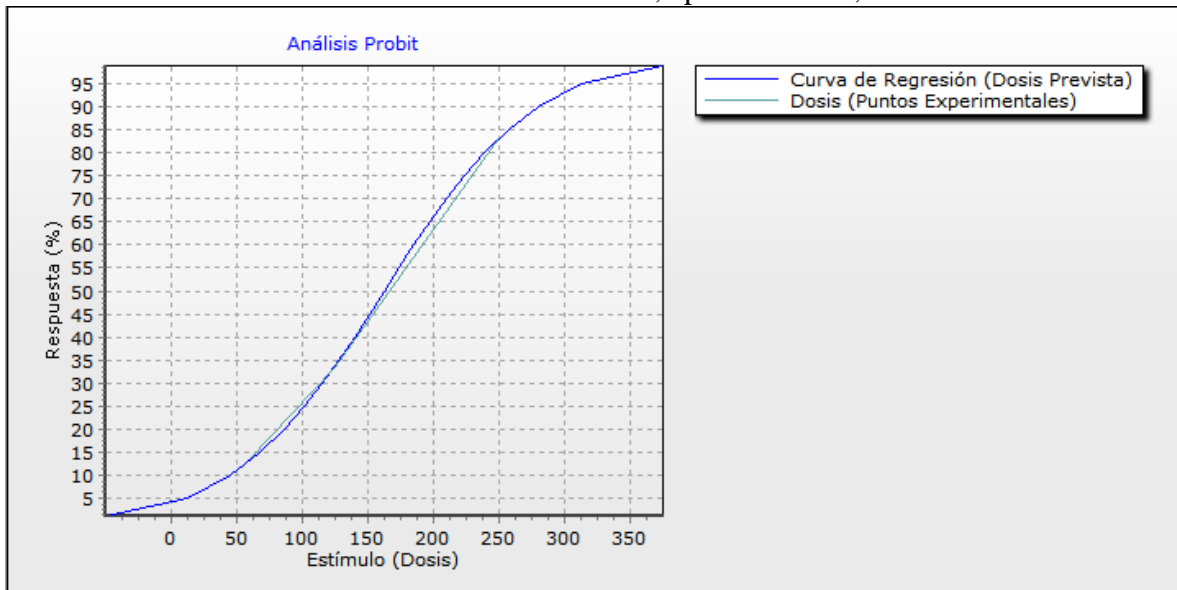
Fuente: Datos experimentales

12.76 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.1333	30	3.8892	3.1675
125	0.3333	30	4.5697	4.5697
250	0.8333	30	5.9674	3.5653
Estadísticos de Regresión				
LD50	162.6137	LD50 Error Estándar	13.5718	
LD50 LCL	135.6469	LD50 UCL	189.5805	
Beta	0.011	Intercepto	3.2139	
Beta Error Estándar	0.004			
LD10	45.9224	LD16	71.5716	
LD84	253.6558	LD90	279.305	
LD100	299.1768			

Fuente: Datos experimentales

12.77 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época húmeda, estadio 3.



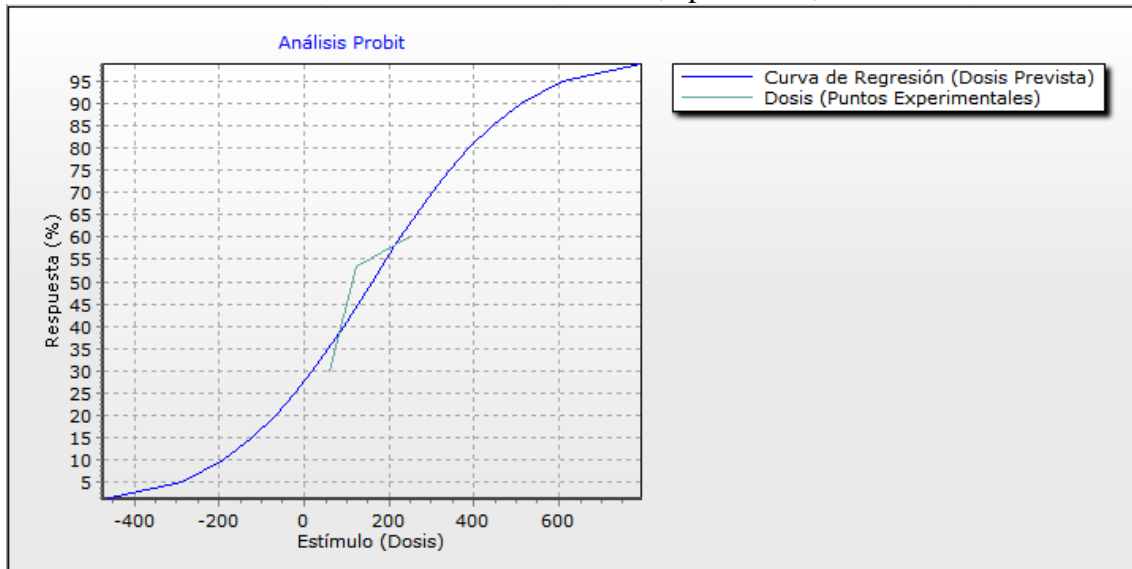
Fuente: Datos experimentales

12.78 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 2.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.3	20	4.476	4.452
125	0.5333	30	5.0834	4.9166
250	0.6	30	5.2529	4.7471
Estadísticos de Regresión				
LD50	160.4695	LD50 Error Estándar	43.0758	
LD50 LCL	74.7292	LD50 UCL	246.2098	
Beta	0.0037	Intercepto	4.411	
Beta Error Estándar	0.0034			
LD10	-188.7188	LD16	-111.9659	
LD84	432.9049	LD90	509.6578	
LD100	569.1227			

Fuente: Datos experimentales

12.79 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 2.



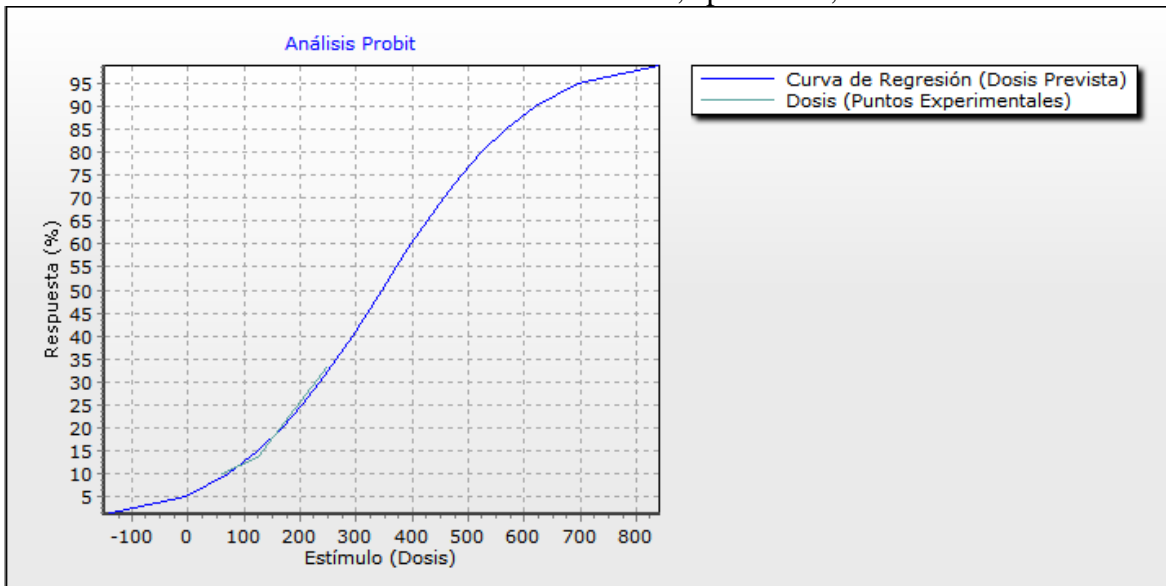
Fuente: Datos experimentales

12.80 Actividad citotóxica de extracto contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 3.

Análisis Probit - Mínimos cuadrados [Normal Distribución]				
Dosis (Estímulo)	Porcentaje Actual (%)	N	Probit (Y)	Peso (Z)
60	0.1	30	3.7183	2.6548
125	0.1333	30	3.8892	3.1675
250	0.3333	30	4.5697	4.5697
Estadísticos de Regresión				
LD50	345.3835	LD50 Error Estándar	31.7273	
LD50 LCL	282.342	LD50 UCL	408.4251	
Beta	0.0047	Intercepto	3.3772	
Beta Error Estándar	0.0039			
LD10	72.5888	LD16	132.5501	
LD84	558.2169	LD90	618.1782	
LD100	664.6336			

Fuente: Datos experimentales

12.81 Gráfica de actividad citotóxica de extractos contra *Anopheles albimanus*, concentración letal media. Florencia, época seca, estadio 3.



Fuente: Datos experimentales