

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

Evaluación de la calidad de *Litsea guatemalensis* (laurel) de marca en comparación con el  
comercializado en dos mercados de la Ciudad de Guatemala



GUATEMALA, JULIO DE 2016

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación consistió en determinar si existe diferencia en la calidad en las hojas de laurel que se distribuyen en dos mercados con respecto a dos marcas que se comercializan en dos supermercados diferentes en la ciudad de Guatemala. Los mercados seleccionados para este estudio fueron el Mercado Central y el Mercado Central de Mayoreo (CENMA), y las marcas comerciales de laurel seleccionadas fueron la marca Mahler que se comercializa en los supermercados Paiz y la marca comercial Juanita's que se distribuyen en los supermercados La Torre.

La evaluación de la calidad de las hojas de laurel consistió en determinar la actividad biológica de sus extractos etanólico y diclorometánico, porcentaje de rendimiento e identificación de los componentes mayoritarios de sus aceites esenciales, porcentaje de flavonoides de la droga vegetal, identificación de los siguientes metabolitos secundarios presentes en sus extractos: saponinas, flavonoides y antocianinas y aceites volátiles.

En la prueba de sólidos totales se determinó que el mejor disolvente para extraer la mayor cantidad de metabolitos secundarios en la droga vegetal fue el etanol al 70%, obteniéndose un porcentaje de rendimiento promedio de 27.47% en las cuatro muestras de laurel.

La extracción de aceites esenciales de las hojas de laurel se realizó por hidrodestilación utilizando el Neoclevenger, obteniéndose los siguientes porcentajes de rendimiento: 0.87% en el laurel del Mercado Central de Mayoreo (CENMA), 1.12% el del Mercado Central, 1.16% para la marca comercial Juanita's (supermercado La Torre) y 1.40% para la marca comercial Mahler (supermercado Paiz). El compuesto mayoritario presentado en los aceites esenciales procedentes de los mercados fue d-limoneno, y el de las marcas comerciales procedentes de los supermercados fue 1,8-cineol.

En el tamizaje fitoquímico se detectaron en los extractos etanólico y diclorometánico en las cuatro muestras de laurel la presencia de saponinas y flavonoides y antocianinas, pudiéndose detectar mayor cantidad de dichos metabolitos secundarios en los extractos etanólicos. Y de la misma manera se observó también una mayor cantidad de aceites volátiles en los extractos de diclorometano de las cuatro muestras de laurel que en sus respectivos extractos etanólicos.

Se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana en los extractos de las muestras de laurel. En dicha evaluación se pudo determinar que todos los extractos secos mostraron actividad contra *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis*, variando solamente en los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Se determinó que los extractos diclorometánicos de todas las muestras de laurel y el extracto etanólico de la marca comercial Juanita's presentaron actividad contra ambas bacterias, mientras que los extractos etanólicos de ambos mercados mostraron actividad solamente contra *Mycobacterium smegmatis*. Todos los extractos diclorometánicos de las muestras de laurel excepto la muestra de marca comercial Mahler, mostraron actividad contra la levadura *candida albicans*.

En la determinación de la actividad antioxidante se pudo mostrar por medio de cromatografía en capa fina que todos los extractos de las muestras de laurel poseen actividad antioxidante. En la prueba de la determinación de la actividad antioxidante por medio del reactivo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) expresado a través del  $CI_{50}$  (concentración de inhibición al 50% de la absorbancia del reactivo de DPPH), se pudo determinar que los extractos etanólicos de las cuatro muestras de laurel presentaron mayor actividad antioxidante en comparación con sus extractos diclorometánicos.

En la prueba de determinación del porcentaje de flavonoides en las hojas secas de las muestras de laurel, se pudo determinar que las hojas de marcas comerciales (Mahler y Juanita's) tuvieron un mayor porcentaje de flavonoides que las hojas de laurel procedente de los mercados Central y Central de Mayoreo (CENMA).

Por lo anterior se concluye que no existe diferencia en la calidad de las hojas de laurel que se distribuyen en dos mercados con respecto a dos marcas comerciales que se comercializan en dos supermercados diferentes en la ciudad de Guatemala.

## INDICE

Contenido	Página
1. Introducción .....	1.
2. Antecedentes .....	3.
3. Justificación .....	34.
4. Objetivos .....	35.
5. Hipótesis .....	37.
6. Materiales y métodos .....	38.
7. Resultados .....	58.
8. Discusión de resultados .....	73.
9. Conclusiones .....	82.
10. Recomendaciones .....	84.
11. Referencias .....	85.
12. Anexos .....	91.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud y sostenimiento de la economía en la mayor parte de la población mundial. En muchos lugares se comercializan plantas con aparentes propiedades medicinales, sin embargo, su identidad puede ser dudosa debido a que se confía en las propiedades organolépticas para asegurar su naturaleza y la adulteración o falsificación puede ocasionar una situación perjudicial en la salud del paciente, retardando o empeorando su curación, además de ocasionar pérdida de confianza en la actividad terapéutica de las plantas.

Guatemala presenta una gran diversidad de plantas, muchas de las cuales han sido utilizadas como alternativa para tratar enfermedades, tal es el caso del laurel (*Litsea guatemalensis*), que crece en bosques abiertos de pino y matorrales a una altitud que oscila entre 1500 a 3150 metros sobre el nivel del mar (msnm), descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá.

La materia médica está constituida por hojas secas, a las que se les atribuye propiedades aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espasmolítica, febrífuga y pectoral. Además las hojas aromáticas son empleadas como condimento en la preparación de platillos como sopas, guisos y repostería.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la calidad y actividad biológica (actividad antioxidante y antimicrobiana) del laurel comercializado en dos mercados y dos supermercados de la ciudad de Guatemala. Del material vegetal se realizaron extractos a partir del cual se evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana. La actividad antimicrobiana consistió en evaluar la concentración inhibitoria mínima (CIM) contra bacterias gram-positivo, gram-negativo y levaduras.

Los parámetros de calidad evaluados consistieron en ensayos cuantitativos de pureza tales como porcentaje de humedad y cenizas totales; a los extractos etanólicos de las muestras en estudio se les determinó pH y densidad. También se realizó la separación de aceites esenciales (por cromatografía de gases) y caracterización de metabolitos

secundarios como flavonoides, antocianinas, saponinas y aceites volátiles por medio de análisis fitoquímicos de tipo macro y semimicro, en cromatografía de capa fina.

Los resultados de esta investigación proporcionaron información sobre la calidad del laurel comercializado en cuatro establecimientos de ventas en la ciudad de Guatemala, y también permitieron verificar la actividad antioxidante y antimicrobiana que tiene dicho material vegetal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Descripción de *Litsea guatemalensis* (Laurel)

*L. guatemalensis* es un árbol pequeño de 6 m de alto con ramas finas de color café. Sus hojas son coriáceas y agudas en la base, lustrosas y glabras de 8 cm de longitud y 2.5 cm de ancho; poseen un pecíolo de 1.5 cm de largo, elíptico-lanceolado. Las flores son axilares brácteas de involucreo deciduo, con filamentos glabros y un pedúnculo simple, solitarias de 15 mm de largo; presentes en número de 5 - 11 (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996; Jayes Reyes *et al*, 2006; Martínez, 1995; Standley *et al*, 1946).

Esta especie es endémica de Guatemala, crece en bosques mixtos abiertos de pino y matorrales entre 1500 a 3150 msnm; ha sido descrita en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996; Martínez, 1995; Standley *et al*, 1946). Se recolecta en campos de crecimiento silvestre en regiones frías y montañosas del altiplano del país. Su crecimiento es frecuente pero raramente se encuentra en forma abundante en una localidad determinada. Se propaga por semilla; florea de febrero a junio. Las hojas y flores se colectan hacia finales de la floración y se secan a la sombra (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996; Martínez, 1995; Standley *et al*, 1946).

Dentro de los usos medicinales que le son atribuidos al ser administrado por vía oral se encuentra su utilización en afecciones respiratorias (amigdalitis, tos, tos ferina), gastroenteritis (diarrea, cólico, úlcera), carencia de leche materna e inflamación (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996; Martínez, 1995). Por vía tópica la corteza se utiliza en lavados y baños para reducción de cansancio, ataques epilépticos, úlceras e inflamación de piernas. Por otra parte, el cocimiento de la misma se emplea para tratar mordeduras de serpientes y perros. En sahumeros se utiliza contra la parálisis (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996).

También se le atribuye propiedad aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espasmolítica, febrífuga y pectoral (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996; Méndez, 2002).

En los estudios de farmacología experimental y clínica no muestra actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra *Candida albicans*, *Epidermophyllum floccosum* y *Microsporium canis*. Además su extracto etanólico presenta actividad insecticida contra hormigas (Cáceres, 2006; Méndez, 2002; Quiñonez, 2008). En un estudio realizado por Quiñonez y col. *L. guatemalensis* presentó efecto inhibitorio contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* y *Mycobacterium smegmatis ATCC 607* (Cáceres, 2006; Méndez, 2002; Quiñonez, 2008).

*Litsea guatemalensis* se caracteriza por poseer una amplia variedad de aceites esenciales, destacando un alto contenido de 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y linalol. El 1,8-cineol puede ser utilizado para facilitar la absorción transcutánea de otras sustancias, además presenta indicación terapéutica en el tratamiento de estomatitis, faringitis y sinusitis, así como antirreumático, pediculicida y parasiticida (Cáceres, 2006; Méndez, 2002; Vallverdú *et al*, 2005).

El tamizaje fitoquímico de *L. guatemalensis* indica que las hojas presentan alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, quercitina, estilbina, taraxon y aceite esencial como el limoneno y citral (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996). En esta especie también se ha reportado presencia de 8 % de agua, 13.7 g de proteínas, 7.0 % de grasas, un total de carbohidratos de 66.4 %, fibra en 23.7 %, 4.9 % de cenizas, 803.0 g de calcio, fósforo 114 g, hierro 15.0 g, tiamina 0.10 g, riboflavina 0.65 g y niacina 2.5 g (Duke *et al*, 1986). La materia médica la constituyen las hojas secas, las cuales deben tener las características botánicas, fisicoquímicas y organolépticas que caracterizan a la especie (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996; Rodríguez, 2000).

En un estudio no probabilístico a conveniencia realizado sobre la caracterización química y evaluación de la actividad biológica de *litsea guatemalensis* se determinó que las hojas presentan el mayor porcentaje de rendimiento de aceites esenciales, y en el tamizaje fitoquímico se encontró la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, taninos, cumarinas y saponinas. En la

evaluación de la actividad biológica *litsea guatemalensis* presenta actividad biológica contra *M. smegmatis*, *S. aureus* y *S. typhi*. Y no presenta actividad antimicótica, citotóxica y larvicida (Cruz *et al*, 2008).

La actividad biológica más sobresaliente demostrada en las especies del género *Litsea* ha sido antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, insecticida y recientemente antiviral, citotóxica y antioxidante. Los compuestos reportados en el género han sido alcaloides, flavonoides, butanólidos, triterpenos y del aceite esencial los compuestos predominantes son 1,8-cineol, linalool y terpinen-4-ol. (Cruz & Cáceres, 2011).

En la literatura no se encuentra referencia sobre la toxicidad de esta especie, aunque se contraindica el uso del aceite esencial durante el embarazo, en pacientes con gastritis, colitis y úlcera péptica. Además se ha indicado que el uso del aceite puede producir dermatitis de contacto y fenómenos de fotosensibilización. En altas dosis puede ser tóxico al sistema nervioso central (SNC) (Cáceres, 2006; Cáceres, 1996; Rodríguez, 2000).

## **2.2. Parámetros de calidad para drogas vegetales y derivados**

La Farmacopea Europea incluye dentro de sus monografías parámetros que describen la calidad de un producto, y que se listan a continuación:

### **2.2.1. Identidad**

La identidad es la confirmación del material vegetal, en base a los caracteres macroscópicos y organolépticos, por comparación del material con especímenes de herbario, por inspección visual o microscópica, o bien por comparación con monografías de la farmacopea o con literatura de estándares (Paredes, 2005; Trease *et al*, 1984). Incluye la definición clara, precisa y científica de la planta; haciendo referencia a la forma física en que esta se encuentra, ya sea como planta entera, fragmentada o picada. La definición debe especificar de qué está compuesta la materia médica y si se encuentra fresca o seca. También debe incluir el nombre científico botánico, de acuerdo al sistema binomial (género, especie, variedad y autoridad) (Paredes, 2005). El material vegetal debe estar libre

de impurezas tales como tierra, polvo, suciedad, hongos, insectos, contaminación animales y libre de procesos de putrefacción (Paredes, 2005).

Además de la evaluación de características organolépticas, macroscópicas y microscópicas, es importante el perfil cromatográfico, reacciones de identificación y parámetros de pureza entre los que se incluyen humedad, cenizas, constantes físicas, materia extraña, disolventes residuales, contaminación microbiana, metales pesados, residuos de pesticidas, aflatoxinas, radiactividad, adulteraciones, valoración y contenido de principios activos o marcadores (Paredes, 2005).

#### **2.2.1.1. Evaluación organoléptica**

Se refiere a la evaluación de material vegetal por medio de los sentidos, incluye la determinación de olor, gusto, tacto, fractura y ocasionalmente el sonido o chasquido. El color de la materia vegetal puede revelar información útil sobre el cuidado postcosecha. Una droga secada rápida y cuidadosamente retiene su frescura, mientras que el follaje resecado se presenta quebradizo (Paredes, 2005; Medinilla, 2009).

#### **2.2.1.2. Parámetros de pureza**

El análisis de pureza permite determinar la ausencia de contaminantes químicos, biológicos y físicos. Algunos parámetros a determinar son:

- **Humedad**

Es un parámetro que indica la cantidad de agua que posee la materia cruda; permite saber si el secado del material vegetal fue el idóneo para conservar la calidad y prevenir la acción de enzimas, bacterias y el enmohecimiento (Paredes, 2005; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2003).

El método empleado para la determinación de humedad es el de pérdida por desecación, que consiste en someter la muestra al calor de una estufa a 100 °C hasta peso constante. Si la materia volátil es mayor del 1 % el análisis debe realizarse mediante métodos tales como:

químicos, basados en destilación, cromatografía de gases, espectrofotométricos y electrométricos (Paredes, 2005; OMS, 2003).

- **Cenizas**

Las cenizas totales son el residuo que queda después de incinerar la materia vegetal. El contenido de estas varía pequeña en las diferentes drogas, pero la variación es pequeña en el mismo tipo de droga (OMS; 2003). Este parámetro sirve para juzgar la identidad y pureza de una droga, también funciona como indicador del cuidado que se ha tenido en la preparación y proporciona información sobre una posible adulteración (Paredes, 2005; OMS; 2003).

Las cenizas insolubles en ácido constituyen una fracción de las cenizas totales que no se solubilizan en ácido clorhídrico, el cual disuelve el carbonato de calcio y los cloruros de metales alcalinos, dejando un residuo constituido casi totalmente por sílice procedente de arena y tierra adherida a la droga (Paredes, 2005; OMS; 2003).

### **2.2.2. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales, aceites volátiles, óleos etéreos o esencias son sustancias de origen natural que en su mayoría provienen de especies vegetales. Se caracterizan por su alta volatilidad y por producir un efecto de protección en la planta (Ocampo *et al*, 2007; Genaro, 1998). En cuanto a su composición química los aceites esenciales son una mezcla compleja y muy concentrada de compuestos aromáticos que se volatilizan a temperatura y presión ambiental, pueden contener cientos de componentes, entre los que se encuentran hidrocarburos, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esteroides, fenoles, lactonas y distintos compuestos orgánicos de nitrógeno y azufre. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son: linalol, acetol y mentol entre otros (Vallverdú *et al*. 2005; Gobierno de Chile, 2003; Genaro, 1998).

Es característica de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono (diez carbonos) y sesquiterpenos (quince carbonos). Sin embargo, conviene saber que así como existen esencias compuestas exclusivamente por terpenos, existen esencias que

prácticamente carecen de ellos, y están compuestos por derivados bencénicos, fenoles, ésteres e hidrocarburos lineales, o hasta por componentes difícilmente relacionados con las esencias, como alcaloides, glucósidos y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, pirazínicos, sulfuros, aminas, etc (Ortiz, 2005).

Por esta complejidad en su composición, es aconsejable hacer una discriminación entre los compuestos contenidos en una esencia. Se habla entonces de compuestos mayoritarios, cuando están en la esencia en una proporción mayor al 1 o 0.5%, y los minoritarios, que en algunos casos pueden contarse por centenares (Ortiz, 2005).

Esta clasificación de los constituyentes en función del contenido presente en cada esencia es fundamental tanto para determinar una calidad de esencia, como para precisar sus características organolépticas o sus efectos fisiológicos. En muchos casos las notas olfativas características de las esencias están dadas por los componentes minoritarios y no por los principales (Ortiz, 2005).

También es importante tener en cuenta que en algunas plantas los terpenos no están libres, sino que están unidos químicamente a azúcares, formando los llamados glucósidos o heterósidos. Es importante conocer esta particularidad para optimizar la técnica de extracción de estas esencias, pues deberá favorecerse una hidrólisis previa de estos glucósidos para lograr un buen rendimiento de esencia (Ortiz, 2005).

Las esencias se sintetizan y almacenan en diversos órganos: flores, hojas, brotes, tallos, madera, frutos, semillas, corteza, resinas, raíces y rizomas. La calidad de los aceites esenciales está determinada por su composición química, las propiedades fisicoquímicas, las características aromáticas olfativas y el grado de pureza o cantidad de residuos contaminantes (Gobierno de Chile, 2003). Su calidad se puede ver afectada por factores externos como el clima, suelo, incidencia de plagas, enfermedades, malezas, condiciones técnicas de cultivo, cosecha y manejo post cosecha. Entre los factores internos que pueden influir en la composición y calidad del aceite esencial están las variedades o selecciones, la etapa de desarrollo de la planta, edad y parte vegetal que se utilice (Gobierno de Chile, 2003).

Diferentes estudios han demostrado en los últimos años, la existencia de polimorfismo químico entre plantas de la misma especie, es decir, especies que producen aceites esenciales con composiciones diferentes, debido a las diversas condiciones climáticas donde crecen. Estas plantas pueden agruparse de acuerdo a orígenes comunes en quimiotipos, de manera que puede seleccionarse la procedencia que producirá los mejores resultados en cuanto a composición y a rendimiento (Jayes *et al*, 2006; Gobierno de Chile, 2003).

Los aceites esenciales son usados en muchas industrias para proporcionar aromas y olores especiales a productos como perfumes, cosméticos, jabones, condimentos, dulces, etc. Otros usos consisten en enmascarar olores desagradables en ambientes de trabajo e instalaciones sanitarias, también se utilizan como solventes y como insumos en productos de las industrias de plásticos, tintas, caucho, insecticidas y otras (Jayes *et al*, 2006). Muchos aceites constituyen compuestos de partida para síntesis de sustancias útiles en las industrias química y farmacéutica. Otros componentes tienen propiedades farmacológicas y son usados como antibacterianos, analgésicos, sedantes, expectorantes, estimulantes y estomáquicos en la composición de medicamentos (Jayes *et al*, 2006).

En cuanto a las técnicas de extracción, las más conocidas son el arrastre con vapor de agua, la hidrodestilación y la extracción con solventes. Para propósitos analíticos la hidrodestilación con aparato Neoclevenger es la técnica más utilizada (Jayes *et al*, 2006; Medinilla, 2009).

#### **2.2.2.1. Clasificación de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios tales como consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

Consistencia: De acuerdo a su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- Esencias fluidas: Son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos: Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.

- Oleorresinas: Son extractos de especias, que se obtienen por tratamiento de la droga seca con disolventes. Los disolventes empleados son eliminados casi completamente por procesos de destilación al vacío, destilación azeotrópica, o ambas.
- Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas. Se utilizan en las industrias de alimentos y de medicamentos, sustituyendo las plantas secas o las tinturas. Las oleorresinas contienen aceites esenciales, aceites fijos, colorantes y principios activos de las plantas (Martínez, 2001).

Origen: De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- Naturales: Se obtienen directamente de la planta y no sufre modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.
- Artificiales: Se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes. Por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol.
- Sintéticos: Como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidas por procesos de síntesis química. Estos son los más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Martínez, 2001).

Químico: Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales se denominan, monoterpenoides, (hierbabuena, albahaca, salvia), sesquiterpenoides (copaiba, pino, junípero), fenilpropanoides (clavo, canela, anís).

Aunque esta clasificación es muy general resulta útil para propósitos de estudio de algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos (Martínez, 2001).

#### **2.2.2.2. Composición química de los aceites esenciales:**

Se ha encontrado que los aceites esenciales contienen principalmente compuestos orgánicos líquidos, más o menos volátiles. La gran variedad de compuestos disueltos contenidos en los aceites esenciales se puede clasificar de la siguiente manera:

- Hidrocarburos (terpenos, heptano, pineno y sus componentes, canfeno, fenchona, dipentano, terpineno)
- Sesquiterpenos (bisaboleno, cadineno)
- Alcoholes (alcohol metílico, alcohol etílico, alcoholes alifáticos pesados, geraniol, cadenas cerradas de alcoholes)
- Alcoholes terpénicos (terpineol, pinenol)
- Esteres (esteres bencílicos), aldehídos (aldehídos alifáticos, benzaldehído, vainilla, heliotropina)
- Cetonas (acetona, ionona, carvona, alcanfor)
- Fenoles y componentes fenólicos (cresol, componentes de timol)
- Óxidos y lactonas (cumarina, eucaliptol)
- Componentes nitrogenados (nitrobenceno, almizcle artificial)
- Componentes sulfurados (isotiocianato butílico, sulfuro de vinilo)
- Ácidos (ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido benzoico).

La composición química de los aceites es muy variada, pero poseen varias propiedades físicas en común, por ejemplo, tienen alto índice de refracción, son ópticamente activos, etc (Ortiz, 2005).

### **2.2.2.3. Análisis del aceite esencial**

El análisis químico de los extractos de plantas es muy importante en el control de la calidad. Después que la identidad del material inicial ha sido establecida, la investigación cuantitativa y cualitativa puede empezarse (Sharapin, 2000).

Este análisis debe envolver preferiblemente alguna clase de método cromatográfica. La calidad del extracto de la planta puede ser dada como una huella digital en el cromatograma (aceites esenciales crudos) en el caso de que los componentes principales no sean conocidos o demasiados complejos (Sharapin, 2000).

Entre las propiedades físicas que se analizan para los aceites esenciales están la gravedad específica o densidad, el índice de refracción, pH, solubilidad entre otros (Sharapin, 2000).

### **2.3. Extracción de metabolitos secundarios por percolación**

Los extractos fluidos también conocidos como extractos líquidos, son preparaciones de material vegetal que contienen alcohol como disolvente o como preservante, o ambos, preparados de tal manera que cada mililitro contiene los constituyentes extraídos de un gramo del material crudo que representa (Solís *et al.* 2005; Medinilla *et al.* 2010). La materia cruda al ser extraída se reduce a pedazos de un tamaño apropiado, si es necesario, luego se mezcla íntimamente con una porción del disolvente especificado y se deja reposar por 15 minutos. La mezcla se transfiere a un percolador y se añade cantidad suficiente del disolvente especificado para cubrir toda la masa sólida (Solís *et al.* 2005; Medinilla *et al.* 2010). La mezcla se deja percolar lentamente, cubriendo siempre la muestra con una capa de disolvente. El percolado es concentrado, generalmente por destilación bajo presión reducida con temperaturas por debajo de los 60 °C, de manera que los constituyentes de interés sean sometidos a la menor cantidad de calor posible (Solís *et al.* 2005; Medinilla *et al.* 2010). El tiempo de maceración y la tasa de flujo durante la percolación pueden variar para ajustar la cantidad y la naturaleza del material vegetal bajo extracción, siempre y

cuando la composición de los constituyentes de interés extraídos no se vea comprometida (Solís *et al.* 2005).

## **2.4. Tamizaje fitoquímico de metabolitos secundarios incluidos en este estudio**

### **2.4.1. Flavonoides**

Flavonoide es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de manitol-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua (Font, 1982).

Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados. más una séptima clase, las auronas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas (Font, 1982).

También el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides o el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides (Font, 1982).

Los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica en el hombre, que los consume con los vegetales. Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos (Font, 1982).

Debido a las importantes funciones metabólicas que los flavonoides tienen en las plantas y los animales, sus vías biosintéticas y mecanismos de regulación están siendo cuidadosamente estudiadas. La ciencia aplicada aprovechó este conocimiento en muchos trabajos de ingeniería metabólica, en los que se buscó por ejemplo, aumentar la concentración de flavonoides beneficiosos en las plantas de consumo humano o de uso farmacéutico, modificar su concentración en flores ornamentales para cambiarles el color, e inhibir su producción en el polen para lograr la esterilidad de los híbridos de interés comercial. En lo que respecta a su producción, se ha desarrollado con éxito un cultivo de bacterias que sintetiza flavonoides de interés humano (Font, 1982).

#### **2.4.2. Antocianinas**

Son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Desde el punto de vista químico, las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y son glicósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico (Font, 1982).

Sus funciones en las plantas son múltiples, desde la protección de la radiación ultravioleta hasta la de atracción de insectos polinizadores. También otorgan propiedades antioxidantes, que evitan la producción de radicales libres (Font, 1982).

El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorante alimenticio, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano (Font, 1982).

#### **2.4.3. Saponinas**

Son compuestos derivados terpénicos, que agitados en agua producen espuma similar a la del jabón, reduciendo la tensión superficial del agua. Son excelentes emulsivos (Font, 1982). Producen hemólisis de los eritrocitos, por lo que se le considera dañinas vía

intravenosa. Se emplean como limpiadores y espumantes, especialmente en líquidos de extinción de incendios (Font, 1982).

La hidrólisis enzimática u oxidación de las saponinas se produce un azúcar (generalmente una glucosa) y una sapogenina; algunos de estos azúcares se utilizan como materia prima en la síntesis de hormonas esteroideas (Font, 1982).

Las saponinas relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, facilitando la expectoración; también se emplean como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias. En uso externo son analgésicas y cicatrizantes (Font, 1982).

#### **2.4.4. Aceites volátiles**

También llamados aceites esenciales. Son sustancias líquidas a temperaturas ambientes y sólidas a bajas temperaturas, insolubles en agua pero no en disolventes orgánicos. Poseen propiedades emolientes, nutritivas y energéticas. Además de propiedades antirreumáticas, desinfectantes o bactericidas, digestivas, etc. En dosis muy elevadas o administrados por largos períodos de tiempo pueden producir efectos como nerviosismo, irritabilidad y convulsiones (Font, 1982).

### **2.5. Antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias químicas que inactivan los radicales libres o inhiben su producción, impidiendo así deterioro en las células adyacentes. Los antioxidantes ceden un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos puede llegar a regenerarse como en el caso de la vitamina E (Stephens *et al.* 1996). Los antioxidantes que se encuentran normalmente en el organismo se llaman endógenos y generalmente son sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (mitocondrial, citoplasmática y extracelular), la catalasa y el complejo glutatión peroxidasa (Stephens *et al.* 1996; Carbonell, 2001). Los antioxidantes exógenos son los que se ingieren con la dieta encontrándose en diversos alimentos como las frutas y verduras (Stephens *et al.* 1996; Carbonell, 2001).

### 2.5.1. Antioxidantes exógenos

- **Beta caroteno:** Es un precursor de la vitamina A que se halla presente sólo en los alimentos de origen vegetal. Los carotenos tienen un efecto favorable para el sistema inmunológico, protegen a la piel contra la radiación ultravioleta, poseen un efecto protector específico de los tejidos. El efecto protector general es mayor cuando todos los carotenos son ingeridos conjuntamente en la dieta. Su función como antioxidante es detoxificar el oxígeno libre reactivo (Bendich, 1989; Vasconcellos, s.f.).

Las fuentes de betacarotenos son frutas y verduras amarillas y anaranjadas como la naranja, el durazno, el melón, el pomelo, el mango, la zanahoria, el güicoy y la espinaca. El contenido de betacarotenos de los alimentos puede variar con la estación de cosecha, pues son sensibles a la oxidación, que se acelera por la presencia de luz. Por ser un antioxidante liposoluble su absorción depende del contenido de grasa de la dieta y de la adecuada secreción pancreática y biliar. La ingesta diaria recomendable es de 3 mg (Vasconcellos, s.f.; Surai, s.f.).

- **Compuestos fenólicos:** Son compuestos producidos por el metabolismo secundario de algunos vegetales. Su estructura base es un núcleo aromático que contiene un grupo hidroxilo libre o sustituido, se diferencian de otros compuestos que también poseen estructura fenólica (monoterpenos) en su origen biosintético. Se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos (Vasconcellos, s.f.; Martínez Flores *et al.* 2002).

En la ruta del ácido shikímico se utilizan aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina para formar los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, cumarinas, lignanos y derivados del

fenilpropano). Por medio de la ruta de los poliacetatos se originan quinonas, xantonas, orcinoles, etc. Aunque algunos compuestos fenólicos como los flavonoides (antocianidinas, catequinas, ácido gálico e isoflavonas) se pueden formar a través de rutas mixtas que combinan la vía del shikimato y del acetato (Pineda, 2005).

Entre las funciones de los compuestos fenólicos están la de proteger al organismo contra enzimas que participan en la inflamación; modifican el metabolismo de las prostaglandinas y por lo tanto protegen de la aglomeración de plaquetas; pueden atrapar hierro y cobre evitando su participación en la producción de radicales libres; donan iones  $H^+$  o electrones para inactivar radicales libres y evitan la peroxidación lipídica protegiendo a la membrana celular de daño estructural que interfiere con el transporte de moléculas a través de estas membranas, además de controlar el crecimiento y proliferación celular (Pineda, 2005).

- **Vitamina C:** También llamada ácido ascórbico, es una vitamina hidrosoluble, constituye uno de los agentes antioxidantes más poderosos que actúa en compartimientos celulares acuosos. Su función como antioxidante se base en su poder para suprimir el oxígeno simple reactivo, reacciona con el anión superóxido, estabiliza el radical hidroxilo y regenera la vitamina E reducida (Pineda, 2005).

Cuando se encuentra en solución la vitamina C es fácilmente oxidable, de igual manera si es expuesta a pH alcalino, calor, oxígeno y metales como hierro y cobre (Pineda, 2005).

La absorción de la vitamina C ocurre en el duodeno, las cantidades que se ingieren en la dieta tienen una vida corta dentro del organismo, además es excretada por la orina en pequeñas cantidades, por ello debe ingerirse

diariamente la dosis para llenar los requerimientos diarios, siendo esta de 60mg para un adulto (Pineda 2005).

- **Vitamina E:** Conocido también como tocoferol. En la naturaleza existen cuatro isómeros de este compuesto:  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. La vitamina E es liposoluble, se encuentra en el interior de las membranas citoplasmáticas, actúa como bloqueador de las reacciones redox en cadena evitando la peroxidación lipídica (Pineda, 2005).

Se considera como factor de protección en la enfermedad cardiovascular, al evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Entre otras acciones la vitamina E también es capaz de neutralizar el oxígeno en singlete y peróxidos, capturar radicales hidroxilo y capturar el anión superóxido (Pineda, 2005).

## 2.6. Tamizaje Antimicrobiano de plantas

Las propiedades antimicrobianas de sustancias y aceites esenciales que las plantas contienen como productos de su metabolismo secundario han sido reconocidas empíricamente durante siglos, pero sólo recientemente fueron confirmadas científicamente (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Varios grupos de investigadores han estudiado la actividad biológica de plantas medicinales originarias de diversas regiones del mundo, guiados por el uso popular de las especies nativas. Debido a que los microorganismos que causan daño a la salud humana se están mostrando resistentes a la mayoría de los antimicrobianos conocidos, lo que ha incentivado aún más la búsqueda por antibióticos de fuente natural (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Extractos y aceites esenciales de plantas se han mostrado eficaces en el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias,

hongos filamentosos y levaduras. Por lo que se ha sugerido usos prácticos de estas actividades en humanos y animales, así como en la industria de alimentos (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

### 2.6.1. Microorganismos analizados en este estudio

#### 2.6.1.1. *Staphylococcus aureus*

##### Clasificación científica

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>Staphylococcus aureus</i>

##### Generalidades

Conocida comúnmente como estafilococo dorado, es una bacteria gram-positivo, inmóvil de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Tiene un metabolismo de tipo fermentativo y anaerobio facultativo, productor de coagulasa y catalasa. Su temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 °C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pH mucho más extremos. Al igual que tasas elevadas de cloruro sódico, hasta un 15% (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Poseen igualmente una desoxirribonucleasa o DNasa, una nucleasa exocelular que despolimeriza el ADN. También presentan la proteína A, una proteína de unión inespecífica a anticuerpos que está relacionada con su virulencia (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel de individuos sanos pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o

inmunocomprometidos (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas; tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de mismo o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

### Resistencia

*S. aureus* posee resistencia a través de una beta-lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta-lactamasa está codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). La resistencia al óxido nítrico es una cualidad peculiar del *S. aureus*, capacidad que lo distingue de otros patógenos, incluyendo los comensales *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Esa resistencia se debe a que el microorganismo produce una enzima llamada lactato-deshidrogenasa, que la faculta para tolerar el estrés causado por el radical del óxido nítrico. Esta observación se ha hecho tanto en especies resistentes a la meticilina como en las que son susceptibles al antibiótico, así como en cepas hospitalarias como adquiridas en la comunidad (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

#### 2.6.1.2. *Escherichia coli*

##### Clasificación científica

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Proteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>Escherichia coli</i>

## Generalidades

Es un bacilo gram-negativo, móvil por flagelos peritricos, no esporoformador, anaerobio facultativo, fermentador de glucosa y lactosa, oxidasa negativo (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). *E. coli* posee una amplia variedad de factores de virulencia. Por medio de los cuales es capaz de permanecer en el aparato urinario o en el aparato digestivo ocasionando patologías (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Las cepas de *E. coli* poseen numerosas adhesinas muy especializadas. Estas incluyen factores antígenos del factor de colonización, fimbrias de adherencia y agregación, *pili* que forman haces, íntima, *pili P*, proteína Ipa (antígeno del plásmido invasor) y fimbrias Dr (que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo Dr) (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Produce también un espectro variado de exotoxinas que incluyen las toxinas Shiga, las toxinas termoestables y las toxinas termolábiles. Por otra parte, las hemolisinas se consideran importantes en la patogenia de la enfermedad producida por *E. coli* (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

## Enfermedades clínicas asociadas

- Septicemia: Proviene de infecciones del aparato urinario o digestivo (por ejemplo, perforación gastrointestinal que provoca una infección intraabdominal).
- Infección del aparato urinario: Estas bacterias son especialmente virulentas por su capacidad para producir adhesinas (principalmente *pili P*), las cuales se unen a las células que recubren la vejiga y el aparato urinario superior (evitando la eliminación de las bacterias durante la micción), y hemolisina Hly A, que lisa los hematíes y otros tipos celulares (llevando a la liberación de citocinas y a la estimulación de la respuesta inflamatoria).
- Meningitis neonatal: *E. coli* y los estreptococos del grupo B causan la mayoría de las infecciones del SNC en los niños menores de 1 mes. Alrededor del 75% de las cepas de *E. coli* poseen el antígeno capsular K1. Este serogrupo está habitualmente presente en el aparato digestivo de las mujeres embarazadas y de los recién nacidos.

Sin embargo, no se conoce cuál es el mecanismo que gobierna la predilección de este serogrupo por la enfermedad en los neonatos.

- Gastroenteritis: Las cepas de *E. coli* que provocan gastroenteritis se clasifican en cinco principales grupos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) ó verotoxigénica (ECVT), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E. coli* enteroagregativa (ECEA) (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

### 2.6.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

#### Clasificación científica

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<i>Pseudomonas</i>
Especie:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

#### Generalidades

*P. aeruginosa* es un bacilo pequeño, Gramnegativo, no esporulador, aerobio. Presenta motilidad debido a su único flagelo polar, produce fluorescencias y un pigmento azul-verde (piocianina); este pigmento es útil para la identificación del microorganismo y da nombre a las especies denominadas *aeruginosa*, que se refiere al color característico del óxido de cobre (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos que otros organismos pueden asimilar. Ha reportado aislamiento de ambientes tan inhóspitos como el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

En los centros hospitalarios *P. aeruginosa* representa un problema, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados. Una vez que se establece la infección,

*P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Entre las proteínas que intervienen en la infección se encuentran toxinas, como las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Por otra parte, en ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelícula o biofilms. La formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud, pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo dispositivos intrauterinos, catéteres o válvulas cardíacas (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Las biopelículas también representan un problema en el proceso de producción de diversas industrias, pues provocan taponamiento y corrosión de conexiones y filtros. Asimismo, *P. aeruginosa* presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

El hecho de que la patogenia de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* es compleja queda demostrado por la diversidad clínica de las enfermedades producidas por este microorganismo y por la gran cantidad de factores de virulencia que produce (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

*P. aeruginosa* no suele causar enfermedad a personas sanas. Sin embargo, el riesgo relativo de infección aumenta notablemente cuando se rompen o eliminan las barreras cutáneas o mucosas normales, cuando están comprometidos los mecanismos inmunitarios de defensa o cuando se altera la función protectora de la microbiota bacteriana normal (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). La ubicuidad del microorganismo, la flexibilidad de sus necesidades nutricionales y metabólicas, su resistencia a los factores

ambientales y su resistencia relativa a los antibióticos explican la frecuencia y la facilidad con que este patógeno actúa como oportunista (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se suelen iniciar con la adherencia bacteriana y la colonización de las superficies cutáneas o mucosas, evolucionando hacia la invasión bacteriana localizada y la lesión de los tejidos subyacentes. La infección puede permanecer localizada anatómicamente o bien se puede diseminar mediante una extensión directa a las estructuras contiguas (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Este proceso se puede seguir de la invasión del torrente sanguíneo, la diseminación, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), la disfunción multiorgánica y, en última instancia, el fallecimiento del paciente. En el huésped inmunodeprimido, como los pacientes con una neutropenia intensa, no sólo es más probable que tenga lugar una infección local sino también que esta desencadene una invasión del torrente sanguíneo y se disemine (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

#### 2.6.1.4. *Salmonella typhi*

Clasificación científica:

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Salmonella</i>
Especie	<i>Salmonella typhi</i>

Generalidades

Es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo, móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, con cápsula, no esporoformador. Productoras de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa ni gas, y no producen ureasa (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Es un agente productor de zoonosis de distribución universal. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar, también por

vía sexual (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Crece con facilidad en agar sangre formando colonias de 2 a 3 milímetros. En laboratorios de microbiología clínica se aísla con medios selectivos, Selenito, Hektoen, SS o XLD para inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas y de la microbiota intestinal saprófita (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Tiene los siguientes antígenos:

- Somático O, del lipopolisacárido en la pared celular, termoestable y es la base de la clasificación en subgrupos.
- Flagelar H, de la proteína flagelina, termolábil, es la base de la clasificación de especies.
- Envoltura Vi, termolábil, responsable de la virulencia (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Produce salmonelosis con un período de incubación de entre 5 horas y 5 días. También es causante de fiebre entérica con un periodo de incubación de 7 a 28 días, causante de dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal y diarrea, erupción máculo-papulosa en pecho y espalda. Los enfermos presentan un período de convalecencia entre 1 y 8 semanas y las personas curadas eliminan *Salmonella* (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

*S. typhi* es un bacteria que se transmite por medio de alimentos o agua contaminados con materia fecal y orina de personas portadoras. Es resistente a bajas temperaturas lo que le permite transmitirse a través de alimentos conservados a bajas temperaturas como la leche o el helado (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

La materia fecal de personas infectadas contienen gran cantidad de microorganismos que pueden contaminar el agua y los alimentos, los que, a su vez, infectan a otras personas susceptibles haciendo de esta enfermedad un círculo muy peligroso cuando no hay condiciones de higiene adecuadas o cuando se utilizan aguas negras para regar los cultivos (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Cuando las bacterias entran en el organismo, por medio de alimentos o agua contaminada, se empiezan a multiplicar en el intestino

delgado entre las 24 y 72 horas del contagio y de ahí pasan al torrente sanguíneo afectando muchos de los órganos del cuerpo (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Aunque la mayoría de las bacterias son destruidas por el sistema inmunológico, las que quedan vivas se siguen reproduciendo ocasionando graves daños en la vesícula biliar y sus conductos, desde donde pueden regresar al intestino por medio de la bilis, por lo que ocasionan infecciones recurrentes (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

La evolución de la fiebre tifoidea es variable y en muchos casos, puede presentar una leve mejoría antes de regresar una o dos semanas después. Cuando no se atiende adecuada y oportunamente, se pueden presentar complicaciones mortales como sangrados o perforación intestinal, pulmonía o hepatitis C (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

#### 2.6.1.5. *Candida albicans*

##### Clasificación científica

Reino:	Fungi
Filo:	Deuteromiceta
Subfilo:	Saccharomycotina
Clase:	Saccharomycetes
Orden:	Saccharomycetales
Familia:	Saccharomycetaceae
Género:	<i>Candida</i>
Especie:	<i>Candida albicans</i>

##### Generalidades

Es un hongo diploide asexual (forma de levadura). Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido

como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical (Mims *et al.* 1999, Murray *et al.* 2006). La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Grampositivo, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Puede asumir patogeneidad provocando candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

En personas inmunodeprimidas o convalecientes de un larga terapia antibiótica, se multiplica en modo anómalo y, atraviesa el intestino, para entrar al torrente sanguíneo, donde libera sus propias toxinas provocando candidemia (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Este fenómeno da lugar a síntomas abdominales, mala digestión, gases e hichazón, molestias intestinales (estreñimiento o diarrea), intolerancia alimentaria, irritabilidad, insomnio, pérdida de la memoria, dolores de cabeza y depresión (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). La candidosis induce también una disminución de la absorción de las sustancias nutritivas por lo que se podría producir un estado de malnutrición (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

### 2.6.1.6. *Mycobacterium smegmatis*

#### Clasificación científica

Reino:	Bacteria
Filo:	Actinobacteria
Orden:	Actinomycetales
Familia:	Mycobacteriaceae
Género:	<i>Mycobacterium</i>
Especie:	<i>Mycobacterium smegmatis</i>

#### Generalidades

Es una bacteria Alcohol-Ácido resistente, frecuentemente incolora, aeróbica estricta. Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Es muy resistente al frío, la congelación y la desecación; por el contrario muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Su multiplicación es muy lenta (se divide cada 16 a 20 horas) y ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. El reservorio natural es el hombre, tanto el sano infectado como el enfermo (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Puede causar enfermedad en cualquier órgano del cuerpo, siendo lo más frecuente la infección pulmonar, desde donde se disemina a otros órganos por vía sanguínea o linfática. Los síntomas aparecen cuando las lesiones son ya muy extensas, de forma que el diagnóstico se establece cuando la enfermedad está muy avanzada (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Los síntomas que la delatan son: fiebre, sudoración, adelgazamiento, expectoración purulenta y tos. Provocan lesiones tisulares (tubérculos). Generan una respuesta inmune en donde participan los linfocitos CD4+ y los linfocitos citotóxicos, por su parte las células NK (natural killer) se encargan de eliminar macrófagos y linfocitos infectados (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

*In vitro* se destruye mediante pasteurización a 80 °C. El medio de cultivo más usado y más adecuado para su aislamiento es el de Lowenstein Jensen. También se está utilizando el medio Ogawa (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). La bacteria requiere por lo menos de 15 días para presentar un desarrollo visible macroscópicamente sobre el medio de

cultivo y necesita hasta 8 semanas de incubación debiéndose incubar un promedio de 30 días; sus colonias son de color blanco cremoso, esféricas, secas, rugosas, opacas, polimorfas y de dimensiones variables (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Los laboratorios especializados, realizan pruebas de susceptibilidad antibiótica (antibiograma) de las cepas aisladas y que ofrecen resistencia al tratamiento convencional (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

#### 2.6.1.7. *Cryptococcus neoformans*

##### Clasificación científica

Reino:	Fungi
Filo:	Basidiomycota
Clase:	Tremellomycetes
Orden:	Tremellales
Familia:	Tremellaceae
Género:	<i>Cryptococcus</i>
Especie:	<i>Cryptococcus neoformans</i>

##### Generalidades

Es una levadura encapsulada que crece a 37 °C. Se aísla fundamentalmente del suelo contaminado con excrementos de aves y causa la mayoría de las infecciones humanas (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Se visualiza mediante tinción con tinta china de muestras de LCR que contengan 10<sup>3</sup> o más unidades formadoras de colonias por mL. El diagnóstico definitivo exige aislar el microorganismo de muestras de líquidos orgánicos o tejidos (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). Se debe cultivar la sangre por lisis y centrifugación. No se deben emplear medios con cicloheximida, que inhiben el crecimiento de *C. neoformans*. El agar dextrosa de Sabouraud es óptimo para aislar *Cryptococcus* de muestras de esputo, lavado broncopulmonar, tejido o LCR (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

La utilización de semilla de Níger (alpiste) puede aumentar la tasa de detección en muestras de esputo y orina. Las muestras de LCR pueden contener pocos microorganismos

y a veces se requiere una gran cantidad de LCR para recuperar el germen (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). La prueba de aglutinación del látex y el enzimoimmunoanálisis para detectar el antígeno del polisacárido capsular del criptococo en muestras de suero o LCR son excelentes pruebas de diagnóstico rápido. Se detecta antígeno en muestras de LCR o suero en más del 90% de los pacientes con meningitis criptocócica (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Se ha asociado con infecciones que pueden afectar a individuos sanos, pero con mayor frecuencia se presenta en individuos inmunocomprometidos como infecciones oportunistas, siendo uno de los agentes micológicos que con mayor frecuencia se responsabiliza en la morbilidad y mortalidad de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ocupando el segundo lugar entre las infecciones que atacan a estos pacientes, con un índice de afectación del 10%, sólo superada por la candidiasis (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006). La principal manifestación clínica de la criptococosis es la meningitis, aunque en pacientes con inmunosupresión grave se puede diseminar ampliamente por la piel, hígado, bazo, glándulas suprarrenales y huesos (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

#### 2.6.1.8. *Bacillus subtilis*

##### Clasificación científica

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>Bacillus subtilis</i>

##### Generalidades

Es una bacilo Grampositivo, catalasa-positiva, aerobio facultativo, comúnmente encontrada en el suelo. Tiene la habilidad de formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas (Mims *et al.* 1999;

Murray *et al.* 2006). No es considerado como un patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia. Sus esporas pueden sobrevivir la calefacción extrema que a menudo es usada para cocinar los alimentos. (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

Algunas variedades de *B. subtilis* tienen aplicaciones comerciales:

- Una variedad de *B. subtilis* es usada en la producción comercial del manjar japonés Nattó.
- *subtilis* QST 713 (comercializado como QST 713 o Serenata) tiene una actividad fungicida natural, y es empleado como un agente de control biológico.
- Las enzimas que producidas son usadas extensamente como aditivos en detergentes de lavandería.
- *subtilis pBE2C1* and *B. subtilis pBE2C1AB* Son usados en la producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de desechos de malta como fuente de bajo costo para la producción de PHA (Mims *et al.* 1999; Murray *et al.* 2006).

## 2.7. Técnicas analíticas empleadas en el estudio

### 2.7.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina es un método de fisicoquímico que consiste en la separación de una sustancia entre dos fases inmiscibles. Para su realización se coloca sobre una fina capa de material granular (fase estacionaria) la mezcla a separar en forma de solución, aplicándola ya sea como manchas o como bandas (Paredes, 2005; Atlas de plantas medicinales, 1998; OMS, 2005).

Luego la placa es posicionada dentro de una cámara que contiene un disolvente adecuado (fase móvil) y se cierra debidamente. La separación de la mezcla problema se realiza mediante migración capilar. Luego que el disolvente ha ascendido una distancia de 10 cm. Se marca con lápiz el frente del disolvente y se calcula el valor de  $R_f$  empleando la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida de muestra (desde línea base)}}{\text{Distancia recorrida del disolvente (desde línea base)}}$$

Las sustancias incoloras pueden ser detectadas mediante la observación bajo luz ultravioleta, o mediante la adición de un reactivo revelador que reaccione con la sustancia que se desea detectar (Paredes, 2005; Atlas de plantas medicinales, 1998; OMS, 2005).

### **2.7.2. Cromatografía en fase gaseosa**

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica que permite la separación de sustancias volatilizables. La separación tiene como base la distribución diferencial de las sustancias entre una fase estacionaria, sólida o líquida, y una fase móvil (gaseosa) (Sharapin, 2000). La muestra es introducida en una columna que contiene la fase estacionaria, a través del sistema de inyección. Temperaturas apropiadas en el sitio de la inyección y en la columna, posibilitan la volatilización de los componentes de la muestra los cuales, de acuerdo con sus propiedades y las de la fase estacionaria, son retenidos por tiempos variables y llegan al final de la columna en tiempos diferentes. Un detector adecuado, a la salida de la columna, permite la detección y la cuantificación de las sustancias (Sharapin, 2000).

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica de análisis que ofrece resoluciones excelentes, con sensibilidad del orden de miligramos a picogramos. Los resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto (Sharapin, 2000).

Las desventajas son: los componentes de las muestras deben ser estables a la temperatura de operación, las muestras tienen que ser volátiles; es necesario hacer un tratamiento preliminar de las muestras, lo que convierte el proceso en difícil y complejo, además que su eficacia no es muy alta, como técnica para las identificaciones cualitativas (Sharapin, 2000).

La salida de las sustancias de la columna es registrada bajo la forma de picos que deben ser simétricos y sin superposición. La asimetría y la sobreposición indican una separación defectuosa. Los picos asimétricos pueden indicar fallas en la inyección, un exceso de la muestra, o pérdida de la eficiencia de la fase estacionaria (Sharapin, 2000). La eficiencia

del proceso se mide en términos de platos teóricos (un plato teórico equivale a una etapa del equilibrio de la sustancia entre las fases). La mayor eficiencia se traduce en la obtención de picos estrechos (Sharapin, 2000).

### **2.7.3. Espectrofotometría**

Es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia (Skoog *et al.* 1992). Este método se basa en el principio de que todas las sustancias pueden absorber energía radiante. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química (Skoog *et al.* 1992). Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida (Skoog *et al.* 1992).

El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar al ojo aquellas longitudes de onda no absorbidas (Skoog *et al.* 1992).

La espectrofotometría ultravioleta-visible usa haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm y en el de la luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro (Skoog *et al.* 1992). Al campo de luz UV de 200 a 400 nm se le conoce también como rango de UV cercano, la espectrofotometría visible solamente usa el rango del campo electromagnético de la luz visible, de 400 a 800 nm (Skoog *et al.* 1992). Además, es importante mencionar que la absorción y transmitancia de luz depende tanto de la cantidad de la concentración y de la distancia recorrida (Skoog *et al.* 1992).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país que tiene una gran riqueza y diversidad botánica, posee las condiciones necesarias para el desarrollo de diferentes especies de plantas nativas, muchas de las cuales son utilizadas por la comunidad para diferentes aplicaciones, incluyendo fines medicinales. Muchos de los productos naturales de origen vegetal en Guatemala se comercializan para diferentes propósitos, siendo los más populares, como agentes terapéuticos, cosméticos y/o alimenticios.

Las hojas de laurel que se comercializan en la ciudad de Guatemala, tienen uso popular en alimentación como condimento y en medicina, usándose el cocimiento o infusión de hojas por vía oral para el tratamiento de vías respiratorias y gastrointestinales (cólico), carencia de leche en la madre e hinchazón. Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia; en sahumeros se usa para parálisis y en gargarismos para inflamación de la garganta. Este trabajo de investigación tuvo como finalidad evaluar la calidad y pureza del laurel que se comercializa en dos mercados y dos supermercados de la ciudad de Guatemala. Los parámetros de calidad a evaluar incluyeron determinación de metabolitos secundarios y actividad antioxidante y antimicrobiana. La evaluación de la calidad de las hojas de laurel comercializadas es importante porque es un producto de alto consumo en la ciudad de Guatemala y se espera que los resultados que se obtengan de esta investigación sean útiles al dar información sobre si el laurel muestreado cumple con las especificaciones de calidad que se están evaluando.

Los resultados de la investigación pueden fomentar estudios en el futuro sobre otras propiedades que puede poseer el laurel comercializado, como por ejemplo utilizarlo como preservante de alimentos y como fuente para elaborar productos nutraceúticos, para poder utilizarlo en otras aplicaciones comerciales y terapéuticas en beneficio de la población y mejoramiento de la salud.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. General

Evaluar la calidad del laurel comercializado en cuatro establecimientos de ventas en la ciudad de Guatemala: Mercado Central, Central de Mayoreo (CENMA), y las marcas comerciales de laurel Mahler y Juanita's, los cuales se distribuyen en los supermercados Paiz y La Torre respectivamente.

### 4.2. Específicos

- 4.2.1. Determinar y comparar la pureza e identidad de hojas de laurel de dos marcas comerciales (Mahler y Juanita's) con respecto a hojas de laurel que se comercializan en dos mercados de la ciudad de Guatemala a partir de pruebas fisicoquímicas.
- 4.2.2. Identificar los constituyentes del aceite esencial del laurel comercializado en dos mercados con respecto al laurel de dos marcas comerciales (Mahler y Juanita's) mediante cromatografía de gases.
- 4.2.3. Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales de laurel comercializado en dos mercados con respecto a los extractos del laurel de dos marcas comerciales (Mahler y Juanita's), mediante ensayos macro y semimicro y tamizaje fitoquímico.
- 4.2.4. Evaluar la actividad antioxidante de extractos del laurel que se comercializa en dos mercados con respecto a los extractos de laurel de dos marcas comerciales (Mahler y Juanita's), mediante cromatografía en capa fina y espectrofotometría ultravioleta-visible utilizando 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).
- 4.2.5. Evaluar la actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivo, gram-negativo y levaduras de los extractos del laurel que se comercializa en dos

mercados con respecto a los extractos del laurel de dos marcas comerciales.

## **5. HIPOTESIS**

Existe diferencia de calidad del laurel que se comercializa en el Mercado Central y el Central de Mayoreo (CENMA) con respecto a dos marcas comerciales de laurel que se distribuyen en supermercados Paiz y La Torre de la ciudad de Guatemala.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Universo y Muestra

- 6.1.1. **Universo:** Especies de laurel que se comercializan en cuatro puntos en la capital de Guatemala.
- 6.1.2. **Muestra:** Consiste en hojas desecadas de laurel que se comercializan en dos mercados (Mercado Central y Central de Mayoreo "CENMA") y de dos marcas comerciales.

### 6.2 Recursos

#### 6.2.1. Humanos

- Investigador: Bachiller Ricardo Chuy Kwan
- Asesora: Doctora Sully Cruz
- Revisora: Licenciada Beatriz Medinilla.

#### 6.2.2. Institucionales

- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Herbario BIGU, Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### 6.3. Organismos de experimentación, materiales y equipos

#### 6.3.1. Organismos de Experimentación

- *Bacillus subtilis*
- *Candida albicans*
- *Mycobacterium smegmatis*
- *Pseudomonas aeruginosa*

- *Escherichia coli*
- *Cryptococo neoformans*
- *Salmonella typhi*
- *Staphylococcus aureus*

### 6.3.2. Materiales y equipos

- Agitador magnético
- Ampolla de decantación
- Asa de nicromo
- Asperjador
- Autoclave
- Balanza analítica
- Baño de maría
- Bomba de vacío
- Cajas de Petri descartables simples y cuadrilate
- Cámaras cromatográficas
- Campana de extracción de gases
- Cromatoplasmas de sílica gel 60 F254
- Destilador Neoclevenger
- Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro
- Espectrofotómetro CARY-50
- Estándares:
- Estereoscopio
- Estufa
- Evaporador rotatorio
- Gradilla para tubos de ensayo
- Hisopos estériles
- Incubadoras
- Lámpara de luz ultravioleta
- Microplacas
- Molino o tamiz
- Percolador de vidrio o acero inoxidable
- Perillas de succión
- Pipetas automáticas
- Pipetas serológicas
- Potenciómetro
- Puntas amarillas de 200µl y azules de 1,000 µl (Tips)
- Refrigeradora
- Soporte de metal
- Vasos de precipitar
- Vortex

Ensayo de flavonoides y antocianinas: rutina, hiperósido, quercetina y ácido clorogénico.

Ensayo de saponinas: saponina 0.1% (en metanol).

Ensayo para aceites volátiles: limoneno (1:30 tolueno), terpineol (1:30), nerol/tolueno (1:3), mirceno/tolueno (1:3), 1,8 cineol, limoneno, cariofileno.

### 6.3.3. Cristalería en general

- Balones volumétricos de 100 ml
- Balones volumétricos de 50 ml
- Beacker
- Erlenmeyers
- Frascos de vidrio color ámbar
- Micropipetas de 5  $\mu$ L o capilares
- Mortero
- Pipetas
- Pistilo
- Probetas
- Termómetro
- Tubos de ensayo
- Varilla de agitación
- Vidrio de reloj

### 6.3.4. Reactivos

- Disolventes: Diclorometano, metanol y etanol
- Reactivos y solventes para tamizaje fitoquímico:
  - Ácido sulfúrico concentrado
  - Ácido clorhídrico concentrado
  - Ácido acético glacial
  - Ácido fórmico
  - Acetato de etilo
  - Cloruro férrico al 10%
  - Cloruro de aluminio 2%
  - Cloroformo
  - Etanol 95%
  - Éter de petróleo
  - Magnesio metálico
  - Metanol
  - N-butanol
  - Tolueno
  - 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

### 6.3.5. Medios de cultivo

- Agar Mueller Hinton
- Caldo tripticasa soya
- Agar Sabouraud

## 6.4. Métodos

### 6.4.1. Preparación del extracto: Dos extractos

- **Diclorometano:** Para extraer sustancias medianamente apolares
- **Etanólico:** Para extraer sustancias polares

#### 6.4.1.1. Extracción por percolación

Procedimiento:

- Colocar en un percolador previamente limpio y seco, un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- Pesar 200 g de materia vegetal a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.
- Humedecer el material vegetal con etanol al 95 % para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- Transferir todo el material al percolador y agregar etanol al 95 % hasta cubrir el material vegetal.
- Dejar reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependerá del material vegetal (18-24 h).
- Abrir la llave de la parte inferior y dejar gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Recoger el líquido en un erlenmeyer, añadir suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.

- El material sólido que ha quedado, se presiona fuertemente y el líquido obtenido se añade al percolado obtenido anteriormente.
- El líquido obtenido (menstruo) se concentra en rotavapor o un equipo similar y se repite la operación hasta que se agote la droga con el disolvente recuperado.

#### **6.4.1.2. Concentración usando rotavapor**

Procedimiento:

- Aplicar vaselina al vástago rotatorio, a todas las llaves y juntas esmeriladas.
- Verificar que estén conectadas todas las conexiones eléctricas (del rotavapor).
- Colocar el balón colector y fijarlo con la llave respectiva.
- Revisar el nivel de agua del baño de calentamiento.
- Encender el baño y mantener la temperatura entre 50-60 °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 esté 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

líquido, 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.

## **6.4.2. Estudio del rendimiento y caracterización de aceites esenciales**

### **6.4.2.1. Extracción de aceites esenciales con Neoclevenger**

Procedimiento:

Preparación de la muestra:

- Moler 100 g de materia seca vegetal y pesar 50 g del material molido.
- Introducir los 50 g de material molido en un balón de destilación de 1,000 mL.
- Agregar aproximadamente de 400-500 mL de agua destilada hasta cubrir los 50 g del material.

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 2 mL de un disolvente orgánico (pentano) 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 2-3 h o según lo especifique la literatura para cada especie, mantener un flujo de destilación de 2-3 mL por minuto.
- Determinar el tiempo de destilación a partir que empieza a obtenerse el aceite.
- Medir la capa superior de aceite esencial recogido en el recipiente graduado.
- Esperar 10 min. 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 balón de 125 mL y agregar al tubo K aproximadamente 1 mL del disolvente orgánico utilizado anteriormente, para lavar y arrastrar todo el aceite recuperado.
- Eliminar el disolvente orgánico utilizando rotavapor.
- Pesar el aceite obtenido, verterlo en vial color ámbar y almacenar a 4 °C.
- Determinar el porcentaje de rendimiento a partir del peso del aceite entre el peso de la materia vegetal por cien.
- Lavar el destilador con suficiente metanol y agua destilada para dejarlo completamente limpio y evitar cualquier contaminación cruzada en la siguiente corrida.

Nota: Para la cuantificación de los aceites esenciales se procedió a una caracterización por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.

#### **6.4.2.2. Determinación del Índice de Refracción de los aceites esenciales**

- 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 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.

### **6.4.3. Pruebas Fisicoquímicas**

Al material vegetal seco se le van a realizar las siguientes pruebas:

#### **6.4.3.1. Porcentaje de humedad**

- Utilizar la balanza de humedad empleando material vegetal triturado en trozos pequeños.
- Agregar un gramo al platillo con homogeneidad
- Cerrar la tapadera de la balanza y presionar tara y el botón enter.
- Leer el resultado de la humedad de la muestra.

#### **6.4.3.2. Cenizas totales**

- Colocar aproximadamente 1 g de material seco en estudio en un crisol de porcelana, previamente calcinados y a peso constante.
- Introducir el crisol con la muestra en el interior de un horno a 550 °C hasta obtener cenizas blancas, gris claro o gris rojo.
- Dejar enfriar los crisoles en el desecador.
- Pesar rápidamente y anotar el resultado.

Al extracto etanólico se realizarán las siguientes pruebas:

#### **6.4.3.3. pH**

- Sumergir el electrodo y el probador de temperatura dentro del extracto etanólico.

Nota: Mantener dentro de la solución el tiempo necesario para estabilizar el electrodo, por un mínimo de 30 segundos.

- Leer el pH.

#### **6.4.3.4. Densidad**

- Utilizar un picnómetro limpio y seco.
- Pesar primero el picnómetro vacío a 20 °C, luego pesar el picnómetro con agua a 20 °C.
- Vaciar el picnómetro y secar.
- Agregar la muestra del extracto etanólico al picnómetro y volver a pesar.
- Calcular el peso específico para determinar la densidad.

#### **6.4.4. Actividad antimicrobiana *in vitro***

##### **6.4.4.1. Preparación de Agar-Planta**

- Preparar tubos con 9.0 ml de agar Mueller Hinton.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min, dejar enfriar a 50 °C y agregar 1.0 ml de la solución del extracto. Este debe tener una concentración de 10 mg/ml. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/ml.
- Agitar y verter en cajas de petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36 °C por 24 h, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

##### **5.4.4.2. 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 h.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 ml de caldo Tripticasa soya, incubar a 36 °C durante 48 h.

- Diluir 0.05 ml de la suspensión anterior en 4.95 ml de agua solución salina estéril (dilución 1: 100).
- Sembrar en caja de petri según la plantilla a utilizar.

#### **6.4.4.3. 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 %.

#### **6.4.4.4. 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.

#### **6.4.4.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)**

##### **6.4.4.5.1. Preparación de Agar-Planta**

- Preparar tubos con 3.6, 3.8, 3.9 y 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 cuadrilátera 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 h, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

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

#### **6.4.4.6. Interpretación de resultados (CIM)**

- 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.

#### **6.4.5. Caracterización de los metabolitos secundarios**

Se realizó por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y ensayos macro y semimicro. La cromatografía en capa fina se analizó con las fases móviles adecuadas y caracterizadas por medio de valores Rf y coloraciones obtenidas luego de asperjar con reveladores específicos, mientras que en los ensayos macro y semimicro se utilizaron para la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de la muestra por medio de la formación de precipitados y complejos coloreados.

#### **6.4.6. Investigación de flavonoides y antocianinas**

##### **6.4.6.1. Ensayos macro y semimicro**

- Disolver 3 g de extracto seco vegetal con etanol al 50 %.
- Agregar 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción se torna incolora.
- Disolver el residuo en 30 ml de metanol al 80 %, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1 Agregar 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2 Agregar 3-5 gotas de cloruro férrico al 10 % (p/v).

Tubo 3 Agregar 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de María por 5 minutos (Pruebas para leucoantocianinas).

Tubo 4 Agregar magnesio metálico y 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5 Agregar un álcali a un extracto acuoso

Tubo 6 Testigo

- Evaluar las siguientes reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Interpretar de acuerdo a:

Flavonas y flavonoles	amarillo o rojo
Flavanonoles	rojo a magenta
Flavanonas	rojo, magenta, violeta, azul
Isoflavonas	Amarillo
Isoflavononas, chalconas y auronas	no dan coloración

#### **6.4.6.2. Cromatografía en capa fina**

- Preparar una cromatoplaque cuya fase estacionaria sea gel de sílice cromatofolios de aluminio de 60 F<sub>264</sub>
- Colocar en una cámara cromatográfica la fase móvil (n-butanol: ácido acético glacial: agua (40:10:50 ó 20:5:25)).
- Preparar la solución estándar 0.05 % en metanol y aplicar 10 µl en la cromatografía (el límite de detección para flavonoides es de 5 a 10 µg). Las soluciones estándar a utilizar son: rutina, quercetina, hiperósido y ácido clorogénico.
- Concentrar 1 ml de extracto vegetal y aplicar en la cromatoplaque.
- Realizar la corrida cromatográfica
- Realizar la detección asperjando con el revelador: reactivo de productos naturales (NP/PEG).

NOTA: Se produce un típico color fluorescente intenso bajo luz UV a 365 nm inmediatamente al agregar el revelador, o después de 15 minutos. La adición de propilenglicol disminuye el límite de detección de 10 µg a 0.5 µg. (NP: Solución metanólica al 1 % de difenilboriloxietilamina. Polietilenglicol (PEG): Solución etanólica al 5 % de polietilenglicol 4000).

#### **6.4.7. Investigación de saponinas**

##### **6.4.7.1. Prueba de espuma**

- Preparar tubos de acuerdo a las siguientes indicaciones:

Tubo 1      Agregar 100 mg de material vegetal pulverizado y seco.

Tubo 2      Agregar 2 ml de control de saponinas (0.5 %).

Tubo 3      Agregar 2 ml de agua.

- Adicionar a cada tubo 10 ml de agua destilada.
- Calentar en baño de María a 60 °C durante 30 minutos.
- Dejar enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente por 35 segundos.
- Dejar reposar los tubos durante 30 minutos.
- Observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persistente en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

#### **6.4.7.2. Cromatografía en capa fina**

- Preparar una cromatoplaquea cuya fase estacionaria sea gel de sílice de 60 F<sub>254</sub>
- Colocar en una cámara cromatográfica la fase móvil (cloroformo-metano/agua (64:50:10), n-butanol-acético-agua (50:10:40)).
- Utilizar como estándar una solución de saponinas al 0.1 % en metanol (10 µl).
- Concentrar 1 ml de extracto vegetal y aplicar 25 – 40 µl de esta solución en la cromatoplaquea.
- Realizar la detección: (Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas). (Ácido sulfúrico etanólico 5% y vainillina etanólico 1%: zonas azules, violetas, amarillentas).

#### **6.4.8. Investigación de aceites volátiles**

##### **6.4.8.1. Cromatografía en capa fina**

- Preparar una cromatoplaquea cuya fase estacionaria sea gel de sílice cromatofolios de aluminio de 60 F<sub>254</sub>
  - Preparar en una cámara cromatográfica la fase móvil (Tolueno-acetato de etilo (93:7)).

Utilizar como estándar una solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3µl).

- Concentrar 1 ml de extracto vegetal y aplicar 20-50 µl en la cromatoplaça.
- Realizar la detección con el revelador: anisaldehído-ácido sulfúrico, para observar zonas azules verdes, rojas y cafés en visible.

#### 6.4.9. Evaluación de actividad Antioxidante

##### 6.4.9.1. Procedimiento para la cuantificación de flavonoides

- Preparar soluciones con las siguientes especificaciones:

Solución Madre	Pesar 1.5 g de material vegetal molida y pasar a un balón de reflujo, adicionar 100 ml de etanol al 60% y poner a reflujo en un baño de agua durante una hora. Dejar enfriar y filtrar, pasar el filtrado a un balón aforado de 250 ml. Agregar otros 100 ml de etanol al 60% al material vegetal y llevar nuevamente a reflujo durante una hora. Dejar enfriar, filtrar y juntar con el filtrado anterior. Aforar hasta 250 ml con etanol al 60%.
Preparación de referencia	Pesar 10 mg de la sustancia de referencia de rutina y disolver en metanol absoluto, llevar al aforo de 10 ml
Solución 1	Colocar 2 ml de solución madre y 2 ml de AlCl <sub>3</sub> al 2 % m/v en un matraz aforado de 25 ml y llevar al aforo con metanol absoluto.
Solución 2	Colocar 2 ml de solución madre en un matraz aforado de 25 ml y llevar al aforo con metanol absoluto.
Solución 3	Colocar 2 ml de la preparación de referencia y 2 ml de cloruro de aluminio al 2 % m/v en un matraz aforado de 25 ml. Llevar al aforo con metanol absoluto.
Solución 4	Colocar 2 ml de la preparación de referencia en un matraz aforado de 25 ml y llevar al aforo con metanol absoluto.

- Medir la absorbancia de la solución 1, después de 25 minutos a 394 nm, usando como blanco la solución 2.
- Medir la absorbancia de la solución 3, después de 25 minutos a 394 nm, usando como blanco la solución 4.
- Cálculos: % de flavonoides totales: 
$$\frac{(A_1 * P_2 * V_2 (10ml))}{(A_2 * P_1 * V_1 (250ml))}$$

$A_1$  = Absorbancia de la muestra

$P_2$  = Peso del estándar de referencia

$V_2$  = Volumen del aforo de referencia (10ml)

$A_2$  = Absorbancia de la preparación de referencia

$P_1$  = Peso de la muestra

$V_1$  = Volumen de aforo de la muestra (250ml).

#### **6.4.9.2. Procedimiento del ensayo de cromatografía en capa fina para la detección de actividad antioxidante**

- Aplicar 10  $\mu$ l de muestra y 5  $\mu$ l del estándar antioxidante terc-butilhidroquinona (TBHQ) en una placa cromatográfica de sílicagel 60F254.
- Colocar la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26).
- Secar y asperjar con 2,2 – difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (1mg/ml en metanol).
- Detección: Si los extractos presentan actividad antioxidante se observará la decoloración de DPPH (2,2 –difenil-2-picrilhidrazilo) en las bandas respectivas.

#### **6.4.9.3. Procedimiento del ensayo mediante espectrofotometría UV visible para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).**

##### **6.4.9.3.1. Preparación de soluciones:**

Solución madre	Pesar 0.1 g del extracto seco y agregar 5 ml de metanol absoluto, luego introducir al sonicador y obtener la solución madre, de la cual se
----------------	--

	realizará una serie de diluciones (1:5, 1:10, 1:20, 1:30), y encontrar la dilución, en donde el porcentaje de inhibición está entre (60% - 70%).
Solución de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) 500uM en metanol	<p>Pesar 0.00219 g de reactivo 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo con una espátula plástica y disolver en 10 ml de metanol, agitar la solución y conservar en un recipiente color ámbar.</p> <p>Nota: Preparar la solución el día de realización del ensayo, pues es una solución inestable.</p>
Buffer acetato	<p>Agregar 1 ml de ácido acético 0.2 M y 19 ml de acetato de sodio 0.2 M. Llevar a pH 6 mediante el empleo de NaOH 6 N. El NaOH 6 N (disolver 24 g de NaOH en 100 ml de agua desmineralizada).</p> <p>IMPORTANTE: Preparar las soluciones constituyentes del buffer de acuerdo a lo indicado a continuación:</p>

#### Preparación de las soluciones constituyentes del buffer de acetato

Acetato de sodio 0.2 M	Ácido acético 0.2 M
1.6406 g de acetato de sodio anhidro 100 ml de agua desmineralizada	1.201 g de ácido acético al 96 % 100 ml de agua desmineralizada

Nota: En caso de no contar con acetato de sodio anhidro puede utilizarse acetato de sodio trihidratado (25.07 g / 800 ml H<sub>2</sub>O destilada.)

#### 6.4.9.3.2. Preparación de los tubos de reacción:

- Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, de preferencia nuevos o bien emplear tubos lavados correctamente.
- Agregar agua desmineralizada después del lavado para evitar que interfieran las sustancias contenidas en el agua de chorro. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C.
- Preparar una serie de tubos que contienen los reactivos que se citan en el anexo 1.

- Agitar los tubos preparados en un vórtex durante 30 segundos
- Incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos.
- Leer a una longitud de onda de 517 nm.

#### **6.4.8.3.3. Preparación de la curva de lectura:**

- Realizar una serie de diluciones del extracto de acuerdo a las indicaciones del anexo 2.
- Realizar las mediciones de cada una de estas diluciones siguiendo el paso anterior en el que se cita como se prepararon los tubos de reacción. Cada dilución corresponderá a una muestra.

Nota: Realizar cuatro réplicas para cada uno de los ensayos de diluciones.

#### **6.4.8.3.4. Registro de los resultados de la curva y cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia:**

- Registrar los valores obtenidos de la curva en base al esquema del anexo 3. En la casilla promedio de absorbancias, estimar la media de la absorbancia 1 y 2. Y calcular el porcentaje de inhibición de la concentración. Utilizar fórmula del anexo 4.
- Graficar la concentración del extracto (eje x) vs % disminución de la absorbancia (eje y). Interpolar el valor de  $CI_{50}$ . Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% ( $CI_{50}$ ), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50 % de disminución de la absorbancia de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

## 6.5. Diseño del estudio

La población estuvo constituida por el laurel comercializado en la ciudad de Guatemala, mientras que la muestra estuvo formada por el laurel que se comercializa en el Mercado Central, CENMA (Central de Mayoreo, zona 12) y 2 marcas comerciales de laurel que se venden en supermercados. En esta investigación se realizó un muestreo por conveniencia, comprando un kilogramo de laurel seco en cada uno de los lugares mencionados.

La calidad de las muestras de laurel se evaluó a través de la determinación de pH, humedad, cenizas totales, densidad y caracterización de aceites esenciales (por triplicado).

También se realizó la caracterización de los siguientes metabolitos secundarios: aceites volátiles, antocianinas, flavonoides y saponinas descritos anteriormente en la literatura. Para ello se utilizó cromatografía en capa fina, comparando los Rf de las muestras de laurel con estándares seleccionados (de acuerdo a lo indicado en la metodología antes descrita), ensayos macro y semimicro, reacciones de coloración y precipitación.

La evaluación de pureza y evaluación fitoquímica de las muestras de laurel consistió en un análisis de tipo descriptivo, determinando características cualitativas y características cuantitativas reportando que se encontró y el rango de los valores obtenidos respectivamente, para luego comparar dichos valores con parámetros establecidos, para indicar cuales pruebas cumplen y cuáles no.

Para comparar las medias poblacionales se usó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%. Se hizo la comparación de las medias de pH, cenizas totales, densidad, porcentaje de rendimiento de aceites esenciales, índice de refracción de aceites esenciales, porcentaje de flavonoides y el  $CI_{50}$  (concentración de inhibición al 50% de la absorbancia del reactivo de DPPH) de los extractos secos de diclorometano y de etanol al 70% de cada una de las cuatro muestras de laurel analizadas. Esto se realizó con el método estadístico ANOVA (análisis de varianza) de un factor, el cual mostró que si existe diferencia significativa entre las cuatro muestras de laurel en algunas pruebas analizadas, por lo que fue necesario determinar entre cuales muestras de laurel existe diferencia

significativa por medio de la prueba de Tukey HSD el cual es una prueba de comparaciones múltiples.

### **6.1. Actividad antimicrobiana**

Para determinar la actividad antimicrobiana, primero se realizó un tamizaje de la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*, utilizando el método de difusión en agar. Los resultados fueron evaluados con criterio de positividad visual (si hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo hay actividad negativa y si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo hay actividad positiva).

Para la demostración de la actividad antibacteriana se utilizaron cajas con agar-planta. En cada caja se inoculó una asada de cada microorganismo a evaluar realizando 5 repeticiones por cada microorganismo; en cada repetición se puso una asada de cada microorganismo en diferente orden cada vez.

Para las asadas en la actividad antifúngica no se pueden inocular los hongos en la misma caja agar-planta (es decir que no pueden ir juntas como en el caso de las bacterias), sino que se utilizará una caja agar-planta por cada hongo.

Según la tabla de la distribución binomial, se requieren solo cinco repeticiones por microorganismo y hongo para un nivel de significancia de 0.05 ( $\alpha =$  alfa). Los resultados del análisis del tamizaje antimicrobiano se realizaron por medio de la prueba de hipótesis binomial, con  $H_0$  (Hipótesis nula):  $p \leq 0.5$  y  $H_a$  (Hipótesis alterna):  $p > 0.5$ , donde  $p$  es igual a la probabilidad de éxito.

Si  $H_0$  es cierta: No hay inhibición. Si  $H_0$  se rechaza: Si hay inhibición. Con 5 repeticiones para cada microorganismo, las cinco deben dar el mismo resultado de no crecimiento para rechazar  $H_0$ .

Luego del tamizaje antimicrobiano se determinó la CIM, tomando únicamente los microorganismos que dieron positivo el tamizaje antimicrobiano, es decir los extractos de

agar-planta en donde no se produjo un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo del microorganismo.

Para la determinación de CIM se prepararon diluciones de agar-planta, realizando 5 repeticiones por cada dilución para cada microorganismo, con el fin de determinar la dilución en la cual se presentó ausencia de crecimiento microbiano.

### **6.5.2. Actividad antioxidante**

Para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras de laurel, se realizó como métodos de tamizaje la cuantificación de flavonoides y un ensayo de cromatografía en capa fina.

Las muestras que pasaron el tamizaje fueron procesadas para medir la actividad antioxidante total, por medio de un ensayo mediante espectrofotometría UV-visible con el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

El ensayo consistió en la preparación de una curva de lectura, en la cual se realizaron una serie de diluciones del extracto (anexo 2), por triplicado. El análisis de datos se llevó a cabo mediante un análisis de regresión lineal para determinar la ecuación de la recta dosis-respuesta.

Se evaluó la regresión estadísticamente por medio de análisis de varianza y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Para el  $CI_{50}$  se sustituyó en la ecuación  $y = a + bx$  (donde “y” será igual al % actividad y “x” corresponderá a los valores de concentración o dilución del extracto) el 50 % de actividad para determinar la dosis, calculando un intervalo de confianza del 95 %.

## 7. RESULTADOS

Las muestras de *Litsea guatemalensis* (laurel) fueron adquiridas en cuatro establecimientos de ventas diferentes en la ciudad de Guatemala. Dichos establecimientos de ventas fueron las siguientes:

1. Mercado Central
2. Central de Mayoreo (CENMA)
3. Supermercados Paiz
4. Supermercados La Torre

La especie de laurel identificado en las diferentes muestras en este estudio fue de *Litsea guatemalensis*, el cual fue identificado por un biólogo del Departamento de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos.

### 7.1. Pruebas Físicoquímicas

En el siguiente cuadro se muestran los resultados del porcentaje de humedad, cenizas totales, pH y densidad, como parte de la evaluación de algunos parámetros físicoquímicos de las muestras de laurel. El porcentaje de humedad para todas las muestras de laurel fue menor al 10%, el valor del pH fue levemente ácido.

**Cuadro No. 1:** Pruebas físicoquímicas de *Litsea guatemalensis* (laurel)

Lugar	Droga vegetal		Tinturas	
	% humedad	Cenizas totales	pH	Densidad (g/ml)
Mercado central	8.35	4.0120 ± 0.0984	5.95 ± 0.132	0.906 ± 0.001
CENMA	8.20	4.0810 ± 0.0696	5.63 ± 0.042	0.905 ± 0.003
Juanitas (La Torre)	9.25	3.7822 ± 0.0419	6.08 ± 0.420	0.907 ± 0.002
MAHLER (Paiz)	8.50	4.1150 ± 0.0173	5.71 ± 0.066	0.906 ± 0.003

Fuente: Datos experimentales

## 7.2. Prueba de sólidos totales

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la prueba de sólidos totales para determinar el mejor disolvente para obtener el extracto de las muestras de laurel. En esta prueba se utilizaron tres concentraciones diferentes de etanol (50, 70 y 95%).

Como se puede observar en el cuadro de acuerdo al porcentaje de sólidos totales obtenidos, se determinó que el mejor disolvente para realizar la extracción fue etanol al 70%.

**Cuadro No. 2:** Determinación del mejor disolvente de extracción en las muestras de laurel en estudio

Lugar	Cantidad (g)	Disolvente	Sólidos totales (%)
Mercado central	3.0	Etanol 50%	6.7
	3.0	Etanol 70%	7.6
	3.0	Etanol 95%	2.1
CENMA	3.0	Etanol 50%	6.5
	3.0	Etanol 70%	7.2
	3.0	Etanol 95%	2.3
JUANITAS (La Torre)	3.0	Etanol 50%	6.8
	3.0	Etanol 70%	7.4
	3.0	Etanol 95%	2.4
Mahler (Paiz)	3.0	Etanol 50%	6.6
	3.0	Etanol 70%	7.3
	3.0	Etanol 95%	2.5

Fuente: Datos experimentales

## 7.3. Porcentaje de rendimiento de los extractos de diclorometano y etanólico

En el siguiente cuadro se muestran los porcentajes de rendimiento de los extractos de diclorometano y etanol de las muestras de laurel. La extracción se realizó utilizando la técnica de percolación, utilizando un solvente apolar (diclorometano) y un solvente polar (etanol 70%).

En base a los resultados se puede observar que el mejor porcentaje de rendimiento fue presentado por los extractos de etanol para todas las muestras de laurel.

**Cuadro No. 3:** Porcentaje de rendimiento obtenido de extractos diclorometánico y etanólico de las muestras de laurel en estudio

Lugar	Peso(g)	Disolvente	Rendimiento (%)
Mercado central	200	Diclorometano	6.2
	200	Etanol 70%	28.57
CENMA	200	Diclorometano	5.4
	200	Etanol 70%	26.58
JUANITAS (La Torre)	200	Diclorometano	5.1
	200	Etanol 70%	28.42
Mahler (Paiz)	200	Diclorometano	6.59
	200	Etanol 70%	26.33

Fuente: Datos experimentales

#### 7.4. Porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales

En el siguiente cuadro se muestran los resultados del porcentaje de rendimiento de la extracción de aceites esenciales de las muestras de laurel. La extracción de los aceites esenciales se realizó mediante hidrodestilación, utilizando Neoclevenger, realizando tres repeticiones para cada muestra, obteniendo para cada una de ellas un promedio de las tres repeticiones con su desviación estándar.

**Cuadro No. 4:** Porcentaje de rendimiento obtenido de la extracción del aceite esencial de *L. guatemalensis*

Lugar	Peso droga vegetal (g)	Peso aceite obtenido (g)	Porcentaje de rendimiento promedio
Mercado central	40	0.46	1.12 ± 0.23
CENMA	40	0.36	0.87 ± 0.09
JUANITAS (La Torre)	40	0.41	1.16 ± 0.38
Mahler (Paiz)	40	0.68	1.40 ± 0.39

Fuente: Datos experimentales

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de los índices de refracción de los aceites esenciales de las cuatro muestras de laurel analizadas.

### 7.5. Índice de refracción de los aceites esenciales

**Cuadro No. 5:** Índice de refracción de los aceites esenciales

<b>Lugar</b>	<b>ÍNDICE</b>
Mercado Central	$1.127 \pm 0.0000707$
CENMA	$1.120 \pm 0.004$
JUANITAS (La Torre)	$1.120 \pm 0.005$
Mahler (Paiz)	$1.122 \pm 0.007$

Fuente: Datos experimentales

### 7.6. Análisis de los aceites esenciales de las diferentes muestras de laurel por cromatografía de gases-masas

Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales extraídos de las diferentes muestras fueron analizadas por el Departamento de Toxicología en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicada en el antiguo edificio de la Facultad, a un costado del Parque San Sebastián, zona 1. Dicho análisis se realizó por medio de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de los componentes identificados del aceite esencial extraído del laurel del Mercado Central. Se lograron identificar 15 componentes diferentes, siendo los tres compuestos mayoritarios D-Limoneno,  $\alpha$ -pineno y dihidrocarvona.

**Cuadro No. 6:** Análisis del aceite esencial de laurel del Mercado central por Cromatografía Gases-Masas

	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Componente identificado</b>	<b>% Área</b>
1	11.763	$\alpha$ -Pineno	6.343
2	12.178	Camfeno	4.152
3	12.819	$\beta$ -Pineno	1.857
4	13.764	D-Limoneno	13.886
5	14.174	$\alpha$ -Terpineno	2.806
6	14.869	Linalool	3.712
7	15.780	Dihidrocarvona	6.724
8	13.569	4-Careno	2.034
9	15.645	Terpinen-4-ol	1.626
10	13.159	Mirceno	0.564
11	14.429	Terpinoleno	0.411
12	16.470	Acetato de Bornilo	0.317
13	17.526	$\beta$ -Cariofileno	0.422
14	18.506	Nerolidol	0.380
15	11.608	$\alpha$ -Tujona	0.303

Fuente: Datos experimentales

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de los componentes identificados del aceite esencial extraído del laurel del CENMA. Se lograron identificar 16 componentes diferentes, siendo los tres compuestos mayoritarios D-limoneno,  $\alpha$ -pineno y camfeno.

**Cuadro No. 7:** Análisis del aceite esencial de laurel del CENMA por Cromatografía Gases-Masas

	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Componente identificado</b>	<b>% Área</b>
1	11.753	$\alpha$ -Pineno	9.358
2	12.168	Camfeno	5.748
3	12.809	$\beta$ -Pineno	2.194
4	13.759	D-Limoneno	18.083
5	14.164	$\alpha$ -Terpineno	3.313
6	14.854	Linalool	2.137
7	15.765	(1R,4R)-Dihidrocarvona	3.357
8	13.149	Mirceno	0.824
9	13.559	4-Careno	2.259
10	15.635	Terpinen-4-ol	1.272

11	15.830	(+)-Dihidrocarvona	2.799
12	11.598	Tujona (A+B)(SG)	0.436
13	14.509	Terpinoleno	0.487
14	16.200	Dihidrocarveol	0.526
15	17.516	$\beta$ -Cariofileno	0.220
16	18.481	Nerolidol	0.327

Fuente: Datos experimentales

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de los componentes identificados del aceite esencial extraído del laurel Juanita's. Se lograron identificar 14 componentes diferentes, siendo los tres compuestos mayoritarios 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno.

**Cuadro No. 8:** Análisis del aceite esencial de laurel de JUANITAS por Cromatografía Gases-Masas

	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Componente identificado</b>	<b>% Área</b>
1	11.753	$\alpha$ -Pineno	7.081
2	12.168	Camfeno	0.676
3	12.809	$\beta$ -Pineno	2.312
4	13.804	1,8-Cineol	34.201
5	14.164	Terpineno	2.093
6	14.854	Linalool	1.782
7	15.760	(1R,4R)-Dihidrocarvona	0.935
8	16.940	Acetato de Terpeneol	2.213
9	11.598	Tujona (A+B)(SG)	0.456
10	13.149	Mirceno	0.573
11	13.559	$\alpha$ -Terpineno	1.282
12	15.630	Terpinen-4-ol	0.948
13	14.509	Terpinoleno	0.288
14	17.510	$\beta$ -Cariofileno	0.227

Fuente: Datos experimentales

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de los componentes identificados del aceite esencial extraído del laurel Mahler. Se lograron identificar 12 componentes diferentes, siendo los tres compuestos mayoritarios 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno.

**Cuadro No. 9:** Análisis del aceite esencial del laurel MALHER por Cromatografía Gases-Masas

	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Componente identificado</b>	<b>% Área</b>
1	11.763	$\alpha$ -Pino	9.085
2	12.173	Camfeno	0.963
3	12.814	$\beta$ -Pino	2.873
4	13.734	m-Cimeno	0.704
5	13.819	1,8-cineol	36.080
6	14.174	$\gamma$ -Terpineno	1.506
7	14.859	Linalool	0.967
8	15.830	$\alpha$ -Terpineol	1.232
9	11.603	Tujona (A+B)(SG)	0.533
10	13.569	4-Careno	0.873
11	15.640	Terpinen-4-ol	0.655
12	13.154	Mirceno	0.321

Fuente: Datos experimentales

### 7.7. Resultados del Tamizaje Fitoquímico

Se realizó el tamizaje fitoquímico mediante ensayos macro y semi micro, utilizando diversas pruebas preliminares de precipitación y coloración en los extractos etanólicos y diclorometánicos, para determinar algunos metabolitos secundarios presentes en las muestras de laurel en estudio, las cuales fueron confirmadas por cromatografía en capa fina.

**Cuadro No. 10:** Prueba de espuma para determinación de saponinas

<b>Lugar</b>	<b>Extracto</b>	<b>Prueba de espuma</b>	<b>Resultado</b>
Mercado Central	Diclorometano	-	Negativo
	Etanólico	+	Positivo
CENMA	Diclorometano	-	Negativo
	Etanólico	+	Positivo
Juanitas (La Torre)	Diclorometano	-	Negativo
	Etanólico	+	Positivo
Mahler (Paiz)	Diclorometano	-	Negativo
	Etanólico	+	Positivo

Fuente: Datos experimentales

En el siguiente cuadro se muestran los números de bandas y los Rf para los diferentes extractos de las muestras de laurel analizadas. Los Rf de los extractos tuvieron un valor cercano a los Rf de los estándares de saponinas.

**Cuadro No. 11:** Cromatografía en capa fina para determinación de saponinas

Lugar	Extracto	Número banda	Rf
Mercado Central	Diclorometano	1	0.94
	Etanólico	2	0.58, 0.94
CENMA	Diclorometano	1	0.94
	Etanólico	2	0.58, 0.94
Juanitas (La Torre)	Diclorometano	1	0.94
	Etanólico	2	0.58, 0.94
Mahler (Paiz)	Diclorometano	1	0.94
	Etanólico	2	0.58, 0.94
Estándares de saponinas	No. 1 (0.1%)	1	0.89
	No. 2 (0.2%)	1	0.86

Fuente: Datos experimentales

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10)

Detección: ácido sulfúrico etanólico 5% y vainillina etanólico 1%

En el siguiente cuadro se puede observar que solamente los extractos etanólicos de las muestras de laurel en estudio dieron positivo en las pruebas preliminares de flavonoides y antocianinas, ya que solamente los tubos de los extractos etanólicos con los reactivos agregados que se muestran en el cuadro se pudo observar cambio de coloración y/o formación de precipitado comparados con el tubo testigo.

**Cuadro No. 12:** Prueba de Flavonoides y Antocianinas

Lugar	Extracto	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	FeCl <sub>3</sub> 10%	HCl + calor	Mg + HCl	Alcali	Resultado
Mercado Central	Diclorometano	-	-	-	-	-	Negativo
	Etanólico	+	+	+	+	+	Positivo
CENMA	Diclorometano	-	-	-	-	-	Negativo
	Etanólico	+	+	+	+	+	Positivo
Juanitas (La Torre)	Diclorometano	-	-	-	-	-	Negativo
	Etanólico	+	+	+	+	+	Positivo
Mahler (Paiz)	Diclorometano	-	-	-	-	-	Negativo
	Etanólico	+	+	+	+	+	Positivo

Fuente: Datos experimentales

En el siguiente cuadro se puede observar que algunos valores de Rf de los extractos eran parecidos a los Rf de los estándares utilizados. Esto demuestra la posible presencia de flavonoides y antocianinas, ya que también se pudo observar fluorescencia de diferente color en cada una de las bandas bajo luz UV a 365 nm.

**Cuadro No. 13:** Cromatografía en capa fina para determinación de flavonoides y antocianinas

Lugar	Extracto	Número banda	Rf	Colores bandas
Mercado Central	Diclorometano	1	0.88	Rojo
	Etanólico	3	0.39, 0.54, 0.88	Azul, verde amarillo
CENMA	Diclorometano	1	0.88	Rojo
	Etanólico	6	0.39, 0.54, 0.64, 0.80, 0.85, 0.94	Azul, verde, amarillo, azul
Juanitas (La Torre)	Diclorometano	1	0.88	Rojo
	Etanólico	7	0.39, 0.54, 0.64, 0.76, 0.80, 0.86, 0.92	Azul, verde, amarillo
Mahler (Paiz)	Diclorometano	2	0.73, 0.88	Rojo
	Etanólico	6	0.39, 0.54, 0.64, 0.76, 0.80, 0.88	Azul, verde, amarillo, rojo
Estándares	Rutina	1	0.38	Amarillo
	Quercetina	1	0.85	Amarillo
	Hiperósido	1	0.66	Amarillo
	Ácido clorogénico	4	0.55, 0.82	Azul, verde

Fuente: Datos experimentales

Fase móvil: n-butanol: ácido acético: agua (20:5:25)

Detección: Reactivo de productos naturales (NP/PEG)

En el siguiente cuadro se muestran los números de bandas y los valores de Rf de los extractos de las muestras de laurel en estudio. Se puede observar que algunos extractos presentaron varias bandas y que algunos valores de Rf de los extractos son parecidos a los valores de Rf de los estándares utilizados, siendo esto indicativo de la presencia de aceites esenciales de las muestras de laurel en estudio.

**Cuadro No. 14:** Investigación de aceites volátiles en cromatografía en capa fina

Lugar	Extracto	Número banda	Rf	Colores bandas
Mercado Central	Diclorometano	4	0.31, 0.41, 0.48, 0.97	Verde, amarillo
	Etanólico	1	0.40	Amarillo
CENMA	Diclorometano	4	0.28, 0.41, 0.48, 0.97	Verde, amarillo
	Etanólico	1	0.21	Amarillo
Juanitas (La Torre)	Diclorometano	4	0.28, 0.40, 0.47, 0.97	Verde, amarillo
	Etanólico	2	0.21, 0.40	Amarillo
Mahler (Paiz)	Diclorometano	5	0.21, 0.31, 0.41, 0.47, 0.97	Verde, amarillo
	Etanólico	1	0.41	Amarillo
Estándares de aceites	Limoneno (1:30 tolueno)	1	0.44	Verde
	Terpineol (1:30)	1	0.43	Verde
	Nerol/tolueno (1:3)	1	0.53	Verde
	Mirceno/tolueno (1:30)	1	0.97	Violeta
	1,8 cineol	1	0.60	Violeta
	Limoneno	1	0.73	Verde
	Cariofileno	1	0.57	Violeta

Fuente: Datos experimentales

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

Detección: anisaldehído-ácido sulfúrico

### 7.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

Se realizó el tamizaje antimicrobiano de los extractos de las muestras evaluadas contra bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y levaduras.

Los extractos (diclorometánico y etanólico) de las muestras inhibieron el crecimiento contra *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Además los extractos (diclorometánico y etanólico) del laurel (Mahler) procedente del supermercado Paiz mostró inhibición del crecimiento contra *Staphylococcus aureus*.

También los extractos etanólicos de todas las muestras de laurel en estudio como los extractos diclorometánicos de las muestras de laurel procedente del Mercado Central de

Mayoreo (CENMA) y del supermercado Paiz (Mahler) mostraron inhibición contra *Escherichia coli*, por lo que se procedió a evaluar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de dichos extractos para determinar su actividad antimicrobiana.

**Cuadro No. 15:** Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos

Lugar	Extracto	A	B	C	D	E	F	G
Mercado central	Diclorometano	+	+	-	-	+	-	+
	Etanólico	+	+	-	-	+	-	-
CENMA	Diclorometano	+	+	-	-	+	-	-
	Etanólico	+	+	-	-	+	-	-
JUANITAS (La torre)	Diclorometano	+	+	-	-	+	-	+
	Etanólico	+	+	-	-	+	-	-
Mahler (Paiz)	Diclorometano	-	+	-	-	+	-	-
	Etanólico	-	+	-	-	+	-	-
Control Negativo	Etanol 50%	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Datos experimentales

(+) = Mostró crecimiento microbiano, actividad negativa

(-) = No mostró crecimiento microbiano, actividad positiva

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

Nota: La concentración de los extractos es de 1 mg/ml, incluyendo el control negativo

Se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos de laurel que mostraron actividad positiva en el tamizaje antimicrobiano.

En las muestras de laurel procedente del Mercado Central así como el procedente del Mercado Central de Mayoreo (CENMA) se puede observar que los extractos diclorometánicos presentaron actividad contra *Bacillus subtilis* a una concentración de 0.125 mg/ml y contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/ml, y los extractos etanólicos mostraron actividad contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 1 mg/ml.

En la muestra de laurel procedente del supermercado La Torre (Juanita's) el extracto diclorometánico mostró actividad contra *Bacillus subtilis* a una concentración de 0.5 mg/ml y contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 1 mg/ml, y el extracto etanólico

mostró actividad contra *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 1 mg/ml.

En la muestra de laurel procedente del supermercado Paiz (Mahler) el extracto diclorometánico mostró actividad contra *Bacillus subtilis* y contra *Mycobacterium smegmatis* a una concentración de 0.5 mg/ml.

Como se puede observar en el cuadro, el resto de los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) tuvieron un valor mayor a 1 mg/ml.

**Cuadro No. 16:** Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) contra bacterias

Lugar	Extracto	A (mg/ml)	B (mg/ml)	C (mg/ml)	D (mg/ml)	E (mg/ml)	F (mg/ml)
Mercado central	Diclorometano	0.125	---	0.25	---	---	---
	Etanólico	> 1	> 1	1	---	---	---
CENMA	Diclorometano	0.125	> 1	0.25	---	---	---
	Etanólico	> 1	> 1	1	---	---	---
JUANITAS (La Torre)	Diclorometano	0.5	---	1	---	---	---
	Etanólico	1	> 1	1	---	---	---
MAHLER (Paiz)	Diclorometano	0.5	> 1	0.5	> 1	---	---
	Etanólico	> 1	> 1	> 1	> 1	---	---
<b>Control Positivo</b>	<b>Ciprofloxacina (µm/ml)</b>	<b>0.191</b>	<b>0.095</b>	<b>0.763</b>	<b>0.763</b>	<b>1.526</b>	<b>1.526</b>

Fuente: Datos experimentales

(---) = No se analizó CIM

A = *Bacillus subtilis*, B = *Escherichia coli*, C = *Mycobacterium smegmatis*, D = *Staphylococcus aureus*, E = *Pseudomonas aeruginosa*, F = *Candida albicans*, G = *Escherichia coli*

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos de las muestras de laurel en estudio contra la levadura *Candida albicans*.

En la muestra de laurel procedente del Mercado Central el extracto de diclorometano mostró actividad a una concentración de 0.5 mg/ml. Los extractos de diclorometano de las muestras de laurel procedente del Mercado Central de Mayoreo (CENMA) y del supermercado La Torre (Juanita's) mostraron actividad a una concentración de 1 mg/ml.

El resto de los extractos que se muestran en el cuadro mostraron actividad a una concentración mayor de 1 mg/ml.

**Cuadro No. 17:** Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) contra *Candida albicans*

<b>Lugar</b>	<b>Extracto</b>	<b><i>Candida albicans</i> (mg/ml)</b>
Mercado central	Diclorometano	0.5
	Etanólico	> 1
CENMA	Diclorometano	1
	Etanólico	> 1
JUANITAS (La Torre)	Diclorometano	1
	Etanólico	> 1
MAHLER (Paiz)	Diclorometano	> 1
	Etanólico	> 1
<b>Control positivo</b>	<b>Fluconazol</b>	<b>1.87</b>

Fuente: Datos experimentales

## 7.9. Capacidad antioxidante

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la actividad antioxidante mediante cromatografía en capa fina, utilizándose para ello el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).

En la cromatoplaque se pudo observar la decoloración de las bandas de los extractos de las muestras de laurel en estudio al igual que la decoloración de las bandas de los estándares, después de haberlas asperjado con una solución de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). Los extractos de etanol mostraron una decoloración pronunciada y total de la banda, mientras que los de diclorometano mostraron solamente una pequeña decoloración en la parte superior de la banda, siendo esto indicativo de la posible presencia de actividad antioxidante en los extractos de las muestras de laurel.

**Cuadro No. 18:** Capacidad antioxidante mediante cromatografía en capa fina en los extractos secos de las diferentes muestras de laurel

Lugar	Extracto	Número banda	Inhibición del radical libre (DPPH)
Mercado Central	Diclorometano	1	+
	Etanólico	1	+
CENMA	Diclorometano	1	+
	Etanólico	1	+
Juanitas (La Torre)	Diclorometano	1	+
	Etanólico	1	+
Mahler (Paiz)	Diclorometano	1	+
	Etanólico	1	+
Estándares	TBHQ (terc-butilhidroquinona)	1	+
	Rutina	1	+
	Quercetina	1	+
	Acido clorogénico	1	+
	Vitamina C	1	+
	Trolox	1	+
	Vitamina E	1	+

Fuente: Datos experimentales

Fase móvil: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26)

La cromatoplaça se asperjó con una solución de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) de 1mg/ml en metanol

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los extractos en términos de la concentración de inhibición al 50% ( $CI_{50}$ ), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de la absorbancia de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). La  $CI_{50}$  está expresada como la cantidad en miligramos del extracto en la cual la muestra va a inhibir en un 50% al radical libre (DPPH).

En los resultados se puede observar que los extractos de diclorometano tuvieron un valor de  $CI_{50}$  mayor que los valores de  $CI_{50}$  para los extractos de etanol en cada una de las muestras de laurel.

**Cuadro No. 19:** Concentración inhibitoria mínima de la actividad antioxidante de los extractos secos de laurel por el reactivo de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

Muestra	Extracto	Actividad antioxidante CI <sub>50</sub> (mg/ml)
		Promedio
Mercado central	Diclorometano	1.93 ± 0.20
	Etanol 70%	0.44 ± 0.04
CENMA	Diclorometano	2.70 ± 0.08
	Etanol 70%	0.54 ± 0.06
Juanitas (La Torre)	Diclorometano	2.71 ± 0.18
	Etanol 70%	0.55 ± 0.03
MAHLER (Paiz)	Diclorometano	1.69 ± 0.12
	Etanol 70%	0.62 ± 0.09
Estándar Vitamina C		0.01275 ± 0.08
Estándar Rutina		0.02421 ± 0.10

Fuente: Datos experimentales

En el siguiente cuadro se muestra el promedio del porcentaje de flavonoides presentes en las muestras de laurel. Se puede observar que las muestras de laurel que mostraron mayor porcentaje de flavonoides fueron las procedentes de los supermercados La Torre (Juanitas) y supermercados Paiz (Mahler), siendo el procedente del supermercado La Torre (Juanitas) el que mostró el mayor porcentaje de flavonoides.

**Cuadro No. 20:** Determinación de porcentaje de flavonoides por el método espectrofotométrico con rutina en las hojas secas de las muestras de laurel

Muestra	Porcentaje Flavonoides
	Promedio
Mercado Central	5.98 ± 0.09
CENMA	5.22 ± 0.11
Juanitas	8.33 ± 0.18
MAHLER	7.10 ± 0.04

Fuente: Datos experimentales

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A las muestras de laurel se les realizaron algunas pruebas fisicoquímicas tales como porcentaje de humedad, cenizas totales, pH y densidad, las cuales dan idea de la calidad y pureza (presencia de material inorgánico) en la droga vegetal. El porcentaje de humedad (entre 8 y 10%) de las muestras cumple con el parámetro estándar del porcentaje permitido en una droga vegetal, el cual no tiene que ser mayor del 10%. El porcentaje de cenizas totales es un parámetro que indica la pureza de una droga vegetal, al indicar la presencia de metales pesados, arcilla, minerales y material orgánico. El porcentaje encontrado fueron menores del 5%, el cual de acuerdo a varias Farmacopeas debe ser no mayor del 5%. Con las muestras se preparó una tintura para determinar su pH y densidad. El pH de las tinturas fue de un valor promedio de 5.8, indicando que fueron levemente ácidas y no cumplen con los valores recomendados por la Farmacopea española, el cual establece que el valor de pH debe ser entre 6 y 7.

Así mismo se realizó la prueba de sólidos totales. En base a los resultados se seleccionó el disolvente de etanol cuya concentración mostró el mayor porcentaje de rendimiento (ver cuadro No. 2).

Los extractos secos de las cuatro muestras de laurel se obtuvieron por percolación. El mejor porcentaje de rendimiento se obtuvo en los extractos de etanol al 70% (con valor promedio de 27%). Para los extractos de diclorometano se obtuvieron porcentajes de rendimiento bajos (con valor promedio de 6%), siendo esto indicativo de que las sustancias mayoritariamente presentes en las muestras son de naturaleza polar.

El promedio de porcentajes de rendimiento de aceites esenciales para las cuatro muestras de laurel fueron parecidos (ver cuadro No. 4). Esto indica que no existe diferencia en el porcentaje de rendimiento en la extracción de aceites esenciales de las muestras de laurel obtenidos de dos mercados con respecto a las dos muestras de laurel de marcas comerciales.

No se encontró variabilidad en los valores de los índices de refracción de los aceites esenciales de las muestras de laurel de los mercados con respecto a las de dos marcas comerciales, encontrándose un índice de refracción con valor promedio de 1.1220 a 20 grados centígrados (ver cuadro No. 5).

Dichos resultados son parecidos a los reportados en un estudio de seminario, en donde se encontró en los aceites esenciales un valor promedio de índice de refracción de 1.1274 a 20 °C (Tucux, V., et al., 2012). En la revisión de un estudio sobre obtención y caracterización del aceite esencial y oleorresina de dos especies de laurel y orégano, se obtuvo para los aceites esenciales de las muestras de laurel un índice de refracción con valor promedio de 1.474 para la especie *Litsea glaucescens* HBK y para la especie *Litsea guatemalensis* Mez un valor promedio de 1.477 (Cano, 2010). En otro estudio reciente sobre evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel, se determinó que el índice de refracción de los aceites esenciales de las muestras estuvieron en el rango de 1.4686 – 1.4801 (Cruz, 2012). En base a la revisión de los tres estudios citados se deduce que el índice de refracción normalmente obtenido para el aceite esencial de hojas de laurel tiene un promedio en el rango de 1.45 – 1.48, por lo que el índice de refracción promedio obtenido para los aceites en este estudio se desvían de dicho rango.

Las hojas de laurel procedentes de ambos mercados (Mercado Central y CENMA) mostraron casi la misma cantidad de componentes mayoritarios en sus aceites esenciales, detectándose 15 componentes en el aceite del Mercado Central y 16 en el aceite del Mercado Central de Mayoreo. Los componentes detectados en los aceites de ambos mercados fueron casi los mismos, variando solamente en sus porcentajes, pudiéndose detectar en las muestras algunos componentes que se esperan encontrar en los aceites esenciales de laurel, como por ejemplo: linalool, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pineno, limoneno y  $\beta$ -cariofileno. En el aceite esencial de la marca comercial JUANITA'S se identificaron 14 componentes, mientras que el de la marca Mahler se detectaron 12. Los terpenos identificados en las marcas comerciales muestreadas fueron casi los mismos:  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, linalool y terpinen-4-ol.

Existe cierta variabilidad en cuanto a la composición química de los aceites esenciales que se distribuyen en los mercados con respecto a los de marcas comerciales, ya que en las marcas comerciales el 1,8-cineol estaba presente, mientras que no se detectó en las muestras de los mercados, y la variación de los porcentajes del resto de los componentes mayoritarios ( $\alpha$ -pineno, camfeno, D-limoneno, linalool, dihidrocarvona,  $\alpha$ -terpineno, terpinen-4-ol) detectados en los aceites de los mercados con respecto al de las marcas comerciales.

En algunos estudios previos, en donde se ha hecho la caracterización de los aceites esenciales de las hojas de *Litsea guatemalensis*, se ha encontrado también variabilidad en cuanto a la composición química de sus aceites esenciales. En un estudio en donde se evaluó la composición fitoquímica y actividad biológica de aceites y extractos mediante ensayos fisicoquímicos y organolépticos del complejo de especies de laurel aromático distribuidos en Guatemala, se encontró que en la caracterización de los aceites esenciales hubo una gran variabilidad en la composición química dependiendo de la procedencia, estado fenológico y ontológico de las muestras (Cruz, 2012). En otra publicación sobre la composición química del aceite esencial de *Litsea guatemalensis* en diferentes lugares en Guatemala, también se halló que la alta variabilidad química de los aceites esenciales dependía de las condiciones de la zona de colecta, o sea que dependía de si la región geográfica era tropical, subtropical, seca o húmeda, siendo estos factores determinantes en la variabilidad de la composición química de los aceites esenciales (Cruz, S., et al., 2010).

Para la muestra proveniente del Mercado Central se identificaron quince componentes, siendo los cuatro mayoritarios el D-limoneno (13.88%), dihidrocarvona (6.724%),  $\alpha$ -pineno (6.343%) y camfeno (4.152%) (ver anexo 12.14). En la muestra proveniente del mercado CENMA se identificaron 16 componentes, siendo los cuatro mayoritarios también el D-limoneno (18.08%),  $\alpha$ -pineno (9.358%), camfeno (5.748%), y dihidrocarvona (3.357%) (ver anexo 12.15).

En la marca comercial Juanita's se identificaron 14 componentes, siendo los cuatro mayoritarios el 1,8-cineol (34.2%),  $\alpha$ -pineno (7.081%), linalool (1.78%) y terpinen-4-ol

(0.95%) (ver anexo 12.16). En la marca comercial Mahler se identificaron 12 terpenos, siendo los cuatro mayoritarios 1,8-cineol (36.1%),  $\alpha$ -pineno (9.085%), linalool (0.97%) y terpinen-4-ol (0.65%) (ver anexo 12.17).

En base a los resultados anteriores se puede deducir que las muestras de laurel provenientes de ambos mercados presentaron casi la misma cantidad y tipos de componentes en sus aceites esenciales, y los mayoritarios también fueron los mismos variando un poco nada más en sus porcentajes.

En el ensayo macro y semi micro para la prueba de saponinas, se pudo observar formación de espuma en los extractos etanólicos de las cuatro muestras de laurel (ver anexo 12.10). Para confirmar la presencia de estos metabolitos se realizó una cromatografía en capa fina. Se encontró en todos los extractos de diclorometano solamente una banda, mientras que los etanólicos dos.

Ninguna de las bandas observadas tuvieron un Rf que coincidiera con alguno de los Rf's de los estándares de saponinas que se utilizaron (0.1% y 0.2%), por lo que se deduce que los extractos presentan saponinas diferentes a los estándares (ver anexo 12.10).

En el ensayo macro y semi micro para la prueba de flavonoides y antocianinas solamente los extractos etanólicos de las muestras de laurel dieron resultados positivos (ver anexo 12.8).

La cromatografía en capa fina mostró que solamente los extractos etanólicos presentaron varias bandas, mientras que los diclorometánicos solamente una. Esto puede deberse a que las estructuras glicosídicas de dichos metabolitos son de naturaleza polar, por lo que no fueron extraídos con diclorometano, que es un solvente apolar (ver anexo 12.9). En el cromatograma también se pudo observar la fluorescencia en las bandas bajo luz ultravioleta (ver anexo 12.9). En base a lo anterior esto indica la presencia de flavonoides y antocianinas en los extractos de las muestras de laurel.

En la cromatografía en capa fina de aceites volátiles que se le realizaron a los extractos de las muestras, los extractos de diclorometano de las cuatro muestras de laurel presentaron

la mayor cantidad de bandas (ver cuadro No. 14), mientras en los extractos de etanol solamente hubo presencia de una banda. Siendo los extractos diclorometánicos los que mostraron mayor variedad y cantidad de terpenos detectados. Esto puede deberse a que en los extractos de diclorometano se utilizó un solvente apolar, siendo los solventes apolares más afines a los aceites volátiles (ver anexo 12.5).

El tamizaje antimicrobiano consiste en una prueba preliminar en la cual se determina contra cuáles bacterias presenta actividad inhibitoria los extractos de las muestras de laurel. En el tamizaje antimicrobiano se evalúa la actividad inhibitoria de un producto, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo y el espectro de inhibición. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad se hace por métodos de dilución, que sirve tanto para el tamizaje como para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir al microorganismo (Cruz, S., et al., 2008).

Algunos extractos de las muestras presentaron actividad inhibitoria contra las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (ver anexo 12.11 y cuadro No. 15).

Las muestras de laurel procedente del Mercado Central y CENMA, en sus extractos de diclorometano presentaron actividad inhibitoria contra *Bacillus subtilis* a una CIM de 0.125 mg/ml y contra *Mycobacterium smegmatis* a una CIM de 0.25 mg/ml, mientras que en sus extractos etanólicos solamente presentaron actividad contra *Mycobacterium smegmatis* a una CIM de 1 mg/ml (ver anexo 12.12).

La muestra de laurel procedente del supermercado La Torre (Juanita's), en su extracto de diclorometano presentó actividad contra *Bacillus subtilis* a una CIM de 0.5 mg/ml y contra *Mycobacterium smegmatis* a una CIM de 1 mg/ml, y en su extracto etanólico también presentó actividad contra *Bacillus subtilis* a una CIM de 1 mg/ml y contra *Mycobacterium smegmatis* a una CIM de 1 mg/ml. El laurel procedente del supermercado Paiz (Mahler), en su extracto de diclorometano presentó actividad contra *Bacillus subtilis* a

una CIM de 0.5 mg/ml y contra *Mycobacterium smegmatis* a una CIM de 0.5 mg/ml (ver anexo 12.12).

Las hojas de laurel evaluadas poseen actividad contra *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis*, siendo este resultado consistente con publicaciones anteriores sobre un trabajo de tesis y un estudio de investigación (Tucux de León V, et al., 2012 y Cruz S, et al., 2008).

Solamente los extractos de diclorometano de las muestras procedentes del Mercado Central, CENMA y el del supermercado La Torre (Juanita's) presentaron actividad inhibitoria contra *Candida albicans*, siendo el CIM para la muestra de CENMA y supermercado La Torre (Juanita's) de 1 mg/ml, y el del Mercado Central de 0.5 mg/ml (ver anexo 12.12).

De acuerdo con la revisión de literatura, la tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero sí moderada actividad contra *C. albicans*, *E. floccosum* y *M. canis*. El extracto etanólico presenta actividad insecticida contra hormigas (Cáceres, 2009).

Como prueba preliminar de acción antioxidante se realizó una cromatografía en capa fina. En ella se encontró diferencia en cuanto a la actividad antioxidante de los extractos, ya que al asperjar con solución de DPPH se produjo decoloración total en las bandas de los extractos etanólicos, mientras que los diclorometánicos solo hubo una pequeña decoloración, siendo esto indicativo de una posible mayor actividad antioxidante por parte de los extractos etanólicos en comparación con los diclorometánicos (ver anexo 12.6 y anexo 12.7).

En la prueba de DPPH los extractos etanólicos presentaron valores de  $CI_{50}$  menores que la de los diclorometánicos de las cuatro muestras de laurel (ver cuadro No. 19), siendo esto indicativo de que los extractos etanólicos presentan mayor actividad antioxidante que los diclorometánicos, ya que un valor menor en esta concentración del  $CI_{50}$  significa que se necesita una concentración menor del extracto para realizar su actividad antioxidante.

En base a los resultados de la prueba en la determinación de la actividad antioxidante por medio del método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) utilizando espectrofotometría UV visible, se pudo comprobar en base a los valores del  $CI_{50}$  que los extractos secos de las muestras poseen actividad antioxidante, lo cual coincide con varios estudios previos en donde se ha mostrado que los extractos secos de las hojas de laurel presentan actividad antioxidante (Cáceres, A., et al., 2009, Cruz, 2012 y Tucux, V., et al., 2012).

El cuadro No. 20 muestra el promedio del porcentaje de flavonoides para cada una de las cuatro muestras, siendo éste mayor en las marcas comerciales obtenidas en los supermercados y menor en las de los mercados de la ciudad capital.

Esto puede deberse a que las hojas de laurel que se comercializan en los mercados proceden de localidades con condiciones climáticas desfavorables, y el cuidado de los árboles de laurel no es el adecuado, como por ejemplo insuficiente irrigación y suelo seco y contaminado, mientras que puede ser que el laurel de marcas comerciales (Mahler y Juanita's) provenga de condiciones más favorables, y con mejores cuidados de sus suelos, y que haya sido sometido a controles estrictos en cuanto a secado, almacenaje y empaque para su comercialización.

El análisis estadístico indica que la población de la que se extrajo la muestra de hojas de laurel tiene una variación estadísticamente significativa en las medias de cenizas totales,  $CI_{50}$  en los extractos de diclorometano,  $CI_{50}$  en los extractos de etanol al 70% y porcentaje de flavonoides. Esto debido a que los valores de P de dichas pruebas mostraron un valor menor a 0.05, por lo que fue necesario determinar entre cuáles muestras de laurel existe diferencia significativa por medio de la prueba de Tukey HSD, una prueba de comparaciones múltiples.

Se pudo determinar mediante la prueba de cenizas totales que solamente las hojas de laurel de la marca Juanitas mostró una diferencia estadísticamente significativa en las medias con respecto del resto de las muestras de laurel analizadas (ver anexo 12.9).

Por otro lado se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa en el  $CI_{50}$  de los extractos de diclorometano entre las muestras de Mahler y Mercado Central con respecto a las muestras de CENMA y Juanita's (ver anexo 12.20), que existe diferencia estadísticamente significativa en el  $CI_{50}$  del extracto etanólico del Mercado central con respecto a la muestra de Mahler (ver anexo 12.21), así como diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de flavonoides entre cada una de las cuatro muestras de laurel analizadas (ver anexo 12.22). En base al análisis estadístico existe variación en los parámetros de calidad anteriormente mencionados entre las hojas de laurel de los mercados con respecto a las de marcas comerciales, sin embargo en base a los resultados experimentales de los análisis realizados a los extractos secos de las muestras de laurel, no existe diferencia significativa, ya que los resultados en los parámetros de calidad mostraron resultados parecidos, con una variabilidad en que algunos extractos mostraron un resultado con una magnitud de una unidad mayor que el resto, y sin haber observado resultados con una gran diferencia de magnitud entre ellos, mostrando esto que en base a los resultados experimentales de los parámetros de calidad, no existe diferencia de calidad en las hojas de laurel de los mercados con respecto a las de marcas comerciales.

A pesar de que existió diferencia en los resultados de algunos parámetros de calidad evaluados, como por ejemplo en el porcentaje de flavonoides, en la ausencia de una concentración inhibitoria mínima (CIM) en el extracto diclorometánico de la muestra de laurel Mahler contra la levadura *Candida albicans* y en la variabilidad de la composición química de los aceites esenciales, como por ejemplo la detección de 1,8-cineol en los aceites de las hojas de laurel de marcas comerciales y su ausencia en las hojas de los mercados, se concluye que no existe diferencia en la calidad de las hojas de laurel que se distribuyen en dos mercados con respecto a dos marcas comerciales muestreadas en este estudio, ya que los resultados de los análisis de la mayoría de los parámetros de calidad evaluados a los extractos no mostraron diferencia entre ellos, como por ejemplo la evaluación de la actividad antimicrobiana y actividad antioxidante. La prueba del porcentaje de flavonoides no es una prueba determinante en la calidad de las hojas, y siempre existe cierta variabilidad en el porcentaje y contenido de aceites esenciales en las

hojas de laurel, ya que las condiciones de cultivo del laurel no siempre son las mismas, y esto varía dependiendo de la región, condiciones del suelo y época de colecta de las hojas, influyendo todo esto en que haya a veces cierta variación en el contenido de aceites esenciales.

## 9. CONCLUSIONES

- 9.1. Tanto las hojas de laurel (*Litsea guatemalensis*) que se comercializan en el Mercado Central y en el Mercado Central de Mayoreo (CENMA) como las marcas comerciales que se distribuyen en los supermercados Paiz y La Torre cumplieron con las pruebas fisicoquímicas evaluadas de porcentaje de humedad, pH, densidad y porcentaje de cenizas totales.
- 9.2. Las hojas de laurel de marcas comerciales presentaron mayor porcentaje de rendimiento de aceites esenciales que la de los mercados, siendo el porcentaje de las muestras las siguientes: Mercado Central de Mayoreo (CENMA) de 0.87%, Mercado Central de 1.12%, Juanita's de 1.16% y el de Mahler de 1.40%.
- 9.3. La identificación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los componentes de los aceites esenciales extraídos de las cuatro muestras de laurel mostraron los mismos componentes mayoritarios, los cuales fueron: D-limoneno, dihidrocarvona,  $\alpha$ -pineno, camfeno, linalool y terpinen-4-ol, siendo el 1,8-cineol el componente no detectado en los aceites procedentes de los mercados, y el cual sí fue hallado en los aceites de las hojas de laurel de marcas comerciales.
- 9.4. Los extractos secos etanólicos y de diclorometano de las muestras procedentes de los dos mercados y las dos marcas comerciales mostraron los siguientes metabolitos secundarios: saponinas, flavonoides y antocianinas y aceites volátiles.
- 9.5. Los extractos secos de las muestras procedentes de los mercados y de las marcas comerciales mostraron actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis*, variando solamente en los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM).
- 9.6. Todos los extractos etanólicos de las muestras mostraron mayor actividad antioxidante que sus extractos respectivos de diclorometano, evidenciándose esto en el valor de  $CI_{50}$  menor que mostraron dichos extractos.

- 9.7.** En base a los resultados obtenidos no se observó diferencia en la actividad antioxidante en base al valor del  $CI_{50}$  en los extractos secos de las hojas de laurel que se distribuyen en los mercados Central y CENMA con respecto a los extractos secos de marcas comerciales obtenidas en supermercados.
- 9.8.** No se encontró diferencia en la actividad antimicrobiana en base al valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en los extractos secos de las muestras procedentes de los mercados Central y CENMA con respecto a los extractos secos de marca comercial obtenidos en los supermercados.
- 9.9.** En base a las pruebas fisicoquímicas, como a la evaluación de la actividad biológica de sus extractos secos, se pudo determinar que no existe diferencia en la calidad de las hojas de laurel que se distribuyen en dos mercados con respecto a la de las dos marcas que se comercializan en dos supermercados diferentes en la ciudad de Guatemala.

## 10. RECOMENDACIONES

- 10.1.** Ampliar el muestreo de las hojas de laurel que se comercializan en la ciudad de Guatemala, detectando a los productores para propiciar la conservación, manejo de la especie y aprovechamiento sostenible.
- 10.2.** Continuar con el estudio biológico y químico a las muestras de laurel que presentaron actividad biológica y química, con el objetivo de utilizarlas con fines medicinales y/o cosméticas.
- 10.3.** Proponer y diseñar productos alimenticios, fitofarmacéuticos y cosméticos a base de extractos y aceites esenciales de hojas de laurel.
- 10.4.** Elaborar una monografía de calidad para establecer los parámetros fisicoquímicos para garantizar la calidad, seguridad y eficacia de la materia vegetal que se comercializa en la ciudad de Guatemala.

## 11. REFERENCIAS

- Atlas de las plantas medicinales y curativas, la salud a través de las plantas.* (1998). España: Editorial Cultural S.A.
- Bendich, A. (1989). Carotenoids and the immune response. *Journal of Nutrition.* 119 (1), 112-115.
- Cáceres, A. (2009). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales.* Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala.* Guatemala: Editorial universitaria.
- Cáceres, A. (2009). Actividad antioxidante de diez especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutracéuticos (Proyecto FODECYT 28-2007). Facultad de ciencias químicas y farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cano, T. M. (2010). Obtención y caracterización del aceite esencial y oleorresina de dos especies de laurel y orégano (Proyecto Fodecyt No. 111-2006). Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Carbonell, F. (2001). Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular. *Boletín fisiología Médica.* 2 (1), 1-3.
- Cruz, S., & Cáceres, A. (2011). Actividad biológica y composición química de especies del género *Litsea* en Mesoamérica: Una Revisión. *Revista Científica,* 21(2), 70-81.
- Cruz, S.; Cáceres, A.; Medinilla, B.; Paredes, M.E. y Orozco, R. (2008). Caracterización química y evaluación de la actividad biológica de *Bourreria huanita* (Llave & Lex.) Hemsl. (Esquisuchil) y *Litsea guatemalensis* Menz. (Laurel). Recuperado de [http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/investigacio\\_files/RESUMEN/inf0887.html](http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/investigacio_files/RESUMEN/inf0887.html)

- Cruz, S. M. (2012). Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (*Litsea glaucescens* Kunth y *L. guatemalensis* Mez) (Tesis de Doctorado). Recuperado de <http://www.docinade.ac.cr/pmwiki/uploads/XISeminario/smcv.pdf>
- Cruz, S. M., Mérida, M., Pérez, F., Santizo, A. & Cáceres, A. (2010). Chemical composition of essential oil of *Litsea guatemalensis* (Mexican Bay) from different provenances of Guatemala. Recuperado de [http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=964\\_5](http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=964_5)
- Duke, J.A. y Archley, A.A. (1986). *Hanbook of proximate analysis tables of higher plants*. Florida: CCR Press Edition.
- Font, P. (1982). *Diccionario de Botánica*. España: Editorial Labor S.A.
- Genaro, A.R. (1998). *Remington, ciencia y práctica de la farmacia* (19a ed.). (2 tomos). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Gobierno de Chile, Fundación para la innovación agraria. (2003, febrero 8). *Boletín de plantas medicinales y aromáticas*. Chile: Autor.
- Jayes Reyes, P.; Navas, P.; Pérez Sabino, F.; De León, J. L.; Farfán Barrera, C. y Mérida Reyes, M. (2006). Aceites esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala, familias Verbenaceae y Lauraceae. Guatemala. Recuperado de: [http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/digirevista\\_files/.../aceites.pdf](http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/digirevista_files/.../aceites.pdf)
- Martínez, J.V. (1995). Informe nacional para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos. Guatemala. Recuperado de: <http://www.pgrfa.org/gpa/gtm/pdfs/guatemala.pdf>
- Martínez, A. (2001). Aceites esenciales. Colombia: Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. Recuperado de: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>

- Martínez Flores, S; Gonzalez Gallego, J; Culebras, J.M; y Tuñon, M.J. (2002). Flavonoides; propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17 (6), 271-278.
- Medinilla, B. (2009). *Documento de apoyo, Introducción a la farmacognosia, concepto y desarrollo, ciencias relacionadas, importancia y futuro*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Medinilla, B; Cruz, S. y Oliva, I. (2010). *Manual de Laboratorio de Farmacognosia*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Méndez, V. (2002). *Determinación de la actividad cicatrizante de las hojas de Litsea guatemalensis (laurel) en heridas producidas a ratas albinas* (tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Mims, C; Playfoir, J; Roin, I; Wakelin, D. y Rosamund, W. (1999). *Microbiología Médica* (2a ed). España: Editorial Harcourt Brace.
- Murray, P; Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2006). *Microbiología Médica* (5a ed.). México: Editorial ELSEVIER.
- Narayanaswamy, N., & Balakrishnan, K. P. (2011). Evaluation of some medicinal plants for their antioxidant properties. *International Journal of PharmTech Research*, 3(1), 381-385. Recuperado de <http://www.researchgate.net/publications/PublicPostFileLoader.html?id=54e82562d767a6234e8b45a0&key=a8a14e4f-c43a-474d-a06f-fcd37d07bfed>.
- Ocampo, R.A; Martínez, J.V. y Cáceres, A. (2007). *Manual de Agrotecnología de plantas medicinales nativas, proyecto de desarrollo de tecnología de cultivo de plantas medicinales y productos fitoterápicos*. Costa Rica: Sanabria.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). *Buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales*. Suiza: Autor
- Organización Mundial de la Salud. (2005). *Guía del curso de gestión de calidad para laboratorios*. Ginebra: Autor.
- Ortiz, C. (2005). *Obtención y comparación fisicoquímica a nivel de laboratorio del aceite esencial de laurel de dos diferentes especies (L. guatemalensis Mez. y L. glaucescens HBK.) colectadas en tres diferentes lugares* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Paredes, M.E. (2005). *Determinación de algunos estándares de identidad y pureza de cuatro plantas medicinales comerciales en Guatemala* (Tesis de Maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Pineda, A.L. (2005). *Determinación de las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (Pouteria viridis) que se cultivan en tres regiones de Guatemala* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Prakash, V., Mishra, P. K., & Mishra M. (2009). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plant Research*, 3(8), 608-612. Recuperado de [http://www.academicjournals.org/article/article1380372813\\_Veeru%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380372813_Veeru%20et%20al.pdf).
- Quíñonez, S.P. (2008). *Actividad micobactericida de extractos de árboles popularmente utilizados para infecciones pulmonares* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Robbins, S.L; Cotran, R.S. y Kimar, V. (1995). *Patología estructural y funcional* (5a ed.). México: McGrawHill Interamericana.

- Rodríguez, C. (2000). *Autenticación citohistológica de cuatro plantas medicinales nativas* (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos*. Colombia: Editorial CYTED.
- Skoog, D; Holler, F.J; Nieman, T. (1992). *Principios de análisis Instrumental* (5a ed.). España: McGraw-Hill.
- Sólis, P; De Solis, N; Gattuso, S. y Cáceres, A. (s.f.) *Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto de Desarrollo y Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos*. Guatemala: OEA/AICD/AE.
- Standley, P; Steyermark, J.A; (1946). *Flora of Guatemala*. Chicago: Natural History Museum.
- Stephens, N.G; Parsons, A; Schofield, P.M; Kelly, F; Cheeseman, K; Mitchinson, M.J. y Brown, M.J. (1996). *Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study*. CHAOS: Lancet
- Surai, P.F. (s.f.). *Protección antioxidante en el intestino, un buen comienzo es la mitad de la batalla*. Auchincruive, Ayrshire, Scotland: Scottish Agricultural College. Recuperado en: [http://www.engormix.com/nuevo/prueba/alltech\\_notas.asp](http://www.engormix.com/nuevo/prueba/alltech_notas.asp)
- Trease, G.E. y Evans, W.C. (1984). *Farmacognosía*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Tucux de León V.A.; Mata, M.A. y Leiva B.C. (2012). *Evaluación comparativa del contenido fitoquímico y actividad biológica in vitro de Litsea guatemalensis colectada en dos regiones y épocas diferentes en Guatemala* (tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

Vallverdú, C.; Vila, R.; Cruz, S.; Cáceres, A. y Cañigüeral, S. (2005). Composition of the essential oil from leaves of *Litsea guatemalensis*. *Flavour and Fragrance Journal*. 20 (4), 415-418.

Vasconcellos, A. (s.f.). *Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud*. USA: Universidad de Chapman, Departamento de Ciencias de Alimentos y Nutrición.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 12.1: Preparación de los tubos de reacción para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH

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	-----	-----	Anexo 3	Anexo 3

### ANEXO 12.2: Preparación de la curva de lectura utilizando una serie de diluciones del extracto para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH.

Ensayos y sus blancos	Extracto	Metanol	Dilución
1	1 (20 $\mu$ l)	4 (80 $\mu$ l)	0.2
2	2 (40 $\mu$ l)	3 (60 $\mu$ l)	0.4
3	3 (60 $\mu$ l)	2 (40 $\mu$ l)	0.6
4	4 (80 $\mu$ l)	1 (20 $\mu$ l)	0.8
5	5 (100 $\mu$ l)	0 (0 $\mu$ l)	1.0

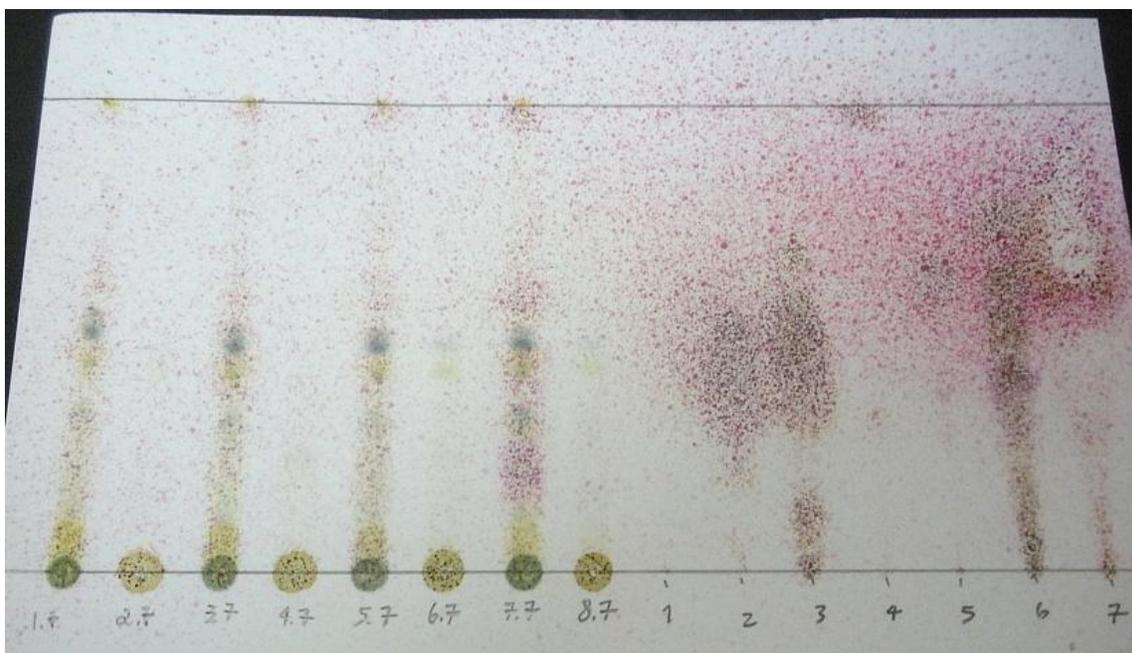
**ANEXO 12.3:** Registro de los resultados de la curva y determinación del porcentaje de inhibición de la absorbancia para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH

<b>Dilución o control</b>	<b>Medición de absorbancia 1  (tubos blanco del ensayo)</b>	<b>Medición de absorbancia 2  (tubos ensayos)</b>	<b>Promedio de absorbancias  (Abs1 – Abs2)</b>	<b>Porcentaje Inhibición de la concentración</b>
Control				
1 + 4 (0.2)				
2 + 3 (0.4)				
3 + 2 (0.6)				
4 + 1 (0.8)				
5 + 0 (1.0)				

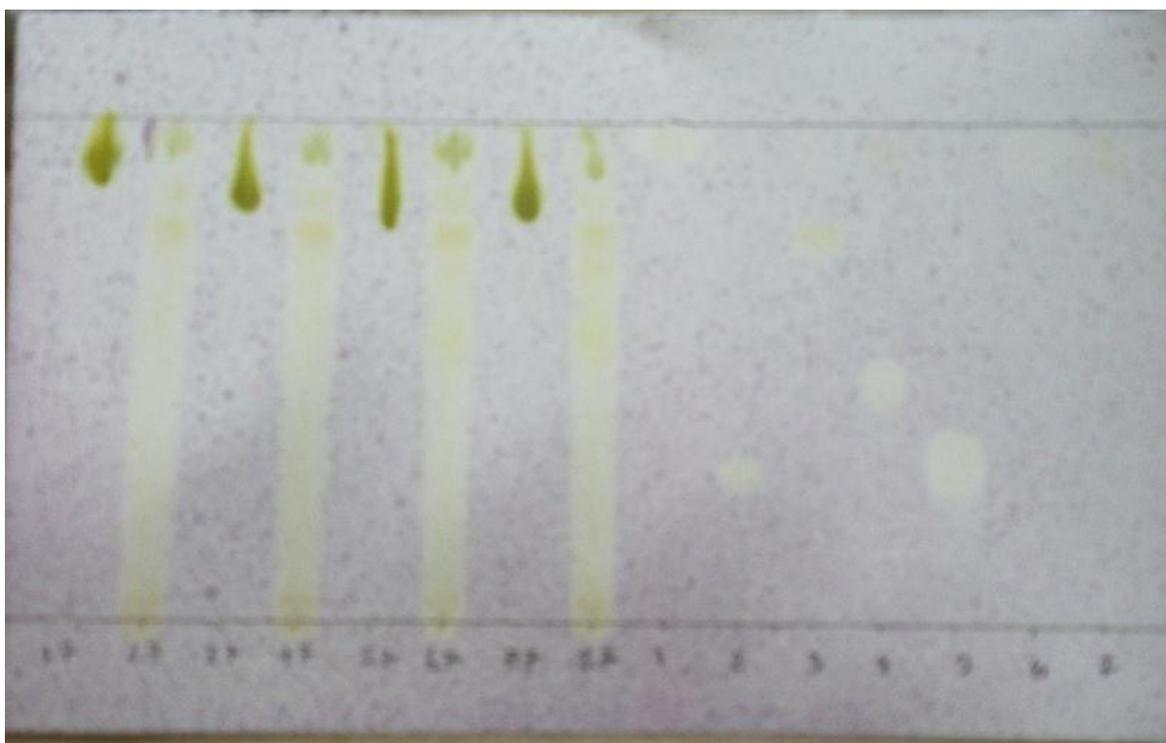
**ANEXO No. 12.4:** Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración de actividad antioxidante mediante el método de DPPH.

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

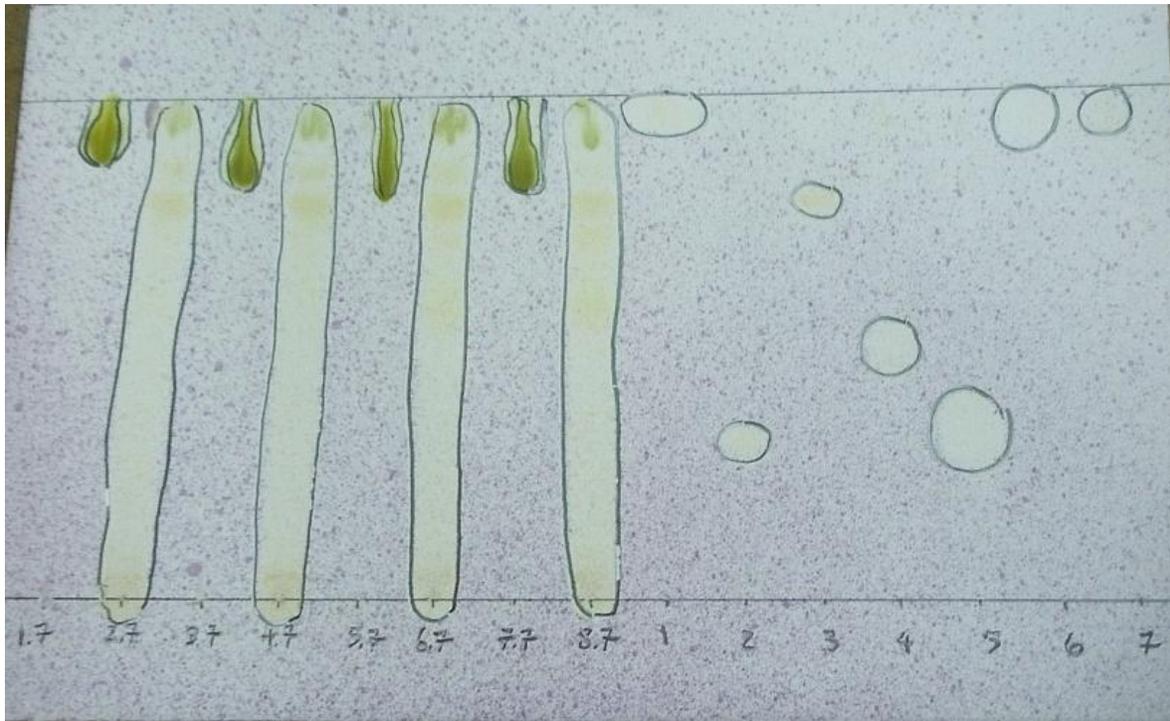
**ANEXO 12.5:** Cromatoplaaca de la prueba de aceites volátiles en los extractos secos de las muestras de laurel



**ANEXO 12.6:** Cromatoplaaca para la detección de actividad antioxidante por el reactivo de DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazilo)



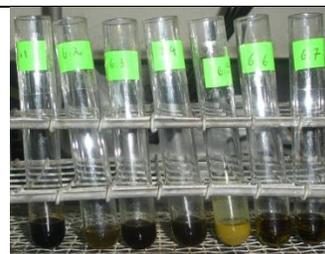
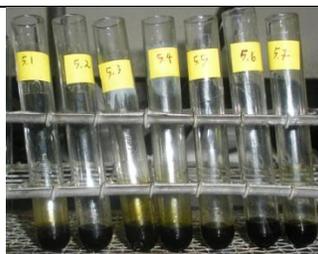
**ANEXO 12.7:** Cromatograma para la detección de actividad antioxidante por el reactivo de DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazilo).



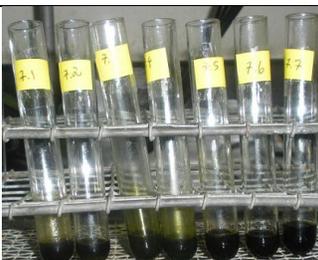
**ANEXO 12.8:** Ensayo macro y semimicro en la prueba de flavonoides y antocianinas realizadas a los extractos secos de las muestras de laurel

PROCEDENCIA DE LA MUESTRA CENMA	EXTRACTO DICLOROMETANO	EXTRACTO ETANOLICO
MERCADO CENTRAL		

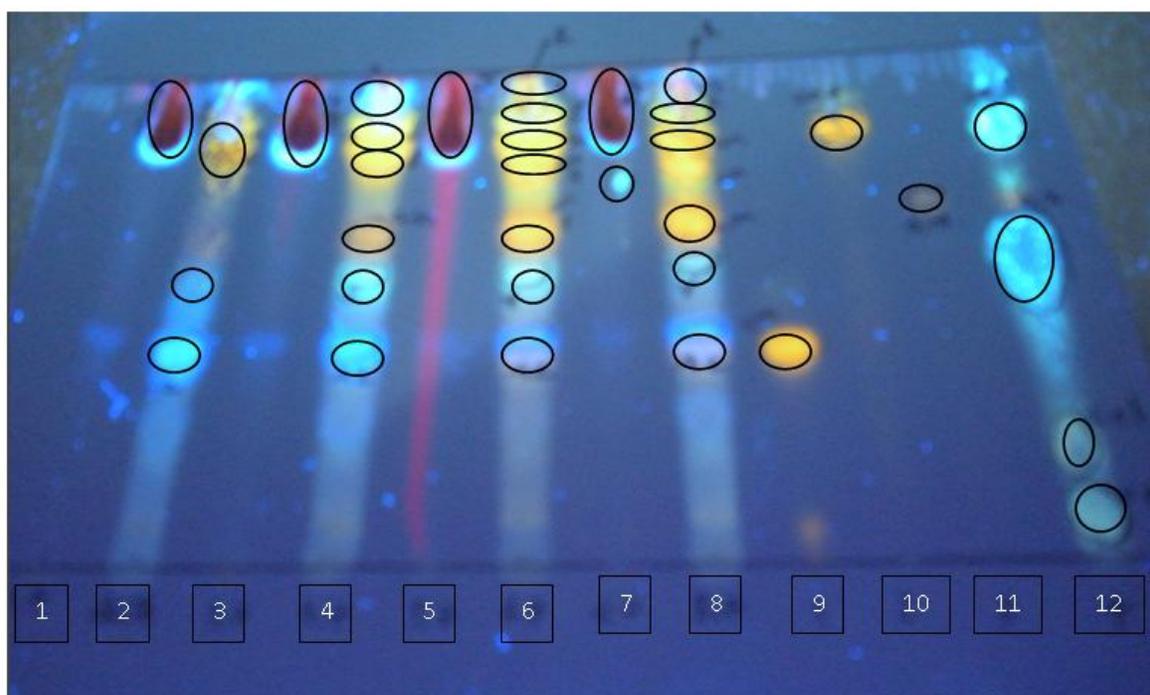
JUANITA'S (Supermercado  
La Torre)



MAHLER (Supermercado  
Paiz)



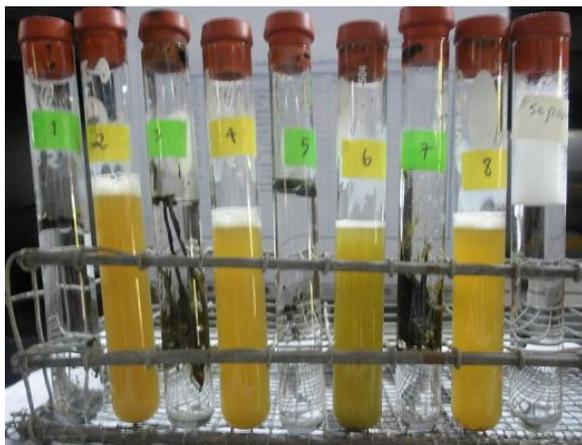
### ANEXO 12.9: Cromatograma de flavonoides y antocianinas



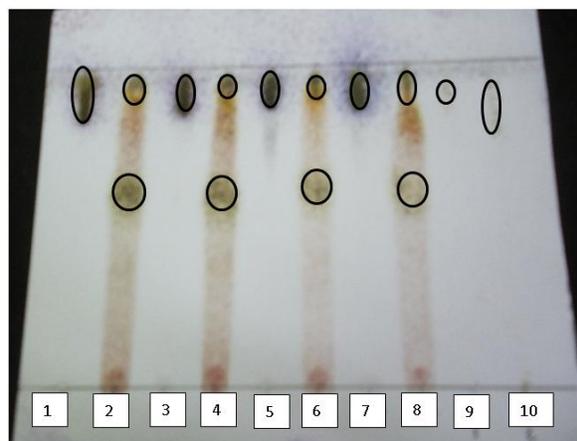
1. Extracto diclorometánico Mercado Central: Rf: 0.88
2. Extracto etanólico Mercado Central: Rf a: 0.39  
Rf b: 0.54  
Rf c: 0.88

3. Extracto diclorometánico CENMA: Rf: 0.88
4. Extracto etanólico CENMA: Rf a: 0.39  
Rf b: 0.54  
Rf c: 0.64  
Rf d: 0.80  
Rf e: 0.85  
Rf f: 0.94
5. Extracto diclorometánico Juanita's: Rf: 0.88
6. Extracto etanólico Juanitás Rf a: 0.39  
Rf b: 0.54  
Rf c: 0.64  
Rf d: 0.76  
Rf e: 0.80  
Rf f: 0.86  
Rf g: 0.92
7. Extracto diclorometánico Mahler: Rf a: 0.73  
Rf b: 0.88
8. Extracto etanólico Mahler: Rf a: 0.39  
Rf b: 0.54  
Rf c: 0.64  
Rf d: 0.76  
Rf e: 0.80  
Rf f: 0.88
9. Estándar Rutina: Rf: 0.38
10. Estándar Quercetina: Rf: 0.85
11. Estándar Hiperósido: Rf: 0.66
12. Estándar ácido clorogénico: Rf a: 0.55  
Rf b: 0.82

### ANEXO 12.10: PRUEBA DE SAPONINAS



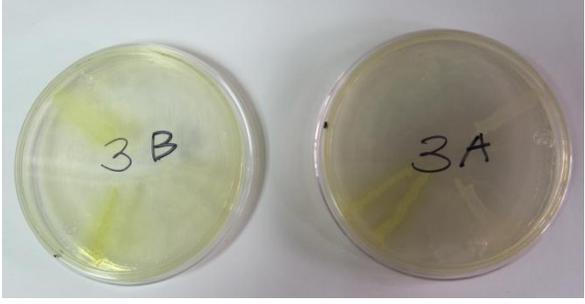
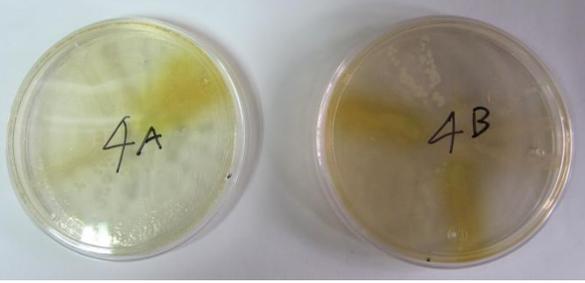
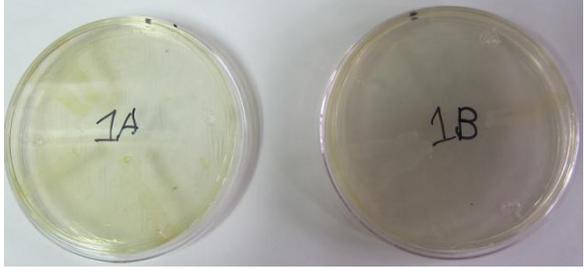
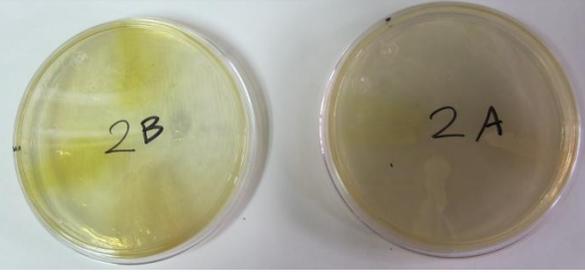
Prueba en espuma

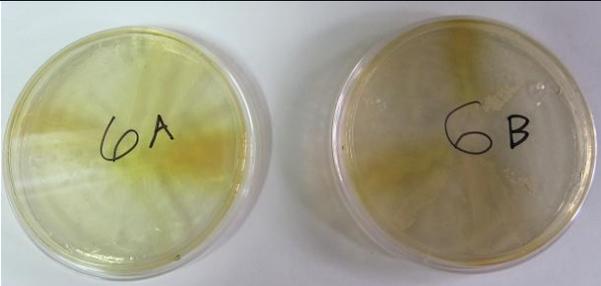
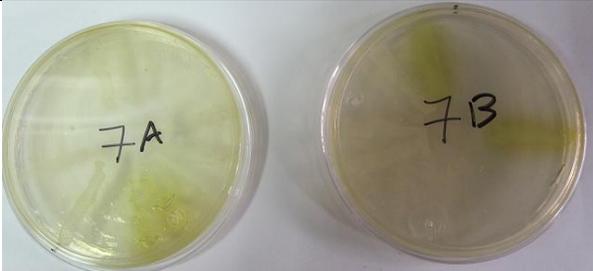
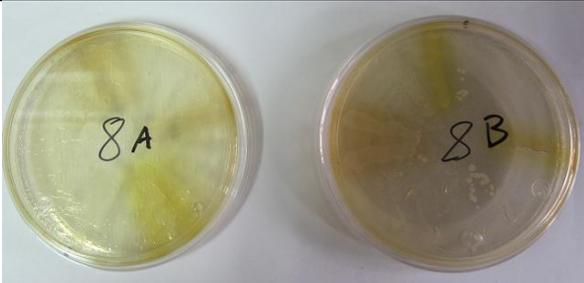


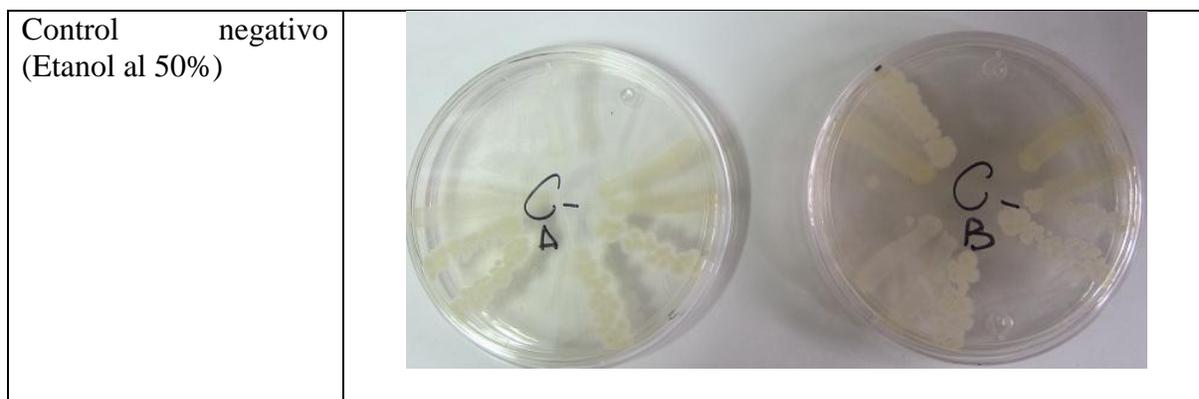
Cromatograma

1. Extracto diclorometánico Mercado Central: Rf: 0.94
2. Extracto etanólico Mercado Central: Rf a: 0.58  
Rf b: 0.94
3. Extracto diclorometánico CENMA: Rf: 0.94
4. Extracto etanólico CENMA: Rf a: 0.58  
Rf b: 0.94
5. Extracto diclorometánico Juanita's: Rf: 0.94
6. Extracto etanólico Juanitás Rf a: 0.58  
Rf b: 0.94
7. Extracto diclorometánico Mahler: Rf : 0.94
8. Extracto etanólico Mahler: Rf a: 0.58  
Rf b: 0.94
9. Estándar saponina (0.1%): Rf: 0.89
10. Estándar saponina (0.25): Rf: 0.86

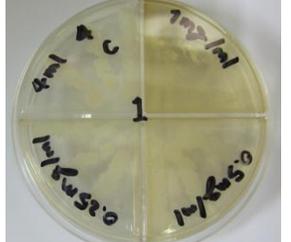
**ANEXO 12.11: Tamizaje antimicrobiano realizado a los extractos secos de las muestras de laurel**

MUESTRAS	EXTRACTO	
CENMA	Diclorometano	
	Etanólico	
MERCADO CENTRAL	Diclorometano	
	Etanólico	

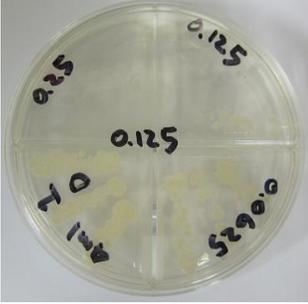
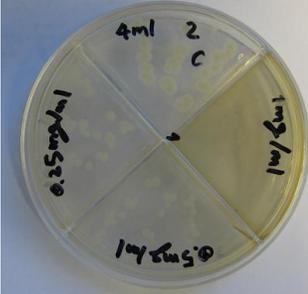
JUANITA'S (Supermercado La Torre)	Diclorometano	
	Etanólico	
MAHLER (Supermercado Paiz)	Diclorometano	
	Etanólico	



**ANEXO 12.12:** Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos contra el microorganismo en el cual se observó actividad positiva (inhibición de crecimiento) en el tamizaje antimicrobiano

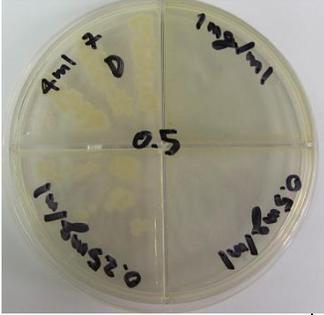
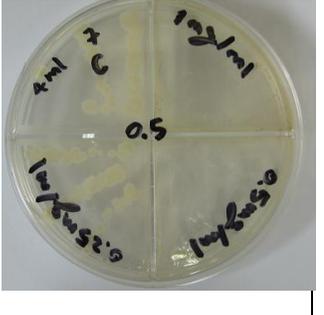
MUESTR A	MICROORGANISM O	EXTRACTO	CONCENTRACIÓ N (mg/ml)	
CENMA	<i>B.subtilis</i>	Diclorometan o	0.125	
	<i>M. smegmatis</i>	Diclorometan o	0.25	
		Etanólico	1	

	<i>C. albicans</i>	Diclorometano	1	

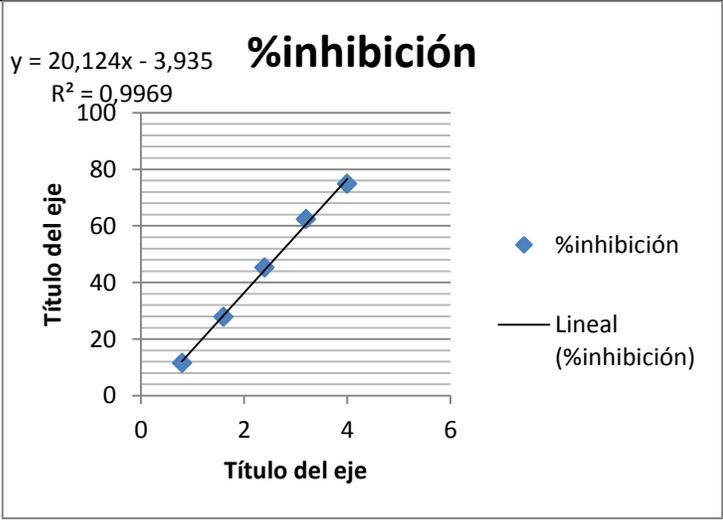
MUESTRA	MICROORGANISMO	EXTRACTO	CONCENTRACION (mg/ml)	
MERCADO CENTRAL	<i>B.subtilis</i>	Diclorometano	0.125	
	<i>M. smegmatis</i>	Diclorometano	0.25	
		Etanólico	1	

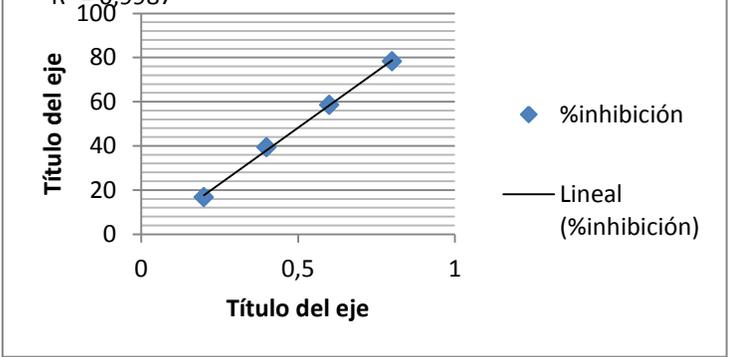
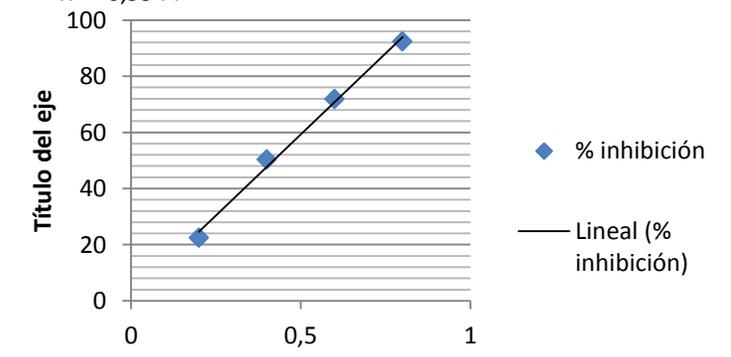
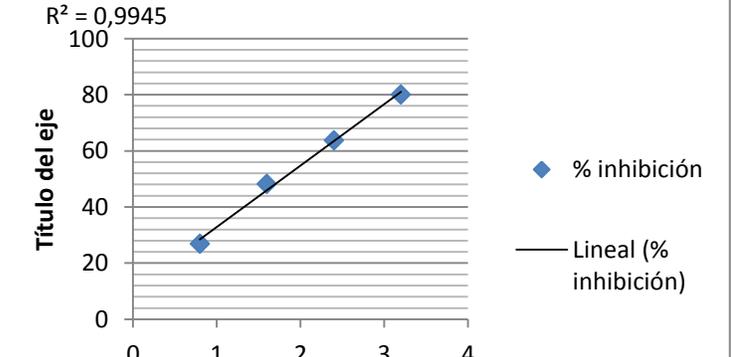
	<i>C. albicans</i>	Diclorometano	0.5	
--	--------------------	---------------	-----	--

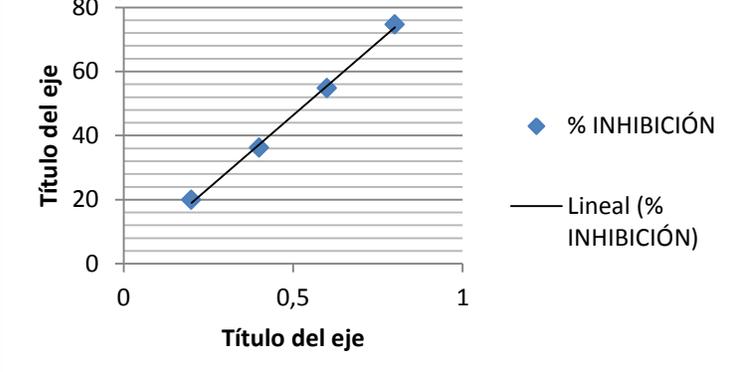
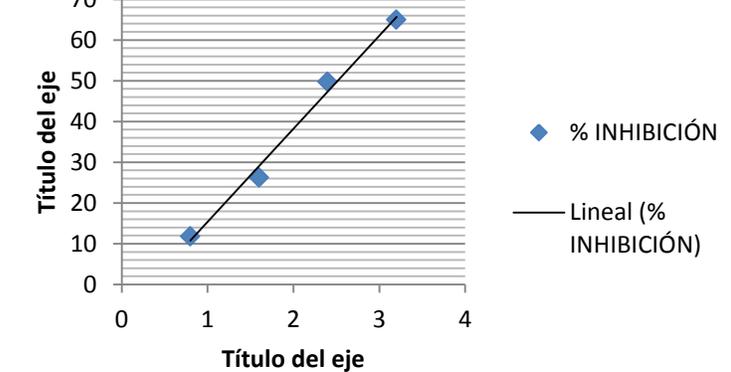
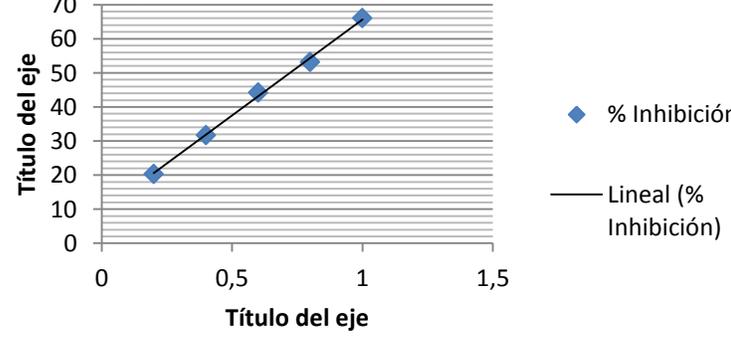
MUESTRA	MICROORGANISMO	EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	
JUANITA'S (Supermercado La torre)	<i>B.subtilis</i>	Diclorometano	0.5	
	<i>M. smegmatis</i>	Diclorometano	1 1	
	<i>C. albicans</i>	Diclorometano	1	

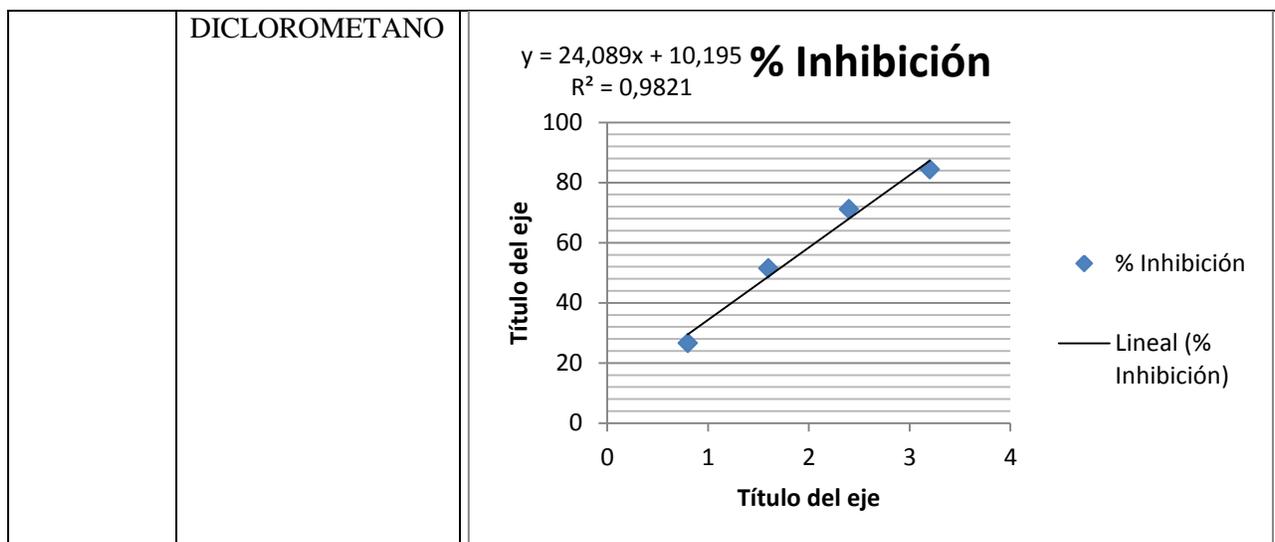
MUESTRA	MICROORGANISMO	EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	
MAHLER	<i>B.subtilis</i>	Diclorometano	0.5	
	<i>M. smegmatis</i>	Diclorometano	0.5	

**ANEXO 12.13:** Gráficas de regresión lineal en la prueba de actividad antioxidante mediante el método de DPPH

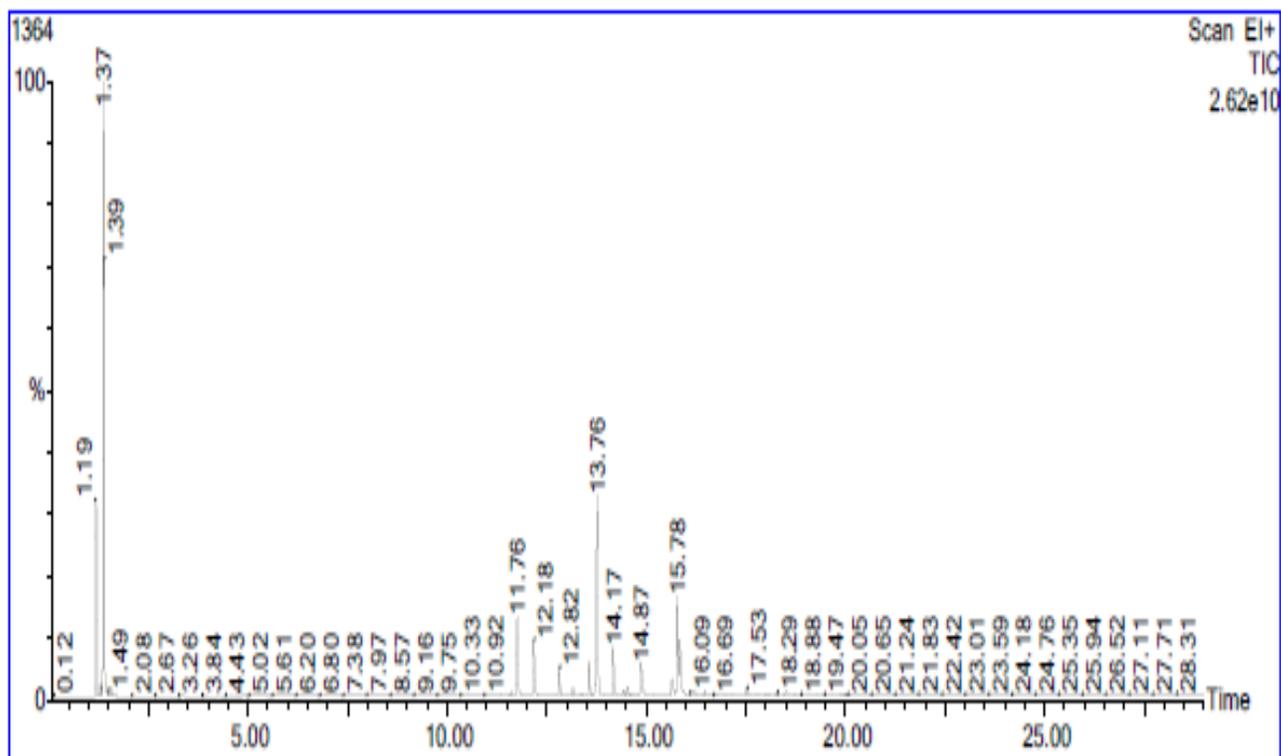
MUESTRA	EXTRACTO ETANÓLICO	GRÁFICA
CENMA		<p><math>y = 20,124x - 3,935</math></p> <p><math>R^2 = 0,9969</math></p> <p><b>%inhibición</b></p>  <p>◆ %inhibición</p> <p>— Lineal (%inhibición)</p>

	DICLOROMETANO	<p><math>y = 101,93x - 2,775</math> <b>%inhibición</b>  <math>R^2 = 0,9987</math></p>  <p>Legend: ◆ %inhibición, — Lineal (%inhibición)</p>
MERCADO CENTRAL	ETANÓLICO	<p><math>y = 115,64x + 1,475</math> <b>% inhibición</b>  <math>R^2 = 0,9944</math></p>  <p>Legend: ◆ % inhibición, — Lineal (% inhibición)</p>
	DICLOROMETANO	<p><math>y = 21,878x + 10,97</math> <b>% inhibición</b>  <math>R^2 = 0,9945</math></p>  <p>Legend: ◆ % inhibición, — Lineal (% inhibición)</p>

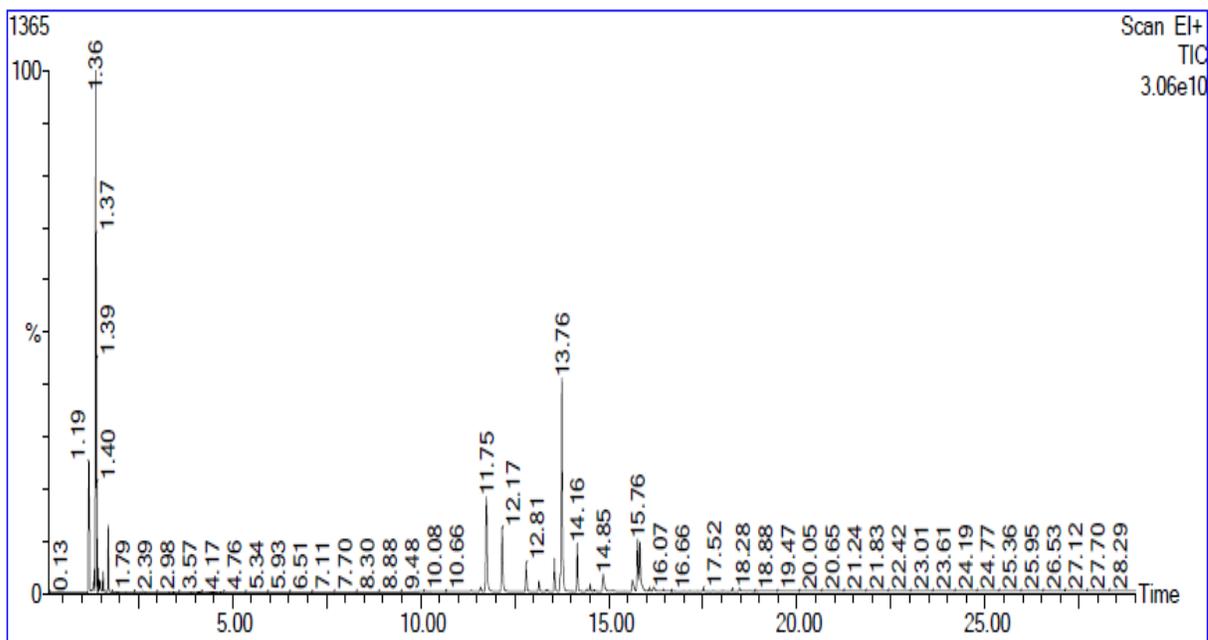
JUANITA'S	ETANÓLICO	<p><math>y = 91,28x + 0,77</math> <b>% INHIBICIÓN</b>  <math>R^2 = 0,998</math></p>  <p>Legend: ◆ % INHIBICIÓN, — Lineal (% INHIBICIÓN)</p>
	DICLOROMETANO	<p><math>y = 22,886x - 7,555</math> <b>% INHIBICIÓN</b>  <math>R^2 = 0,9912</math></p>  <p>Legend: ◆ % INHIBICIÓN, — Lineal (% INHIBICIÓN)</p>
MAHLER	ETANÓLICO	<p><math>y = 56,46x + 9,248</math> <b>% Inhibición</b>  <math>R^2 = 0,9979</math></p>  <p>Legend: ◆ % Inhibición, — Lineal (% Inhibición)</p>



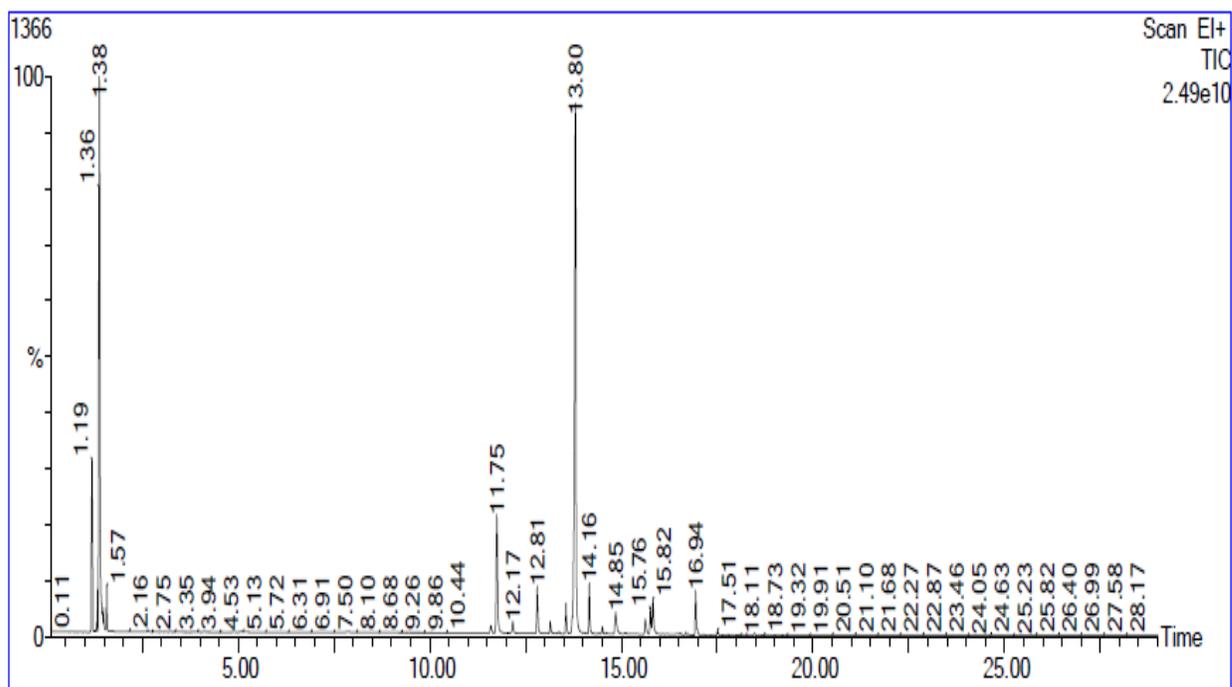
**ANEXO 12.14:** Cromatograma de gases del aceite esencial de la muestra de laurel procedente del Mercado Central



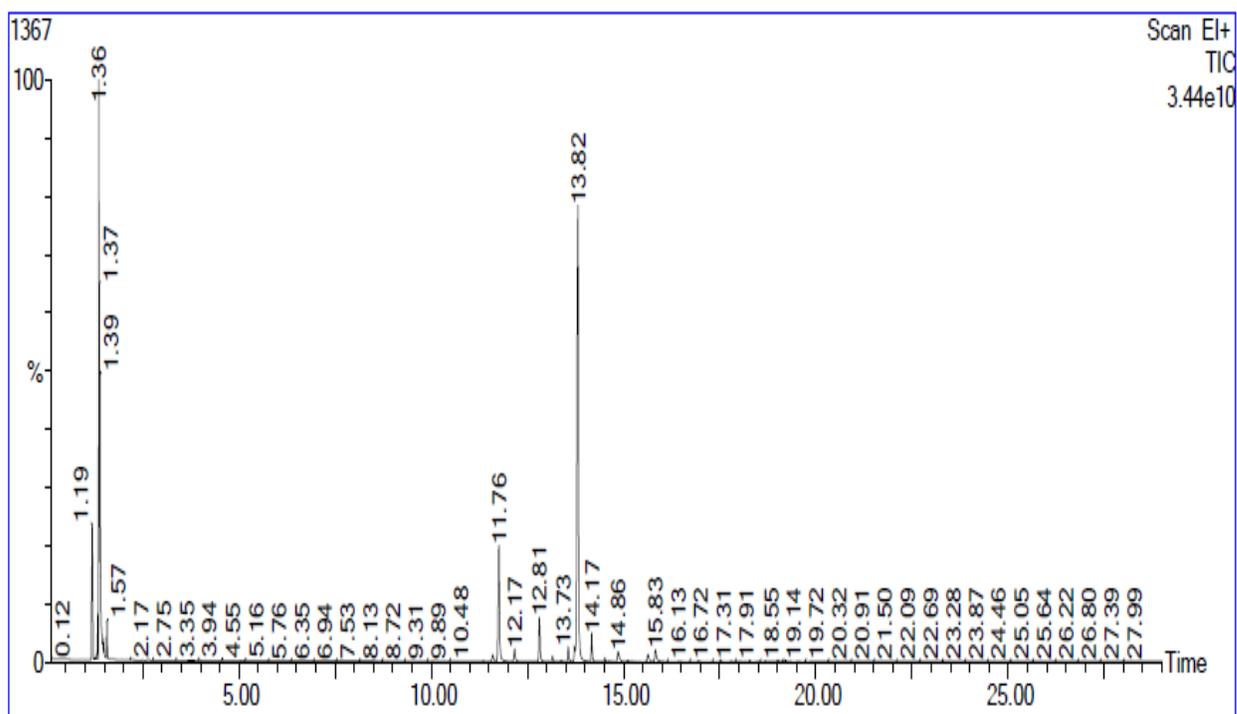
**ANEXO 12.15:** Cromatograma del aceite esencial de la muestra de laurel procedente del Mercado Central de Mayoreo (CENMA)



**ANEXO 12.16:** Cromatograma de gases del aceite esencial de la muestra de laurel de la marca comercial Juanita's



**ANEXO 12.17:** Cromatograma de gases del aceite esencial de la muestra de laurel de la marca comercial Mahler



**ANEXO 12.18:** Análisis estadístico, ANOVA (análisis de varianza) de un factor**ANOVA de un factor**

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Valor p
Cenizas totales	Inter-grupos	.202	3	.067	16.248	.001
	Intra-grupos	.033	8	.004		
	Total	.235	11			
pH	Inter-grupos	.388	3	.129	2.582	.126
	Intra-grupos	.400	8	.050		
	Total	.788	11			
Densidad	Inter-grupos	.000	3	.000	.244	.863
	Intra-grupos	.000	8	.000		
	Total	.000	11			
% rendimiento de aceites esenciales	Inter-grupos	.429	3	.143	1.591	.266
	Intra-grupos	.719	8	.090		
	Total	1.148	11			
Índice de refracción de aceites esenciales	Inter-grupos	.000	3	.000	1.768	.231
	Intra-grupos	.000	8	.000		
	Total	.000	11			
IC 50 Diclorometano	Inter-grupos	2.514	3	.838	35.548	.000
	Intra-grupos	.189	8	.024		
	Total	2.703	11			
IC 50 Etanol 70%	Inter-grupos	.049	3	.016	4.834	.033
	Intra-grupos	.027	8	.003		
	Total	.077	11			
% flavonoides	Inter-grupos	16.527	3	5.509	409.584	.000
	Intra-grupos	.108	8	.013		
	Total	16.634	11			

**ANEXO 12.19:** Análisis estadístico HSD de Tukey en la prueba de cenizas totales

<b>Cenizas totales</b>			
HSD de Tukey			
Lugar	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Juanitas	3	3.782200	
Mercado Central	3		4.012000
CENMA	3		4.080967
Mahler	3		4.114967
Sig.		1.000	.278
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.			

**ANEXO 12.20:** Análisis estadístico HSD de Tukey en la prueba de CI<sub>50</sub> de los extractos secos de diclorometano de las cuatro muestras de laurel

<b>CI 50 Diclorometano</b>			
HSD de Tukey			
Lugar	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Mahler	3	1.690000	
Mercado Central	3	1.926667	
CENMA	3		2.703333
Juanitas	3		2.713333
Sig.		.305	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

**ANEXO 12.21:** Análisis estadístico HSD de Tukey en la prueba de  $CI_{50}$  de los extractos de etanol al 70% de las cuatro muestras de laurel

<b>CI 50 Etanol 70%</b>			
HSD de Tukey			
Lugar	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Mercado Central	3	.436667	
CENMA	3	.536667	.536667
Juanitas	3	.546667	.546667
Mahler	3		.616667
Sig.		.175	.393

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

**ANEXO 12.22:** Análisis estadístico, HSD de Tukey en la prueba de porcentaje de flavonoides

<b>% flavonoides</b>					
HSD de Tukey					
Lugar	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
CENMA	3	5.220000			
Mercado Central	3		5.976667		
Mahler	3			7.096667	
Juanitas	3				8.326667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

---

Ricardo Chuy Kwan

AUTOR

---

Dra. Sully Cruz

ASESORA

---

Licda. Beatriz Medinilla

REVISORA

---

Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

DIRECTORA DE ESCUELA

---

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

DECANO