



Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería Química

**OBTENCIÓN DE TINTURAS DEL RIZOMA DE ZARZAPARRILLA (*SMILAX DOMINGENSIS*
WILLD) Y DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO (*EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL*) POR
PERCOLACIÓN Y MACERACIÓN DINÁMICA A ESCALA LABORATORIO DETERMINANDO
LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN CON EL MAYOR RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Carmen María Navas Segura

Asesorado por la Inga. Telma Maricela Cano Morales

Coasesorado por el Ing. Mario José Mérida Meré

Coasesorado por el Lic. Armando Cáceres Estrada

Guatemala, junio 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**OBTENCIÓN DE TINTURAS DEL RIZOMA DE ZARZAPARRILLA (*SMILAX DOMINGENSIS WILLD*) Y
DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO (*EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL*) POR PERCOLACIÓN Y
MACERACIÓN DINÁMICA A ESCALA LABORATORIO DETERMINANDO LAS CONDICIONES DE
OPERACIÓN CON EL MAYOR RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

CARMEN MARÍA NAVAS SEGURA

ASESORADO POR LA INGA. TELMA MARICELA CANO MORALES

COASESORADO POR EL ING. MARIO JOSÉ MÉRIDA MERÉ

COASESORADO POR EL LIC. ARMANDO CÁCERES ESTRADA

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, JUNIO DE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Juan Carlos Molina Jiménez
VOCAL V	Br. Mario Maldonado Muralles
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Adolfo Narciso Gramajo Antonio
EXAMINADOR	Ing. Manuel Gilberto Galván Estrada
EXAMINADOR	Ing. Jorge Rodolfo García Carrera
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

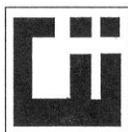
En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

OBTENCIÓN DE TINTURAS DEL RIZOMA DE ZARZAPARRILLA (*SMILAX DOMINGENSIS WILLD*) Y DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO (*EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL*) POR PERCOLACIÓN Y MACERACIÓN DINÁMICA A ESCALA LABORATORIO DETERMINANDO LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN CON EL MAYOR RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 31 de agosto de 2009.



Carmen María Navas Segura



CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



Nº 18503

Guatemala, 01 de Febrero de 2011

Ingeniero
Williams Álvarez
Director
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala

Ingeniero Álvarez:

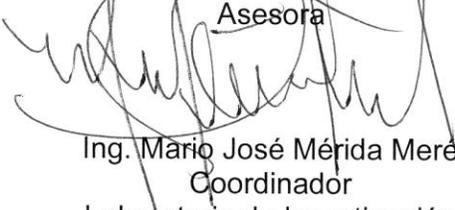
Por medio de la presente HACEMOS CONSTAR que hemos revisado y dado nuestra aprobación al informe final del trabajo de graduación **“OBTENCIÓN DE TINTURAS DEL RIZOMA DE ZARZAPARRILLA (*SMILAX DOMINGENSIS WILLD*) Y DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO (*EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL*) POR PERCOLACIÓN Y MACERACIÓN DINÁMICA A ESCALA LABORATORIO DETERMINANDO LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN CON EL MAYOR RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA”**, de la estudiante de Ingeniería Química Carmen María Navas Segura quien se identifica con el carné número 2005-12150.

Sin otro particular nos suscribimos de usted.

Atentamente,


Inga. Telma Maricela Cano Morales
Directora
Centro de Investigaciones de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Asesora




Ing. Mario José Mérida Meré
Coordinador
Laboratorio de Investigación
de Extractos Vegetales -LIEXVE-
Coasesor





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 16 de marzo de 2011
Ref.EIQ.TG.73.2011

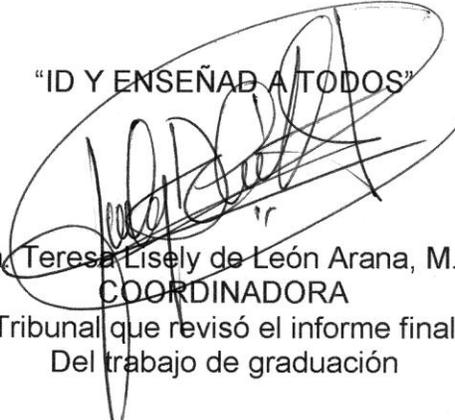
Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el **Acta TG-542010-B-IF** le informo que reunidos los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del informe final del trabajo de graduación, para optar al título de INGENIERA QUÍMICA a la estudiante universitaria, **CARMEN MARÍA NAVAS SEGURA** identificada con carné No. **2005-12150**, titulado: **OBTENCIÓN DE TINTURAS DEL RIZOMA DE ZARZAPARRILA (*Smilax domingensis Willd*) Y DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus Labill*) POR PERCOLACIÓN Y MACERACIÓN DINÁMICA A ESCALA LABORATORIO DETERMINANDO LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN CON EL MAYOR RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**, el cual ha sido asesorado por la **Ingeniera Química Telma Maricela Cano Morales**.

Habiendo encontrado el referido informe final **satisfactorio**, se procede a recomendarle autorice a la estudiante **NAVAS SEGURA**, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAR A TODOS"


Inga Teresa Lisely de León Arana, M.Sc.
COORDINADORA

Tribunal que revisó el informe final
Del trabajo de graduación

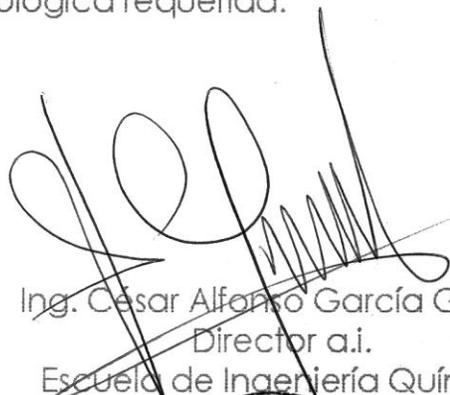


ESCUELA DE
INGENIERIA QUIMICA

C.c.: archivo



El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **CARMEN MARÍA NAVAS SEGURA** titulado: **"OBTENCIÓN DE TINTURAS DEL RIZOMA DE ZARZAPARRILLA (SMILAX DOMINGENSIS WILLD) Y DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO (EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL) POR PERCOLACIÓN Y MACERACIÓN DINÁMICA A ESCALA LABORATORIO DETERMINANDO LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN CON EL MAYOR RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA"**. Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.


Ing. César Alfonso García Guerra
Director a.i.
Escuela de Ingeniería Química

Guatemala, junio de 2011



Cc: Archivo
CAGG/ale





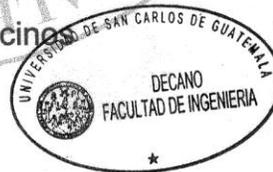
Facultad de Ingeniería
Decanato

Ref. DTG.201.2010

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **OBTENCIÓN DE TINTURAS DEL RIZOMA DE ZARZAPARRILLA (SIMILAX DOMINGENSIS WILLD) Y DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO (EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL) POR PERCOLACIÓN Y MACERACIÓN DINÁMICA A ESCALA LABORATORIO DETERMINANDO LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN CON EL MAYOR RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**, presentado por la estudiante universitaria **Carmen María Navas Segura**, procede a la autorización para la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
DECANO



Guatemala, junio de 2011

/cc

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** El más grande genio creador e inagotable fuente de inspiración.
- Mi madre** Alba Segura, el ser más valioso que Dios me dio. Porque este día siempre lo soñamos juntas, es de las dos ¡Lo logramos!
- Mi padre** Alberto Navas, porque desde antes que naciera me esperaste con paciencia, alegría y orgullo. Este logro fue inspirado en ti.
- Mis hermanas** Ligia y Rocío. Siempre diremos: una para todas y todas para una. Porque cada risa y lágrima se dividirá en tres.
- Mis tíos** Irma Segura y Homero Méndez. Mis segundos papás, por ser la encarnación del amor y la bondad.
- Mi abuelito** José Antonio Segura Barrios. Porque tu legado fue amor, honestidad, lealtad y dedicación. Espero que en el cielo estés orgulloso de mí.

AGRADECIMIENTOS A:

- Dios** Por guiarme y estar conmigo cada día de mi vida, aún cuando no lo sabía. Por darme nuevas fuerzas cada día.
- Mi madre** Por siempre creer en mí, incluso cuando yo no lo hacía. Por tu amor incondicional, porque a través de él siento a Dios. Por cada paso dado durante estos 24 años, de tanto caminar al fin aquí estamos. Gracias porque después de cada caída, tu mano siempre encontré.
- Mi papá** Por todas las lecciones que a tu particular estilo me ensañaste, la más importante: el amor y la familia siempre permanecen.
- Mis hermanas** Por el apoyo incondicional. Porque ni el tiempo ni la distancia han sido impedimentos.
- Familia Méndez Segura** Con todo mi corazón a cada uno le agradezco el amor que siempre me han dado y la ayuda siempre oportuna.
- A mis tíos, tías, primos y primas** Por su amor y apoyo.

**Inga. Telma Cano e
Ing. Mario Mérida**

Les agradezco su invaluable asesoría y el tiempo dedicado. Por sus sabios y sinceros consejos les estaré siempre agradecida. Sin ustedes no hubiera sido posible la realización de esta investigación.

Lic. Armando Cáceres

Por su asesoría. Por su sentido del humor bajo toda circunstancia. Por gustosamente abrir las puertas del departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Licda. Ingrid Benítez

Por su amistad y apoyo.

**Shilonen Camposeco,
Karen Vásquez y
Heydy Godínez**

Por los momentos de estudio en grupo, de verificación de respuesta, de celebración, de vagancia y tertulia.

Olga Vela

Por ser mi mejor amiga, juntas descubrimos que la familia no es solamente sanguínea. Gracias por estar siempre.

**Universidad de San
Carlos de Guatemala**

Orgullosamente diré ¡San Carlista de corazón!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	XIII
GLOSARIO	XV
RESUMEN	XIX
OBJETIVOS	XXI
HIPÓTESIS	XXIII
INTRODUCCIÓN	XXV
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Lixiviación	5
2.1.1. Equipos de lixiviación	8
2.2. Extractos	17
2.2.1. Extracción líquido – vapor	18
2.2.1.1. Destilación	18
2.2.1.2. Extracción por <i>Soxhelt</i>	19
2.2.2. Extracción sólido – líquido	19
2.2.2.1. Maceración	19
2.2.2.2. Percolación o lixiviación	20
2.3. Tinturas	21
2.3.1. Tinturas madres	22
2.3.2. Técnicas de preparación	22

2.3.3.	Disolventes y equipos utilizados para la preparación de tinturas	23
2.3.4.	Preparación de tintura madre	23
2.4.	Tipos de extractos y tinturas	25
2.4.1.	Tinturas o alcoholados	25
2.4.2.	Tinturas madres	26
2.4.3.	Extractos fluidos	26
2.4.4.	Extractos blandos y secos	26
2.4.5.	Nebulizados	26
2.4.6.	Extractos purificados	27
2.4.7.	Abstractos	27
2.4.8.	Alcoholaturas	27
2.4.9.	Extractos glicólicos	27
2.4.10.	Extractos fluidos incoloros	28
2.4.11.	Extractos oleosos	28
2.4.12.	Macerados glicerizados	28
2.4.13.	Esencias	28
2.4.14.	Aguas destiladas aromáticas (hidrolatos)	29
2.5.	Variables del proceso extractivo	29
2.5.1.	División de la droga	29
2.5.2.	Agitación	30
2.5.3.	Temperatura	30
2.5.4.	pH	30
2.5.5.	Naturaleza del disolvente	31
2.5.6.	Tiempo de extracción	32
2.6	Evaluación de agentes antimicrobianos no antibióticos	32
2.6.1.	Consideraciones generales	32
2.6.1.1.	Desinfectante	32
2.6.1.2.	Antiséptico	33

	2.6.1.3.	Sanitizante	33
	2.6.1.4.	Preservante	33
	2.6.1.5.	Agente quimioterapéutico	33
2.6.2.		Evaluación preliminar	34
	2.6.2.1.	Otros factores	35
	2.6.2.2.	Conclusiones	36
2.6.3.		Actividad inhibitoria o letal	36
2.6.4.		Evaluación de actividad bacteriostática	36
	2.6.4.1.	Prueba de serie de diluciones	39
	2.6.4.2.	Prueba de difusión en agar	41
	2.6.4.2.1.	Técnica del plato con estrías	41
	2.6.4.2.2.	Prueba de la taza de agar	42
	2.6.4.2.3.	Prueba del plato con gradiente	42
	2.6.4.2.4.	Pruebas de difusión para demostrar el efecto de sustancias antagónicas y potenciadoras	43
2.6.5.		Evaluación de la actividad bactericida	44
	2.6.5.1.	Técnica de conteo viable	44
	2.6.5.2.	Prueba del coeficiente fenólico	46

	2.6.5.2.1.	La prueba de <i>Rideal-Walker</i>	47
	2.6.5.2.2.	La prueba de <i>Chick-Martin</i>	47
	2.6.5.2.3.	La prueba AOAC	48
	2.6.5.3.	Otros métodos estándar	49
	2.6.5.4.	Pruebas para desinfectantes agrícolas	49
	2.6.5.5.	Pruebas adicionales	50
	2.6.5.6.	Miscelánea de métodos	51
	2.6.5.6.1	Reproducción de capa	51
	2.6.5.6.2	Pruebas de desinfección de superficie	51
	2.6.6.	Pruebas de estabilidad y estudio de formulaciones	51
	2.6.7.	Pruebas de uso	52
2.7.		Características fisicoquímicas	52
	2.7.1.	Características organolépticas	52
	2.7.2.	Características fitoquímicas	52
	2.7.3.	Constituyentes	53
	2.7.4.	Identificación química	54
	2.7.4.1.	Principios activos	55
	2.7.4.2.	Marcadores activos	55
	2.7.5.	Determinación cualitativa de metabolitos secundarios	55
	2.7.5.1.	Saponinas	56

	2.7.5.2.	Taninos	57
	2.7.5.3.	Flavonoides	57
		2.7.5.3.1. Actividad biológica de los flavonoides	58
	2.7.6.	Cromatografía de adsorción	59
		2.7.6.1. Cromatografía en capa fina	61
2.8		Descripción de la Zorzaparrilla	62
	2.8.1.	Descripción botánica	63
	2.8.2.	Hábitat	63
	2.8.3.	Historia	64
	2.8.4.	Agricultura	64
	2.8.5.	Usos medicinales atribuidos	65
	2.8.6.	Otros usos populares	65
	2.8.7.	Farmacología experimental	66
	2.8.8.	Farmacología clínica	66
	2.8.9.	Composición química	67
	2.8.10.	Farmacognosia	69
	2.8.11.	Toxicología	69
	2.8.12.	Indicaciones terapéuticas	69
2.9		Descripción de Eucalipto	70
	2.9.1.	Descripción botánica	70
	2.9.2.	Historia	70
	2.9.3.	Agricultura	71
	2.9.4.	Usos medicinales atribuidos	71
	2.9.5.	Otros usos populares	72
	2.9.6.	Farmacología experimental	72
	2.9.7.	Farmacología clínica	72
	2.9.8.	Composición química	73

2.9.9.	Farmacognosia	73
2.9.10.	Toxicología	75
2.9.11.	Indicaciones terapéuticas	75
3.	DISEÑO METODOLÓGICO	77
3.1	Definición operacional de las variables	77
3.2	Delimitación del campo de estudio	81
3.3	Recursos humanos disponibles	82
3.4	Recursos materiales disponibles	82
3.5	Técnicas cualitativas y cuantitativas	85
3.6	Recolección y ordenamiento de la información	100
3.7	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	117
3.8	Análisis estadístico	129
4.	RESULTADOS	141
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	149
	CONCLUSIONES	155
	RECOMENDACIONES	157
	BIBLIOGRAFÍA	159
	APÉNDICE	165
	ANEXOS	183

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Extractor tipo <i>Bollman</i>	10
2.	Extractor tipo <i>Kennedy</i>	12
3.	Extractor <i>Bonotto</i>	14
4.	Técnica del gradiente	42
5.	Interacciones de compuestos	43
6.	Zarzaparrilla	62
7.	Composición química zarzaparrilla	68
8.	Ilustraciones eucalipto	69
9.	Patrón de estriado	95
10.	Cajas cuadriplate con inoculación	97
11.	Prueba de <i>Tukey</i> rendimiento contra especie*método	137
12.	Prueba de <i>Tukey</i> rendimiento contra especie*método*disolvente	138
13.	Prueba de <i>Tukey</i> rendimiento contra especie*método*tintura	139

TABLAS

I.	Cantidad de materia prima	77
II.	Tamaño promedio de partícula	78
III.	Cantidad de disolvente total	79
IV.	Volumen total de disolvente por especie	79
V.	Preparación de solución etanol-agua	80

VI.	Velocidad de agitación	80
VII.	Tiempo de maceración	81
VIII.	Tamaño de muestras de laboratorio	81
IX.	Tamices para zarzaparrilla	86
X.	Tamices para eucalipto	86
XI.	Ensayo tiempo de maceración dinámica	87
XII.	Distribución de microorganismos en cajas de bioensayo	97
XIII.	Distribución de agar <i>Muller Hinton</i>	98
XIV.	Distribución en caja cuadriplate	99
XV.	Datos originales materia extraña	100
XVI.	Datos originales determinación de porcentaje de humedad	100
XVII.	Datos originales índice de refracción y tiempo de maceración dinámica de tinturas de zarzaparrilla	101
XVIII.	Datos originales índice de refracción y tiempo de maceración dinámica de tinturas de eucalipto	102
XIX.	Datos originales sólidos extraíbles: zarzaparrilla por maceración dinámica	103
XX.	Datos originales sólidos extraíbles: zarzaparrilla por percolación	104
XXI.	Datos originales sólidos extraíbles: eucalipto por maceración dinámica	105
XXII.	Datos originales sólidos extraíbles: eucalipto por percolación	106
XXIII.	Datos originales densidad: zarzaparrilla por maceración dinámica	107
XXIV.	Datos originales densidad: zarzaparrilla por percolación	108

XXV.	Datos originales densidad: eucalipto por maceración dinámica	109
XXVI.	Datos originales densidad: eucalipto por percolación	110
XXVII.	Datos originales pH: zarzaparrilla por maceración dinámica	111
XXVIII.	Datos originales pH: zarzaparrilla por percolación	111
XXIX.	Datos originales pH: eucalipto por maceración dinámica	111
XXX.	Datos originales pH: eucalipto por percolación	112
XXXI.	Datos originales de color	112
XXXII.	Datos originales ensayo macro saponinas	113
XXXIII.	Datos originales ensayo semimicro saponinas	113
XXXIV.	Datos originales ensayo macro flavonoides	114
XXXV.	Datos originales ensayo semimicro flavonoides	114
XXXVI.	Datos originales ensayo macro taninos	115
XXXVII.	Datos originales bioensayo	115
XXXVIII.	Datos originales CIM: muestra E1	116
XXXIX.	Datos originales CIM: muestra E2	116
XL.	Datos originales CIM: muestra Z1	116
XLI.	Datos originales CIM: muestra Z2	117
XLII.	Datos calculados materia extraña	117
XLIII.	Datos calculados determinación de porcentaje de humedad	117
XLIV.	Datos calculados sólidos extraíbles: zarzaparrilla por maceración dinámica	118
XLV.	Datos calculados sólidos extraíbles: zarzaparrilla por percolación	119
XLVI.	Datos calculados sólidos extraíbles: eucalipto por maceración dinámica	120

XLVII.	Datos calculados sólidos extraíbles: eucalipto por percolación	121
XLVIII.	Datos calculados densidad: zarzaparrilla por maceración dinámica	122
XLIX.	Datos calculados densidad: zarzaparrilla por percolación	123
L.	Datos calculados densidad: eucalipto por maceración dinámica	124
LI.	Datos calculados densidad: eucalipto por percolación	125
LII.	Datos calculados pH: zarzaparrilla por maceración dinámica	126
LIII.	Datos calculados pH: zarzaparrilla por percolación	126
LIV.	Datos calculados pH: eucalipto por maceración dinámica	126
LV.	Datos calculados pH: eucalipto por percolación	126
LVI.	Datos calculados: ensayo macro saponinas	127
LVII.	Datos calculados: ensayo macro flavonoides	127
LVIII.	Datos calculados: costo por tintura	128
LIX.	Análisis de varianza del rendimiento de extracción	129
LX.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie	129
LXI.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por tintura	130
LXII.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por disolvente	130
LXIII.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie*método	130
LXIV.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie*tintura	131
LXV.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie*disolvente	131

LXVI.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por método*tintura	131
LXVII.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por tintura*disolvente	132
LXVIII.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie*método*tintura	133
LXIX.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie*método*disolvente	134
LXX.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie*tintura*disolvente	135
LXXI.	Prueba de <i>Tukey</i> comparación de rendimiento por especie*tintura*disolvente*método	136
LXXII.	Resultados: sólidos extraíbles zarzaparrilla	141
LXXIII.	Resultados: sólidos extraíbles eucalipto por maceración dinámica	141
LXXIV.	Resultados: densidad zarzaparrilla	142
LXXV.	Resultados: densidad eucalipto	142
LXXVI.	Resultados: pH zarzaparrilla	142
LXXVII.	Resultados: pH eucalipto	143
LXXVIII.	Resultados: color	143
LXXIX.	Resultados: ensayo macro saponinas	144
LXXX.	Resultados: ensayo micro saponinas	144
LXXXI.	Resultados: ensayo macro flavonoides	144
LXXXII.	Resultados: ensayo micro flavonoides	145
LXXXIII.	Resultados: ensayo macro taninos	145
LXXXIV.	Resultados: bioensayo	145
LXXXV.	Resultados: CIM muestra E1	146
LXXXVI.	Resultados: CIM muestra E2	146
LXXXVII.	Resultados: CIM muestra Z1	146

LXXXVIII.	Resultados: CIM muestra Z2	147
LXXXIX.	Resultados: costo unitario por tintura	147

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
Hp	Caballos de fuerza
MS	Cuadrado medio
DL_{50}	Dosis letal al 50%
°	Grado
DF	Grados de libertad
H_i	Hipótesis alternativa
H_0	Hipótesis nula
h	Hora
Kg/h	Kilogramo por hora
m	Metro
µg	Microgramos

mL	Mililitro
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno
P	Probabilidad
v/v	Proporción volumen : volumen
F	Prueba de F
RPM	Revolución por minuto
SS	Suma de cuadrados
TM	Tintura madre

GLOSARIO

Clarificación	Proceso de separación de pequeñas cantidades de sólido suspendidas en un líquido por filtración o por centrifugación.
Decantación	Separación de un líquido y un sólido o de dos líquidos no miscibles aprovechando la gravedad.
Deletéreo	Mortífero, venenoso.
Elución	Desplazamiento, por medio de una eluyente, de una sustancia fijada en una interfase. Es el proceso inverso a la adsorción.
Eluyente	Sustancia que, al ser fijada en una interfase, desplaza a otra previamente adsorbida.
Enfleurage	Es un proceso que utiliza las grasas inodoras que son sólidas en la temperatura ambiente para capturar los compuestos fragantes exudados por las plantas. El proceso puede ser enfleurage frío o enfleurage caliente.

Farmacopea	Libro oficial de cada país que regula la preparación de medicamentos.
Fitoquímico	Sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida y tienen efectos positivos en la salud. Se encuentran naturalmente en las plantas.
Impulsores	También conocido como hélice, constituido por un número variable de aspas o palas que, al girar alrededor de un eje, producen una fuerza propulsora.
<i>In situ</i>	Locución latina que significa en el sitio mismo donde tiene lugar algo.
Liofilización	Procedimiento de eliminación del agua de ciertos materiales orgánicos, mediante congelación y deshidratación por sublimación al vacío.
Micelas	Conglomerado de moléculas que constituye una de las fases de los coloides.
Mucílagos	Sustancia de naturaleza viscosa y hialina, que producen diversas plantas, algas y las bacterias.

Organoléptico

Propiedades de los cuerpos que se pueden percibir por los sentidos.

Resina

Nombre común a los aceites esenciales de origen isoprenoide cuando se oxidan en presencia del aire. Se puede obtener por incisión en el tallo de diversas plantas que poseen vasos resiníferos especiales, pero también pueden ser de origen animal o mineral.

Sinergia

Cooperación para un fin concreto de los efectos de dos o más fármacos administrados conjuntamente, en particular de los antibióticos.

RESUMEN

Esta investigación describe el proceso de obtención de principios activos de materia vegetal en tinturas por los métodos de percolación y maceración dinámica del rizoma de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) y de las hojas de Eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*).

Se caracterizaron fisicoquímicamente las tinturas, con análisis de densidad, pH, color, presencia de saponinas, flavonoides y taninos. Seguidamente se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas de la actividad antibacteriana para cuatro microorganismos. Se determinó que la combinación de variables de operación que corresponden al máximo de rendimiento extractivo fue para ambas especies por maceración dinámica, en proporción de 1:15 y con disolvente al 50% v/v.

Para el análisis antimicrobiano los microorganismos utilizados fueron *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las tinturas de Eucalipto a una concentración de 1 mg/mL fueron activas contra los dos primeros microorganismos, mientras que las tinturas Zarzaparrilla sin diluir fueron activas contra todos los microorganismos.

OBJETIVOS

General

Determinar el rendimiento de extracción de tinturas del rizoma de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) y de las hojas de Eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*) por percolación y maceración dinámica a escala laboratorio en función de las condiciones de operación y actividad antibacteriana de la tintura obtenida con mayor rendimiento extractivo.

Específicos

1. Realizar las extracciones de tintura de ambas plantas, variando en tres niveles la relación de tintura y en tres niveles la mezcla de disolvente en percolación y maceración dinámica.
2. Comparar los rendimientos de extracción de cada planta para cada tratamiento del experimento, en función de sólidos extraíbles totales.
3. Caracterizar fisicoquímicamente las tinturas con mayor rendimiento para cada planta.
4. Confirmar la actividad antimicrobiana de las tinturas con mayor capacidad antibacteriana en función de la evaluación de dos bacterias gram positivas y dos bacterias gram negativas.

5. Realizar el análisis de costos para la extracción de tinturas, para cada método de lixiviación.

HIPÓTESIS

Existe diferencia en el porcentaje de rendimiento de la tintura de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) y de Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) para cada método de extracción, bajo las mismas condiciones de operación.

Hipótesis estadística

1. Hipótesis nula

H_0 = No existe diferencia significativa en el rendimiento de extracción de la tintura de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) y de Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) para cada método de extracción, bajo las mismas condiciones de operación.

$$\mu_{Ei} = \mu_{Ej} \quad \mu_{Zi} = \mu_{Zj}$$

2. Hipótesis alternativa

H_1 =Si existe diferencia significativa en el rendimiento de extracción de la tintura de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) y de Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) para cada método de extracción, bajo las mismas condiciones de operación.

$$\mu_{Ei} \neq \mu_{Ej} \quad \mu_{Zi} \neq \mu_{Zj}$$

INTRODUCCIÓN

Cotidianamente se utilizan plantas con fines medicinales para algunos problemas de salud. Según experiencias estos conocimientos se trasladan de generación en generación para el aprovechamiento de sus propiedades: antiespasmódicas, diuréticas, antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas, hipoglucemiantes, sedantes del sistema nervioso central, entre otras.

Estas preparaciones no son realizadas bajo estándares y casi siempre se desconocen todos los beneficios que de una planta pueden ser obtenidos. Derivado de esto, el alcance de la investigación es la tecnificación del proceso extractivo de principios activos de plantas medicinales.

La importancia de tecnificar el proceso de obtención radica en el aprovechamiento y maximización de la materia prima. Esto se alcanzó seleccionando de diez y ocho tratamientos experimentales, el que mayor cantidad de sólidos extraíbles presentó, y cuantificando la concentración mínima de tintura que inhibe el crecimiento de cuatro microorganismos.

La Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) es un arbusto liliáceo de raíces fibrosas y cilíndricas. Se han realizado estudios de farmacología para los que se encontró actividad antibacteriana para *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y otros. La actividad antimicrobiana es atribuida a las saponinas, localizadas en el rizoma del arbusto.

El Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) es un árbol mirtáceo, en estudios farmacológicos se ha encontrado que tinturas de hojas presentan actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. La actividad es atribuida al aceite esencial localizado en las hojas del árbol.

Los microorganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* se utilizaron para comprobar la actividad antibacteriana de las tinturas. Estos microorganismos se encuentran comúnmente sobre superficies inanimadas con las que el ser humano tiene constante contacto, por lo que las tinturas pueden ser aplicadas como principio activo de desinfectantes de superficies inanimadas, siendo una alternativa natural competitiva frente a desinfectantes tradicionales.

1. ANTECEDENTES

En la cultura guatemalteca durante décadas se han realizado artesanalmente procesos de lixiviación en plantas consideradas como medicinales, sus infusiones ayudan a mejorar o prevenir deterioros de la salud. Empíricamente estos remedios han demostrado ser efectivos. En la actualidad se han realizado estudios acerca de la extracción y caracterización física, química y antimicrobiana de una amplia variedad de plantas. Esto con el objetivo de estandarizar sus propiedades y crear documentos de referencia. También ha surgido la investigación en el campo de procesos para realizar extracciones de metabolitos primarios de las plantas, con el fin de optimizar e industrializar los procesos de extracción.

En 2005 Pablo Solís creó un manual con la finalidad de recopilar información que permitiera realizar las pruebas de control de calidad en una forma estandarizada y validada a la materia vegetal y sus diferentes preparaciones. Aunque estos procedimientos se encuentran publicados en distintas farmacopeas, en oportunidades estos no están disponibles para los laboratorios pequeños de la región centroamericana, que son los que generalmente se dedican a trabajar con esta clase de productos.

En 1996 se publicó el IX Seminario nacional de plantas medicinales y VI exposición nacional de plantas medicinales y productos derivados, llevado a cabo en Quiriguá, Los Amates, Izabal. Estas memorias recopilaron las exposiciones y mesas redondas referentes a los productos medicinales de Centroamérica. Se refiere la actividad biocida de *Eucalyptus globulus* Labill (*Myrtaceae*), demostrada mediante estudios antimicrobianos de la tintura de hojas, activa contra *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. pyogenes*. Y de la *Smilax spinosa* Mill refiere a la tintura como activa contra bacterias gramnegativo y grampositivo.

En 1993 el Ingeniero Químico Juan José Rodríguez Coronado de la Facultad de Ingeniería USAC, trabajó en la determinación de una combinación de variables apropiada en la extracción del aceite de la hoja de eucalipto a partir de la evaluación de métodos de extracción convencional. Este trabajo se hizo para determinar tres métodos de extracción y variedad de hoja apropiada en la obtención de aceite de Eucalipto. Los métodos utilizados fueron de extrusión, lixiviación, arrastre con vapor y los tipos de Eucalipto fueron *Cinerea*, *Citriodora* y *Elóboles*. Se determinó a través de pruebas a nivel laboratorio que la eficiencia mayor corresponde a la especie *Cinerea* y con una eficiencia de 91.6% para el método de arrastre por vapor.

En 2008 el Ingeniero Químico Mauricio Leonardo de León Juárez de la Facultad de Ingeniería USAC, realizó la comparación del rendimiento del aceite esencial de dos especies de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh), aplicando el método de hidrodestilación a nivel laboratorio.

Trabajo en el que se evaluó la diferencia significativa en el rendimiento de dos especies de eucalipto, *Eucalyptus Citriodora* de una edad aproximada de cinco años y *Eucalyptus Camaldulensis* de una edad aproximada de dos años, a nivel laboratorio, aplicando el método de hidrodestilación. Se obtuvieron rendimientos promedios de 1.5% con un tiempo de extracción de tres horas.

En 2007 la Ingeniera Química Carla Sofía Escobar Robles de la Facultad de Ingeniería USAC, realizó la estandarización de dos extractos del rizoma de la planta zarzaparrilla (*Smilax domingensis*), a nivel de laboratorio utilizando la extracción por percolación de lecho estático con 24 horas. La investigación se realizó extracto fluido y un extracto seco del rizoma de *S. domingensis* (Zarzaparrilla) a nivel laboratorio. Al realizar la caracterización fisicoquímica se determinó por cromatografía en capa fina, la presencia de saponina y flavonoides del tipo quercetina, ácido clorogénico e hiperósido; no se evidenció la presencia de rutina.

En 2005 la Licenciada Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacias USAC, realizó la caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente. El trabajo comprendió la selección de 5 plantas medicinales nativas, que están validadas científicamente pero no se tiene ninguna información sobre las características fisicoquímicas de la materia prima y productos intermedios (extractos) con lo cual son elaborados algunos medicamentos fitofarmacéuticos (tinturas). Las plantas seleccionadas son *Bixa orellana* (Achiote), *Petiveria alliacea* (Apacín), *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla), *Tagetes lucida* (Pericón) y *Valeriana prionophylla* (Valeriana).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Lixiviación

Lixiviación es la eliminación de una fracción soluble, en forma de solución, a partir de una fase sólida permeable e insoluble a la cual está asociada. La separación implica, normalmente, la disolución selectiva, con difusión o sin ella, pero en el caso extremo del lavado simple, consiste sólo en el desplazamiento (con alguna mezcla) de un líquido intersticial por otro, con el que es miscible. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o adsorbido, o bien mantenido mecánicamente, en la estructura porosa del material insoluble. El sólido insoluble puede ser másico y poroso; con mayor frecuencia es de partículas y estas últimas pueden ser de poros abiertos, de celdas, con paredes celulares selectivamente permeables o con superficies activadas. (Perry, 2001. 18-68).

Es habitual el excluir del estudio de la lixiviación la elución de solutos adsorbidos superficialmente. Este proceso será tratado, en lugar de ello, como un caso especial de la operación inversa, la adsorción. Asimismo, se excluye el lavado de tortas de filtros, ya sea *in situ* o mediante la formación de una nueva suspensión y la re-filtración.

Debido a su gran variedad de aplicaciones y su importancia para diferentes industrias antiguas, la lixiviación tiene otros nombres. Entre los que se encuentran en la ingeniería química están la extracción, la extracción de sólido-líquido, la percolación, la infusión, el lavado y la decantación por sedimentación.

La corriente de sólidos lixiviados y el líquido que la acompaña se denominan lodos; en hidrometalurgia también se conoce como pulpa. El contenido en sólidos de las corrientes es denominado, en algunas ocasiones, como *marc* (en particular en los procesos de separación de aceites). La corriente de líquido contenido en la solución lixiviada es el clarificado. Como abandona el proceso de lixiviación, tiene otros nombres opcionales: extracto, solución, lixiviado o miscelado.

Mecanismo. El mecanismo de la lixiviación puede incluir una solución física simple o la disolución facilitada por una reacción química. La velocidad de transporte de disolvente en la masa que se va a lixiviar o de la fracción soluble en el disolvente o de la solución de extracto del material insoluble, o alguna combinación de esas velocidades, pueden ser importantes. Es posible que exista una resistencia externa. Como el que una reacción química puede afectar a la velocidad de la lixiviación.

Ya que las corrientes de lodo y clarificado no son fases inmiscibles, sino corrientes basadas en el mismo disolvente, el concepto de equilibrio en lixiviación no es el mismo que el que se aplica en otras separaciones de transferencia de materia. Si el soluto no se adsorbe en el sólido inerte sólo se logra el equilibrio verdadero cuando todo el soluto se disuelve y se distribuye de forma uniforme en todo el disolvente, tanto en la corriente de lodos como la de clarificación (o cuando el disolvente se satura uniformemente con el soluto, situación que nunca se presenta en un equipo de extracción diseñado de forma adecuada). La interpretación práctica del equilibrio de lixiviación es el estado en que las corrientes de lodos y clarificado tienen la misma composición. En un diagrama x - y , la línea de equilibrio es una recta que pasa a través del origen con una pendiente de valor unidad.

Es costumbre calcular el número de etapas ideales (de equilibrio) requeridas para una lixiviación determinada y ajustar dicho número por medio de la aplicación de un factor de eficacia de etapa, aunque si se conocen, pueden aplicarse eficacias locales etapa a etapa.

Sin embargo, y por lo general, no resulta sencillo establecer una eficiencia de etapa o un valor de eficacia global ni un índice de la velocidad de lixiviación (es decir, un coeficiente general sin probar los modelos a pequeña escala de los aparatos). De hecho, los resultados de dichas pruebas tienen que escalarse en forma empírica, sin una evaluación explícita de los índices de velocidad o de cuasi-equilibrio.

Métodos de operación. Los equipos de lixiviación se distinguen por el ciclo de operación (intermitente, continuo o intermitente de cargas múltiples), por la dirección de las diferentes corrientes (concurrente, a contracorriente o flujo híbrido), por el número de etapas (una única etapa, etapas múltiples o etapa diferencial) y por el método de contacto (percolación por pulverización, percolación por inmersión o dispersión de sólidos). En general, los anteriores descriptores catalogan cuatro categorías y deben consignarse para el establecimiento completo de un sistema de lixiviación (por ejemplo, el extractor tipo Bollman es un percolador continuo, con etapas múltiples con pulverización y flujo híbrido).

2.1.1. Equipos de lixiviación

Es a través de la clasificación mediante el tipo de contacto la que proporciona las dos categorías principales en las que se divide el equipo de lixiviación: (1) los que realizan la lixiviación por percolación y (2) aquellos en que las partículas sólidas se dispersan en un líquido y, posteriormente, se separan de él. En cada una de esas clases existen unidades continuas y por cargas.

Los materiales que se desintegran durante la lixiviación se tratan en los equipos de la segunda clase. Algunos equipos que operan en continuo no se integran en ninguna de esas clases principales anteriores.

Percolación. Además de aplicarse a los minerales y las rocas *in situ* mediante la simple técnica de la lixiviación en monto es (normalmente a gran escala, la percolación se realiza en tanques por cargas y en equipos de extracción en continuo (normalmente a escala más pequeña).

Percoladores por cargas. El recipiente por cargas no es distinto de un gran equipo de filtración con succión; se trata de un gran tanque circular o rectangular de fondo falso. Los sólidos que se van a lixiviar se dejan caer al tanque hasta una profundidad uniforme. Se rocían con un disolvente hasta que su contenido de soluto se reduce hasta un mínimo, normalmente económico, y a continuación se excavan. El flujo en contracorriente del disolvente a través de una serie de tanques es habitual, entrando el disolvente al tanque que contiene el material más agotado. En una típica operación de preparación de minerales, los tanques son de 53 por 20 por 5,5 m (175 por 67 por 18 ft) y se extraen 8.200 Mg de mineral en un ciclo de 13 días.

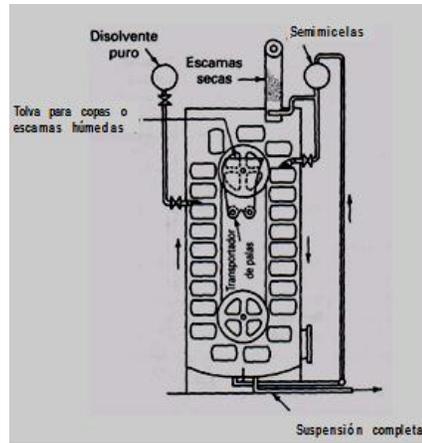
Algunos tanques funcionan a presión, para contener disolventes volátiles o incrementar el índice de percolación. Una serie de tanques a presión que funcionan con flujo de disolvente en contracorriente se denomina batería de difusión. (Perry, 2001. 18-69).

Percoladores continuos. Los sólidos gruesos se lixivian, también, mediante la percolación en equipos de lecho móvil, excluyendo clasificadores basculantes de plataforma sencilla múltiple, equipos de contacto mediante cestos y transportadores horizontales de bandas.

El extractor tipo *Bollman*, vea figura 1 es una unidad elevadora de cestas diseñada para manejar de 10.000 a 20.000 kg/h de sólidos desmenuzables (por ejemplo, semillas de soja). Las cubetas con el fondo perforado se colocan en una banda con movimiento sinfín. Los sólidos secos, alimentados a los cestos descendentes, se rocían con disolvente parcialmente.

Al elevarse los cestos, en la otra sección de la unidad, los sólidos se rocían con disolvente puro en contra-corriente. Los sólidos agotados se descargan de los cestos, en la parte superior de la unidad, a un transportador de palas; y el disolvente enriquecido se impulsa desde el fondo de la unidad. Puesto que los sólidos no están agitados y que las micelias finales se desplazan en contracorriente, el extractor de Bollman permite el uso de granos delgados, produciendo un contacto de buena calidad. Sin embargo, se trata de un dispositivo parcialmente en contracorriente, y en algunos casos se producen acanalamientos y, consecuentemente, etapas con baja eficacia. Quizás por esta razón, está siendo desplazado en la industria de extracción de aceite por percoladores de cesta horizontal, cazoleta o banda.

Figura 1. **Extractor tipo *Bollman***



Fuente: Robert Perry. Manual del ingeniero químico. p. 18-69.

En el diseño de cesto horizontal, los compartimentos entre las paredes, en forma de sectores anulares, con pisos permeables al líquido, giran alrededor de un eje central. Los compartimentos pasan de forma sucesiva por el punto de alimentación, por un conjunto de rociadores de disolvente, una sección de drenaje y una de descarga (donde el fondo tiene una abertura para descargar los sólidos extraídos). La zona de descarga es contigua, perimetral, al sector o zona de alimentación. La extracción en contracorriente se logra con la alimentación de disolvente fresco, únicamente en el último compartimento anterior a la descarga, y lavando los sólidos en cada compartimento con el efluente recirculado que procede del compartimento siguiente.

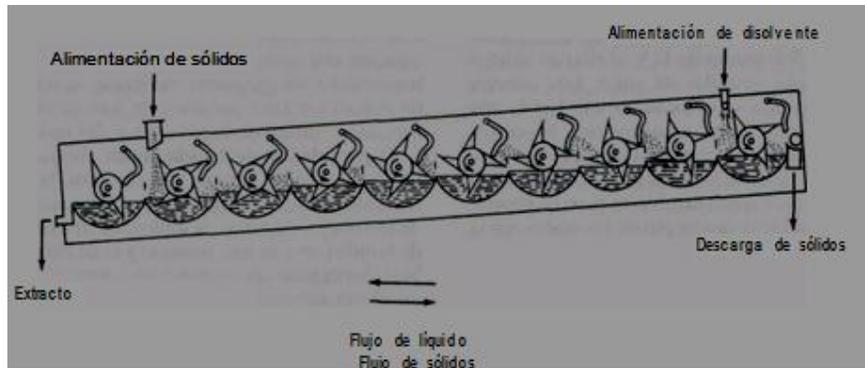
El Rotocel es sencillo, económico y requiere poco espacio. Este tipo de equipo es fabricado por diferentes empresas. Otros equipos, que operan a vacío y contra la gravedad, de plataforma horizontal y de recipiente inclinado, se utilizan como unidades de extracción para procesos de lixiviación que presentan una separación difícil de la solución y del residuo.

El percolador de banda sinfín es en principio similar, pero la alimentación, la pulverización de disolvente, el drenaje y los puntos de descarga son lineales en vez de circulares. Algunos ejemplos son el extractor del tipo Smet de banda (sin compartimentos) y el de tipo *Lurgi* de banda con bastidores (con compartimentos). Este último es el equivalente lineal del Rotocel. Los filtros a vacío de banda horizontal se asemejan a los extractores de banda sinfín y se utilizan, en ocasiones, para lixiviación.

El extractor tipo *Kennedy*, ver figura 2, que también requiere poco espacio, opera básicamente como un percolador, en el que el lecho de sólidos se desplaza a través del disolvente en vez de en la dirección convencional opuesta. Está compuesto por una serie lineal de cámaras horizontales a través de las cuales se desplazan, en sucesión, los sólidos a lixiviar por medio de un impulsor, de velocidad lenta, integrado en esta sección.

Existe la posibilidad de efectuar drenajes entre las etapas cuando el impulsor provoca la elevación de los sólidos por encima del nivel de líquido antes de vaciarlos en la siguiente cámara. El disolvente fluye por gravedad de cámara a cámara, en contracorriente con el movimiento de los sólidos. Los sólidos, en estos equipos, están sometidos a una acción mecánica más intensa que en otros tipos de percoladores continuos, por lo que el extractor tipo *Kennedy* se emplea poco para materiales frágiles tales como los aceites de semillas sin cascara.

Figura 2. **Extractor Kennedy**



Fuente: Robert Perry. Manual del ingeniero químico. p. 18-70.

Lixiviación de una dispersión de sólido, los equipos para lixiviar sólidos finos mediante dispersión y separación incluyen tanques discontinuos agitados, por medio de impulsores giratorios o aire, y una gran variedad de dispositivos continuos.

Tanques agitados por cargas, los tanques agitados mediante impulsores coaxiales (turbinas, paletas o hélices) que se utilizan habitualmente para la disolución por cargas de sólidos en líquidos se pueden utilizar para la lixiviación de sólidos finos.

Cuando la velocidad controlante es la de transferencia de masa en el interior o hacia el interior de la partícula, más que la velocidad de transferencia hacia o desde la superficie de la partícula, la principal función del agitador es proporcionar disolvente agotado a las partículas de material durante el período que se encuentran en el tanque, durante el tiempo suficiente para que se complete el proceso de difusión.

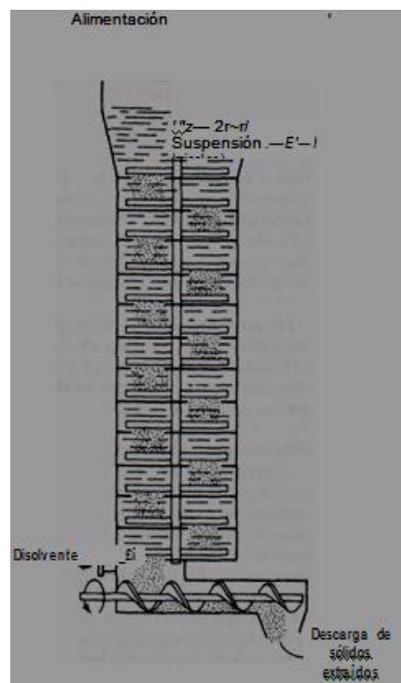
El agitador realiza esto en forma muy eficiente si se limita a hacer circular suavemente los sólidos a través del fondo del tanque o los suspende simplemente por encima del fondo. Después de producida la lixiviación se pueden separar los sólidos mediante el asentamiento y la decantación, o con filtros externos, centrífugas o espesadores. La dificultad de la separación de los sólidos y extractos, y el hecho de que un tanque agitado sólo proporciona una etapa simple de equilibrio, son sus principales limitaciones.

Tanques Pachuca, los minerales de oro, uranio y otros metales se lixivian con frecuencia por cargas en grandes recipientes agitados, mediante aire, que se conocen como tanques Pachuca. Un tanque típico es un cilindro vertical con la sección de fondo cónica, generalmente con un ángulo de 60° , de 7 m de diámetro y 14 m de altura total.

En algunos diseños, el aire se introduce mediante una conducción situada cerca del fondo y se eleva libremente a través del tanque; sin embargo, es más usual que el aire entre a través de un tubo vertical central, con dimensiones de 46 cm de diámetro, que se extiende desde el fondo del tanque a un nivel por encima de la sección cónica del fondo, y en algunos casos hasta casi la superficie del líquido. Antes de descargar el aire en la superficie del líquido, el aire en el interior provoca una importante circulación, con un sustancial flujo de la mezcla que, posteriormente, desciende por la parte interior del recipiente por la zona más externa e ingresa, ocasionalmente, al elevador.

Lixiviación continúa de las dispersiones de sólidos Equipo extractor vertical de platos. Como el extractor Bonotto, que consiste en una columna dividida en compartimentos cilíndricos mediante la disposición de platos horizontales espaciados a distancias iguales. Cada plato tiene una abertura radial (rendija) colocada a 180° con respecto a las aberturas de los platos situados inmediatamente por encima y por debajo y que se limpian mediante un raspador radial giratorio. Alternativamente, los platos pueden montarse sobre un eje coaxial y rotar sobre palas estacionarias. Los sólidos caen como una cortina en el disolvente que fluye hacia arriba por la torre. (Perry, 2011. 18-71).

Figura 3. **Extractor *Bonotto***



Fuente: Robert Perry. Manual del ingeniero químico. p. 18-71.

Los sólidos son retirados por el fondo del equipo mediante un tornillo sinfín y un compactador. Al igual que el equipo Bollman, el equipo Bonotto ha sido desplazado por los equipos de bandas horizontales o por los de percolación de bandejas para la extracción de aceites de semillas.

Tanques de sedimentación por gravedad, operan de la misma forma que los espesadores, y pueden servir como equipos de contacto continuo y separación, en los que se pueden lixiviar, de una forma continua, sólidos finos.

Una serie de estas unidades, conectadas adecuadamente, permite el lavado de los sólidos finos en una operación verdaderamente continua y en contracorriente.

Si es necesario, se puede incorporar un tanque de mezclado a cada espesador para mejorar el contacto entre los sólidos y el líquido que se alimenta en cada etapa. Los espesadores por gravedad son, entre todos los equipos de lixiviación continua, los que requieren mayor área y se limitan a sólidos relativamente finos.

El agitador tipo *Dorr* es una unidad consolidada en los principios de los espesadores y los del equipo del tipo Pachuca. Se asemeja a un espesador con rascador, pero difiere de los anteriores equipos en que el rascador es movido mediante un eje hueco a través del cual circula la suspensión sólido-líquido impulsado por una corriente de aire. El rastrillo mueve la pulpa hacia el centro del equipo, en donde puede ser arrastrada por la corriente de aire. La unidad, además, puede operar en régimen continuo o por cargas.

Tanques agitados por medio de impulsores, pueden funcionar como tanques de lixiviación continua, individualmente o en series. Si la alimentación se trata de una mezcla de partículas de sólidos con diferentes velocidades de sedimentación, y si además es conveniente que todas las partículas permanezcan en el tanque de lixiviación durante el mismo período de tiempo, será ciertamente difícil e inseguro el diseño de un tanque agitado para lixiviación en continuo.

Extractores con transportador de tornillo sinfín, un tipo de equipo para lixiviación continua que emplea el principio del transportador de tornillo no es, en términos estrictos, un equipo percolador ni un equipo de extracción para dispersiones de sólidos.

Aunque se clasifica, con frecuencia, junto con los percoladores, puede haber una agitación suficiente de los sólidos durante su transporte para que la acción sea distinta de la percolación propiamente dicha.

El extractor *Hildebrandt* de inmersión total, la superficie helicoidal se perfora, para que el disolvente pueda atravesar la hélice en contracorriente. Los tornillos sinfín están diseñados de modo que permitan la compactación de los sólidos durante su paso por la unidad. El diseño ofrece las ventajas evidentes de la acción en contracorriente y la compactación continua de sólidos, pero existen ciertas posibilidades de que se produzcan pérdidas de disolvente y un flujo excesivo de alimentación, por lo que el funcionamiento más adecuado está limitado a sólidos ligeros y permeables.

Un diseño bastante similar, pero más sencillo, utiliza una sección del tornillo sinfín horizontal para la lixiviación y un segundo tornillo en una sección inclinada para el lavado, el drenaje y la descarga de los sólidos extraídos.

En el equipo de *Danske Sukkerfabriker*, el eje del extractor está inclinado aproximadamente 10° con respecto a la horizontal, con lo que se elimina la necesidad de dos tornillos con ángulos de inclinación diferentes.

La remolacha se transporta de una manera sencilla y eficaz hacia arriba, dentro de una torre vertical, por medio de un sistema de platos o alas inclinadas, unidas a un eje axial, con la ayuda de platos-guía (estrías) sobre la pared de la torre. La carcasa se llena con agua, que desciende a medida que las remolachas se desplazan hacia arriba. Esta configuración se utiliza en la torre de difusión BMA.

Schwarzberg indica que los extractores con transportador de tornillo sinfín, que se han utilizado ampliamente para la extracción de aceite de semillas, han caído en desuso para esta aplicación por su acción destructiva sobre las frágiles semillas sin cascara.

El clasificador de bandejas es un sistema híbrido, como el de un equipo de extracción-transportador con tornillo sinfín, que permite mediante un sistema de bandejas inclinadas transportar la pulpa y que el disolvente fluya en la dirección contraria. El disolvente es forzado por un deflector a dirigirse hacia el fondo del recipiente evitando un excesivo flujo. Los sólidos deberían estar suficientemente troceados para evitar tensiones en el sistema del rastrillo. (Perry, 2011. 18-72).

2.2. Extractos

Se puede elevar la concentración de principios activos procedentes de una tintura, cocimiento o jugo de las plantas por medio de la evaporación del disolvente, sea alcohol o sea agua. Dado que esta evaporación dañaría y alteraría los principios activos, deberá siempre hacerse al vacío, con lo cual se consigue que la evaporación se haga a una temperatura que no supere los 50°C, ya que la presión de vapor de un líquido depende de la presión total a la que esté sometido.

Al disminuir esta presión -vacío o presión negativa- se consigue aumentar la presión de vapor. Por estos métodos, al evaporarse, se pierden los aceites esenciales de la planta.

En la extracción propiamente dicha se lleva a cabo una separación de porciones biológicamente activas de componentes inertes o inactivos a través de un disolvente elegido y un proceso de extracción seleccionado los cuales puede ser por medio de operaciones de extracción como:

- Extracción líquido – vapor
- Extracción sólido – líquido

2.2.1. Extracción líquido – vapor

Se denomina a la separación de componentes entre una fase vapor y una fase líquida, entre estos métodos se tiene:

2.2.1.1. Destilación

Método que se utiliza para separar los componentes de una solución líquida, el cual depende de los componentes entre una fase de vapor y una fase líquida. Ambos componentes están presentes en las dos fases.

La fase vapor se origina en la fase líquida por vaporización en el punto de ebullición. La destilación puede llevarse a cabo por medio de un evaporador rotativo en donde se lleva a cabo una condensación de disolvente mediante el uso de un matraz de evaporación rotativo.

2.2.1.2. Extracción por Soxhelt

Es un aparato de extracción semicontinua, pues en una de las fases el sustrato se agrega sólo al principio, mientras que el disolvente de extracción cumple un ciclo de extracción y purificación continua. La purificación se realiza en forma paralela por destilación del disolvente, de manera que el sustrato siempre está en contacto con el disolvente puro; se utiliza cuando es necesaria una extracción exhaustiva de la droga. Es útil en escala de laboratorio, a pesar de que la extracción no tenga una alta eficiencia, pues la regeneración del disolvente se realiza automáticamente evitando excesivos manipuleos.

2.2.2. Extracción sólido – líquido

Se denomina a la separación preferencial de uno o más componentes de una mezcla sólida por disolución en un disolvente líquido. En la industria farmacéutica los dos procedimientos de extracción básicos son maceración y percolación.

2.2.2.1. Maceración

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la droga de un tamaño moderadamente grueso o semifino con el disolvente establecido, durante varios días. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el disolvente, el rendimiento del extracto disminuye cuando la relación droga/disolvente aumente. El hinchamiento de la droga es un factor de gran importancia, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del disolvente, a la vez la velocidad con que se obtiene el equilibrio está en función del tamaño de partícula de la droga molida, del hinchamiento de las células y las propiedades del disolvente.

El proceso clásico de maceración denominado maceración simple consiste en dejar la droga en contacto con el disolvente durante varios días, con agitación ocasional, este proceso es un proceso muy lento, por lo que para abreviar el tiempo de operación la droga y el disolvente deben de mantenerse en movimiento constante, este procedimiento es conocido como maceración dinámica.

Concluido el tiempo de maceración se separa el extracto del residuo por medio de un colado o prensado, se lava el residuo con el líquido de extracción y ambos líquidos se llevan al contenido de masa preestablecido.

La turboextracción es un tipo de maceración modificada. El tiempo de maceración en esta extracción se acorta muchísimo debido al tipo de movimiento de agitación que se utiliza, así como trabajar a temperaturas hasta de 20°C por sobre la ambiente.

Este aumento de temperatura lleva a la obtención de sustancias activas más impuras. Este proceso es bastante utilizado para preparaciones en pequeña escala, el uso a nivel industrial se limita a la fabricación de extractos a partir de drogas ricas en mucílagos.

2.2.2.2. Percolación o lixiviación

La percolación consiste en hacer pasar el disolvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. En pequeña escala la percolación se realiza en aparatos denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provisto de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del disolvente.

La percolación en pequeña escala o escala industrial comprende una etapa preliminar de humedecimiento de la droga, fuera del cuerpo del percolador. Este procedimiento tiene como objetivo aumentar el contacto, facilitando el paso del disolvente y no permitiendo la formación de falsas vías, que perjudican la eficiencia del proceso. El humedecimiento de la droga aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células.

El humedecimiento debe ser realizado fuera del percolador ya que puede hincharse excesivamente, principalmente cuando el disolvente es acuoso y comprimirse contra las paredes no permitiendo el paso del disolvente.

Para tener una mayor eficiencia es conveniente realizar una repercolación de disolvente, haciendo recircular el mismo disolvente a través de la droga.

2.3. Tinturas

Son preparaciones en donde el proceso de extracción de principios activos se ha llevado a cabo mediante una maceración, pero no con agua, sino con alcohol-agua, con un grado alcohólico determinado, dependiendo de los principios activos de cada planta y durante un tiempo, en función de la parte de la planta utilizada (hojas, flores, etc.). La relación entre planta y disolvente puede variar del 10 al 20%. Aproximadamente cinco gramos de tintura equivalen a un gramo de planta seca, aunque debe tenerse en cuenta que la extracción no es total y, además, es relativamente selectiva.

Las tinturas tienen la ventaja de ser preparaciones muy simples y sin manipulaciones posteriores. Su grado de alterabilidad es pequeño comparado con otros tipos de extractos y tienen la ventaja de que llevan incluidas las esencias de las plantas, que son solubles en el alcohol.

Las tinturas, infusiones, cocimientos, etc., tienen una concentración poco elevada de principios activos, no obstante, entre ellas las tinturas son más concentradas, debido a que el alcohol tiene mayor capacidad extractiva que el agua.

2.3.1. Tinturas madres

Las tinturas madres son preparaciones líquidas que resultan de la acción disolvente y/o extractiva de un solvente inerte hidroalcohólico sobre la droga vegetal. Se pueden representar utilizando el símbolo TM colocado después del nombre científico o solamente con éste.

2.3.2. Técnicas de preparación

Las tinturas madres son la base para la preparación de los medicamentos homeopáticos a partir de plantas frescas o secas. Como medicamentos dinamizados se encuentran en un grado de dilución bastante elevado, el control de calidad ejercido sobre el producto final se vuelve más difícil o en ciertos casos imposible.

Debido a este hecho, es imprescindible partir de una tintura elaborada con estricto rigor técnico y efectuar el control de las diferentes etapas de producción del medicamento homeopático.

2.3.3. Disolventes y equipos utilizados para la preparación de tinturas

Material de origen vegetal: se utilizan mezclas hidroalcohólicas en diferentes concentraciones. Material de origen animal: algunas farmacopeas recomiendan el uso de una solución glicerizada, entendida como una mezcla de agua o mezcla de alcohol y glicerina en diferentes proporciones.

Los equipos utilizados deben ser de material inerte como, por ejemplo, el acero inoxidable o el vidrio, para que no provoquen alteraciones en la composición de las tinturas. La escala de preparación de tinturas homeopáticas es inferior a la escala utilizada para tinturas de uso fitoterápico.

2.3.4. Preparación de tintura madre

De acuerdo con la farmacopea que se utilice, la preparación de las tinturas madres puede ser diferente. Sin embargo, siempre deben cumplirse las siguientes etapas:

- Selección material vegetal: exámenes microscópicos, macroscópicos, elaboración de ensayos para detectar la presencia de contaminantes;
- Escoger el método de extracción: (maceración/percolación) y el disolvente que debe utilizarse;
- Exprimir y filtrar el material al finalizar la extracción;
- Elaborar la tintura y realizar el control de calidad.

La farmacopea alemana recomienda la preparación de tinturas madres a partir de planta fresca, pero permite el uso de planta seca cuando no sea posible. En el caso de material seco la técnica de preparación es semejante a otras farmacopeas. Las tinturas son preparadas en una proporción del 10% en relación con el residuo seco para la extracción se utiliza la concentración de alcohol descrita en la monografía. En el caso de utilización de plantas frescas la técnica empleada es bastante diferente a las otras farmacopeas, ya que se toma como base el contenido de jugo de las mismas y no el residuo seco de la planta. En este procedimiento se utilizan cuatro métodos principales.

Método 1: se aplica a las plantas frescas con más de 60% de jugo por expresión y que no contengan aceites esenciales, resinas o mucílagos. Se exprime la planta o sus partes y se mezcla el jugo obtenido con un peso igual de alcohol al 90°. La preparación se deja en ambiente cerrado por un tiempo mínimo de cinco días y, posteriormente, se filtra.

Jugo+alcohol 90° (1:1) grado de alcohol final = 45%

Método 2: se aplica a plantas con menos de 60% de jugo por expresión y que contengan más de 70% de humedad (pérdida por secado). Se calcula la pérdida por secado de una pequeña parte (alícuota) de la planta, se divide el material vegetal y se adiciona inmediatamente etanol de 90° en la misma cantidad de humedad calculada. Posteriormente, se macera en un recipiente cerrado durante un mínimo de diez días agitando repetidamente y, finalmente, se prensa y se filtra.

Contenido de humedad + alcohol 90° (1:1) grado de alcohol final = 45%

Método 3: se aplica a plantas con menos de 60% de jugo por expresión y que poseen menos de 70% de humedad (pérdida por secado).

Se calcula la pérdida por secado de una alícuota de la planta. Se divide finamente el material vegetal y se adiciona de inmediato etanol de 90° en una proporción de dos veces el peso del contenido de humedad calculado. Se macera en un recipiente cerrado durante diez días como mínimo, se prensa y se filtra.

Contenido de humedad + alcohol 90° (1:1) grado de alcohol final = 60%

Método 4: se aplica a planta seca o a animales enteros o a sus partes. En este caso, se puede efectuar la extracción tanto por maceración o por percolación, utilizando la concentración alcohólica descrita en la monografía en una proporción de una parte de la droga por diez partes de alcohol.

2.4. Tipos de extractos y tinturas

A continuación, se explican las distintas clases de extractos y tinturas.

2.4.1. Tinturas o alcoholados

Generalmente, se preparan con alcohol de 70°. En los casos no previstos por la farmacopea se pone una parte de droga para cinco partes en peso de tintura (1:5), excepto para drogas muy activas en las que se utiliza una parte de droga para 10 partes de tintura (1:10). El método de preparación puede ser: percolación, maceración o, incluso, dilución de los extractos secos o fluidos correspondientes.

2.4.2. Tinturas madres

Son preparaciones obtenidas por maceración de planta fresca en alcohol de 70° de manera que de una parte de droga se obtienen diez partes en peso de tintura (1:10), excepto en algunos casos como en la caléndula, donde es 1:20.

2.4.3. Extractos fluidos

Se obtienen por percolación con alcohol de 70° y posterior concentración a vacío y estandarización hasta 1:1. Generalmente, se realiza en primer lugar una extracción exhaustiva en la que se obtiene el 80% como líquido y luego el resto se concentra a vacío hasta la consistencia de blando y se mezclan estandarizándose hasta 1:1.

2.4.4. Extractos blandos y secos

Se elaboran a partir de los anteriores por evaporación en vacío hasta consistencia de masa espesa filtrante (15 a 25% de humedad), la concentración es igual o superior a 2:1. Por este mismo proceso o por liofilización, se obtienen los extractos secos cuya concentración es de alrededor de 5:1 (de 2:1 a 10:1).

2.4.5. Nebulizados

Son extractos secos obtenidos pulverizando los fluidos en gotitas muy finas (niebla) que se desecan instantáneamente por calor. Están poco alterados pues el fenómeno de desecación es casi instantáneo. Son más claros, más aromáticos, menos densos (más esponjosos) y más fáciles de volver a disolver.

2.4.6. Extractos purificados

Son cualquiera de los anteriores enriquecidos en principio activo por cromatografía, extracción líquido-líquido, cristalización, etc. El límite de este proceso es la obtención de principios activos puros.

2.4.7. Abstractos

Obtenidos por lixiviación o percolación con alcohol de 94° y Su concentración es 1:5 ó posterior mezcla con lactosa, hasta que un gramo del producto contenga la misma cantidad de principio activo que dos gramos de droga (2:1).

2.4.8. Alcoholaturas

Se obtienen por maceración de material fresco durante ocho días en alcohol de 80° a 95°. También se preparan alcoholaturos estabilizados por ebullición.

2.4.9. Extractos glicólicos

Para su elaboración se emplean mezclas de agua y glicoles (generalmente propilenglicol a veces mezclado con butilenglicol), la concentración va de 1:1 a 1:10. A veces los extractos glicólicos de uso cosmético son en realidad extractos acuosos disueltos en glicoles.

2.4.10. Extractos fluidos incoloros

Se preparan por destilación en corriente de vapor de la droga empapada en alcohol.

2.4.11. Extractos oleosos

Generalmente, la extracción se hace con aceites o bien ésteres de ácidos grasos saturados para evitar su enranciamiento. La concentración va de 1:1 a 1:10.

2.4.12. Macerados glicerinados

Se preparan a partir de planta fresca joven (yemas o brotes jóvenes) macerados con glicerina y alcohol durante, al menos, tres semanas y posterior filtrado con expresión.

2.4.13. Esencias

Pueden obtenerse por arrastre de vapor, expresión, enfleurage o por extracción con disolventes apolares volátiles que, una vez evaporados, dan lugar al concreto (si es planta fresca) o al resinoide (si es seca) que se purifica con alcohol absoluto dando lugar al absoluto.

2.4.14. Aguas destiladas aromáticas (hidrolatos)

Se obtienen por maceración y posterior destilación con arrastre de vapor seguidas de filtración y clarificación. Su concentración es 1:5 ó bien, 1:1.

Son incoloras y contienen del 0,05 al 0,2 % de esencia. Si el mismo proceso se realiza con alcohol en lugar de con agua se obtienen los alcoholatos.

2.5. Variables del proceso extractivo

Las variables que interfieren en el proceso extractivo, independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final son:

2.5.1. División de la droga

La eficiencia del proceso extractivo será mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas, ya que así se obtiene una mayor área de contacto con el disolvente.

En la práctica, la presencia de partículas muy finas dificulta los procesos de percolación, pues se presenta compactación y formación de falsas vías, y los procesos de maceración, en donde las partículas pasan al extracto, haciendo necesaria la realización de la etapa adicional de filtración, la cual no siempre es de fácil ejecución.

Por otro lado, la penetración del solvente en fragmentos mayores de la materia prima es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil. Por esta razón, se recomienda la utilización de polvos moderadamente gruesos para la gran mayoría de las materias primas.

2.5.2. Agitación

La eficiencia del proceso extractivo es función del equilibrio de saturación del disolvente. La agitación hace que nuevas cantidades de disolvente, pobre en las sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado.

El movimiento del líquido, con ayuda de bombas para la recirculación del solvente o agitadores mecánicos, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficiencia del proceso.

2.5.3. Temperatura

La temperatura contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente a temperaturas elevadas.

2.5.4. pH

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales.

2.5.5. Naturaleza del disolvente

Dependiendo de la finalidad deseada, el disolvente utilizado extrae selectivamente o no, cierta clase de compuestos. El alcohol etílico y sus mezclas con agua es el disolvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas.

Entre los solventes generales, los más utilizados son los alcoholes alifáticos de hasta 3 carbonos o mezclas de éstos con el agua. Estos solventes logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés como los alcaloides, los flavonoides, los glicósidos cardiotónicos y los terpenos.

Debido a su poder extractivo, estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente la materia prima. El alcohol etílico y sus mezclas con agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas.

Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar la mezcla de alcohol: agua 7:3 ó 8:2 para la extracción de las partes leñosas de la planta, raíces y semillas, mientras la proporción de 1:1 es recomendada para extraer las hojas o las partes aéreas verdes, ya que en esta concentración se evita la extracción de la clorofila y de las sustancias polimerizadas o resinoides que, generalmente, no presentan actividad terapéutica, pero complican las etapas siguientes de purificación, por el hecho de presentar precipitados viscosos.

2.5.6. Tiempo de extracción

El tiempo de extracción se determina experimentalmente en función del solvente y del equipo seleccionado. Esta variable es resultante de todos los factores mencionados previamente. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario, no influye en el proceso negativamente, pero sí influye en los costos del consumo de energía y de mano de obra no necesaria, lo que acarrea un encarecimiento del proceso industrial.

2.6. Evaluación de agentes antimicrobianos no antibióticos

2.6.1. Consideraciones generales

Los agentes químicos antimicrobianos pueden ser desinfectantes, antisépticos, preservantes y agentes quimioterapéuticos.

2.6.1.1. Desinfectante

Agente químico usado para la desinfección, que incluye la destrucción de microorganismos pero usualmente no las esporas.

El desinfectante no elimina necesariamente a todos los microorganismos pero los reduce a un nivel que no es dañino para la salud ni para la calidad de bienes perecederos. El término de desinfección es usualmente aplicado al tratamiento de superficies y objetos inanimados, aunque puede referirse al tratamiento de la piel y a otras membranas y cavidades del cuerpo.

2.6.1.2. Antiséptico

Es un agente químico usado en la destrucción o inhibición de microorganismos en tejidos vivos por lo que limita o previene los resultados dañinos de una infección.

2.6.1.3. Sanitizante

Agente químico usado para la sanitización, un proceso de limpieza y desinfección de utensilios y equipos en la industria alimenticia.

2.6.1.4. Preservante

Agente antimicrobiano de amplio espectro que es usado para prevenir la multiplicación de microorganismos en productos formulados para evitar la descomposición o contaminación del producto, pudiendo resultar en un posible peligro a la salud.

2.6.1.5. Agente quimioterapéutico

Compuesto usado en el tratamiento de infecciones en el ser humano y en los animales. Este inhibe o elimina el microorganismo que causa la infección ayudando a los mecanismos naturales del cuerpo.

2.6.2. Evaluación preliminar

Algunos parámetros básicos de cualquier agente antimicrobiano deben ser determinados antes de que su uso potencial pueda ser establecido. Estas propiedades son la amplitud del espectro antimicrobiano y si la actividad es letal o solamente inhibitoria.

Por ejemplo, un agente antimicrobiano que tiene un espectro limitado no será un desinfectante o preservante efectivo como un agente de amplio espectro con poca actividad letal, teniendo baja probabilidad de ser un desinfectante potencial. Sin embargo agentes con espectro limitado pueden tener usos, pueden ser agentes quimioterapéuticos o antisépticos efectivos para infecciones específicas.

La toxicidad también es importante y debe considerarse en una etapa temprana. Un agente altamente tóxico no es un potencial agente quimioterapéutico. En general, compuestos de amplio espectro tienden a ser más tóxicos que compuestos con actividades más específicas. Esto es porque quizás la actividad es debida a la interferencia con algunos procesos vitales de las células. Posible toxicidad, irritación y sensibilización son importantes en el caso de antisépticos y preservantes que son usados en formulaciones farmacéuticas y cosméticas para aplicarlas en la piel y cavidades del cuerpo. En el caso de desinfectantes usados para el tratamiento de superficies inanimadas la toxicidad no es tan importante, de hecho algunos desinfectantes son clasificados como veneno, como el *Lysol*.

2.6.2.1. Otros factores

Otros factores deben ser considerados después de las propiedades antimicrobiales y tóxicas básicas.

- El valor de pH puede tener un efecto marcado en la actividad, particularmente si el agente es un ácido o base, en el que su grado de ionización dependerá del pH. Por ejemplo sustancias como el ácido benzoico, son totalmente efectivos en el estado des ionizado.
- Materia orgánica como suero, sangre, pus, suciedad, materia fecal; puede afectar significativamente la actividad de muchos agentes antimicrobianos por reacción química o absorción. Resultando en inactivación o remoción de éste en la solución. La materia orgánica puede formar un compuesto insoluble con el agente que puede precipitar en la superficie de la célula formando una capa protectora.
- Los constituyentes de las formulaciones, por ejemplo agente solubilizantes y emulsificantes pueden antagonizar o potenciar el agente en cuestión.
- El tamaño del inculo puede afectar el resultado de cualquier examen antimicrobiano, este factor es más importante con algunos compuestos que con otros.
- La estabilidad del agente debe ser considerado variando las condiciones del pH.

- Estudios de resistencia, análisis deben realizarse para determinar si los organismos decrecen en sensibilidad. Volviendo a los microorganismos resistentes al agente.

2.6.2.2. Conclusiones

Es evidente que un solo laboratorio de análisis no puede producir toda la información requerida. Una serie de análisis deben ser realizados bajo cuidadosas condiciones definidas para obtener una completa evaluación de cualquier agente antimicrobiano. Incluso el agente debe ser reevaluado en análisis específicos teniendo la formulación final.

Existe un punto en común en estos análisis, todos incluyen la exposición de una población microbiana a un agente antimicrobiano con la subsecuente determinación de crecimiento o supervivencia de las células tratadas aunque sean bacterias, hongos o virus.

2.6.3. Actividad inhibitoria o letal

Muchos agentes antimicrobianos pueden presentar ambas actividades: inhibitoria (bacteriostática) y letal (bactericida), en algún grado dependiendo de la concentración usada.

La bacteriostasis implica la prevención del crecimiento de una población bacteriana debida a un agente antimicrobiano bajo condiciones en las que el crecimiento normalmente ocurriría. Si la bacteriostasis es mantenida durante un periodo prolongado de tiempo la muerte eventualmente ocurrirá. Por esta razón es importante reportar el tiempo y temperatura de incubación en los análisis. La incubación prolongada puede permitir a algunas células insensibles multiplicarse mientras que con otras no ocurre, indicando acción bactericida.

La actividad bactericida ha ocurrido cuando las bacterias que han sido expuestas a un agente antimicrobiano no se recuperan después de removerlas del agente, debido a algún proceso letal irreversible como inactivación de enzimas, daño a membranas y oxidación. Debe tenerse cuidado en como es aplicado el término recuperable. La concentración mínima inhibitoria (CIM) del agente activo puede ser obtenida de análisis de bacteriostasis. Una concentración que no es inhibitoria, si puede serlo para una célula que esta dañada. El agente activo puede ser absorbido en la superficie de la célula tratada, resultando en una bacteriostasis localizada.

Esto es particularmente importante en agentes activos de superficie como los compuestos de amonio cuaternario. Por lo que sustancias antagónicas, que inhiben o reducen la actividad del agente antimicrobiano en cuestión, son frecuentemente usados.

La fase tardía y el tiempo de generación de los organismos recuperados después del tratamiento con un agente antimicrobiano puede prolongarse, por lo que el tiempo prolongado de incubación puede revelar organismos que se pensaban estaban muertos.

2.6.4. Evaluación de actividad bacteriostática

Estos análisis son relativamente simples de realizar. La actividad bacteriostática de un compuesto puede ser evaluada por series de diluciones en medios líquidos o sólidos o por difusiones en medios sólidos.

Las series de diluciones en medio sólidos o en difusión en agar, son pruebas más convenientes para determinar el espectro antimicrobiano de un compuesto porque varios microorganismos pueden analizarse en un plato.

El análisis de agar es mejor para compuestos y formulaciones que precipitan en el medio, porque los puntos finales pueden ser difíciles de leer en medios líquidos. Sin embargo, algunos análisis deben ser siempre hechos en medio líquido para verificar si el agar tiene un efecto antagónico en el compuesto.

Sin importar la prueba utilizada debe recordarse que es solamente la cantidad de compuesto en solución que puede ejercer acción antimicrobiana. Debe tenerse cuidado para disolver un compuesto con la ayuda de solventes orgánicos como acetona, etanol o una fina dispersión.

Los controles de análisis deben realizarse siempre para demostrar que el propio solvente no tiene efecto en la concentración usada en la prueba.

2.6.4.1. Prueba de serie de diluciones

Generalmente se preparan series geométricas en donde las diluciones son separadas por una proporción constante, usualmente de dos. Las diluciones son preparadas por transferencia de líquido de un tubo al siguiente, y así los errores se vuelven acumulativos. Por esto ninguna significancia es vinculada a valores menores de diferencias cuádruples en las actividades de niveles.

Si la exactitud es de gran importancia en el ensayo de un agente antimicrobiano. Para la estabilidad de datos, las series aritméticas de diluciones son usualmente utilizadas.

La serie de diluciones del compuesto son añadidas a agar fundido, este se deja enfriar y solidificar. La superficie es inoculada con los organismos de prueba. Un método útil es verter una mezcla de agar y el agente antimicrobiano en platos, dejándose secar. En esta prueba alrededor de 27 organismos pueden inocularse usando un inoculador multipunto.

A cada punto de la serie de diluciones puede añadirse un medio líquido de nutrientes que será inoculado con un organismo de prueba. Por lo que este análisis consume más tiempo si se analizan varios organismos. En ambas pruebas la concentración mínima inhibitoria usualmente se expresa en $\mu g/mL$, y esa es la expresión de la magnitud de la actividad bacteriostática.

El método del plato de agar de 27 organismos es útil en la determinación del espectro de un compuesto. Para hacer esto deben de analizarse la mayor cantidad de bacterias, hongos y levaduras. Desafortunadamente no existe un medio de cultivo capaz de sostener adecuadamente el crecimiento de todo tipo de bacteria.

Aunado a esto, los microorganismos no crecen a la misma razón o temperatura, por lo que varias pruebas deben realizarse en distintos medios y con variaciones en el tiempo y temperatura de incubación.

El análisis del plato de agar diluido es también útil en la determinación de los efectos de variaciones de pH, tamaño de inóculo, adición de materia orgánica y otro tipo de constituyentes.

En todas las pruebas deben utilizarse controles adecuados para demostrar que los agente añadidos, como buffer, no inhiben por ellos mismos a los microorganismos. También debe ser demostrado que todos los microorganismos analizados crecen en el medio de cultivo al tiempo y temperatura de incubación. Es útil probar un agente activo conocido como estándar en estas pruebas.

Cuando se necesita de mayor exactitud de la actividad, las razones de crecimientos de bacterias en presencia y ausencia de sustancias pueden ser determinadas con un equipo de absorción.

2.6.4.2. Prueba de difusión en agar

Estas pruebas dependen de la capacidad del compuesto de difundirse a través del agar. Un compuesto de baja densidad en agua puede difundirse más difícilmente que un compuesto de alta densidad en agua. De esta manera un compuesto con una menor zona de inhibición puede no ser menos activo que un compuesto químico distinto con una mayor zona de inhibición, cuando son analizados a la misma concentración y en condiciones similares. Esta prueba es considerada como cualitativa más que cuantitativa, aunque actualmente se ha adaptado a pruebas cuantitativas para antibióticos.

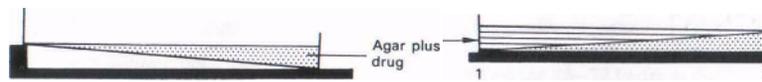
2.6.4.2.1. Técnica del plato con estrías

Esta prueba permite analizar a un solo compuesto o formulación contra un rango de organismos. Una disolución del compuesto, de compuesto mezclado con agar para facilitar su manejo o de la formulación semi sólida cortada, es colocada en un plato de agar. Distintos organismos son inoculados a través del agar a ángulos rectos respecto al plato. Después de un periodo adecuado de incubación a determinada temperatura que oscila de 18 a 24 horas por bacteria, se observa el grado de inhibición. Las pruebas de plato permiten conocer el espectro de un compuesto rápidamente, su uso principal al igual que las pruebas de agar, es para formulaciones semisólidas como cremas.

2.6.4.2.2. Prueba de la taza de agar

En esta prueba el agar es inoculado con el organismo y las disoluciones o formulaciones son colocadas en tazas, se corta el agar con un perforador esterilizado. Alternativamente, si son disoluciones las que se están analizando, un volumen conocido puede verterse en discos de papel filtro que son colocados después en la superficie del agar. Las zonas de inhibición son localizadas después de la incubación, para ambos casos. Estas pruebas son útiles para mostrar la liberación del agente activo de una disolución semisólida.

Figura 4. **Técnica del gradiente**



Fuente: Barry William. Pharmaceutical microbiology. p. 189.

2.6.4.2.3. Prueba del plato con gradiente

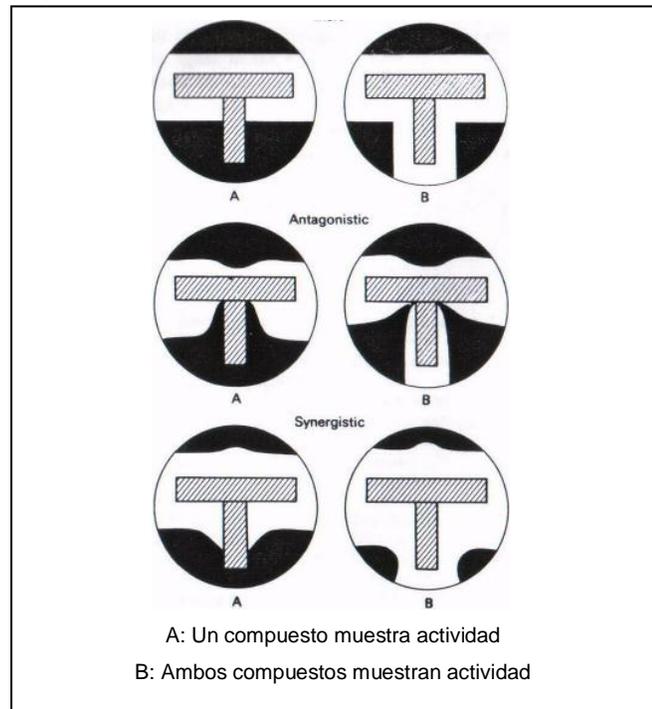
Puede ser utilizada para demostrar indicios de la concentración mínima inhibitoria de un compuesto con la condición de difundirse a través del agar. El sistema experimental consiste en un plato de agar con dos capas de agar la primera capa consiste en 10 mL de agar conteniendo el agente antimicrobiano que es colocado en una cuña, la segunda capa de 10 mL de agar se vierte en el desnivel dentro del plato de petri. Los organismos son inoculados de la más alta a la más baja concentración. A medida que se realiza la inoculación el agente se difunde a través del agar, resultando en un gradiente de concentración con el subsecuente crecimiento o inhibición de organismos arriba de cierto nivel.

2.6.4.2.4. Pruebas de difusión para demostrar el efecto de sustancias antagónicas y potenciadoras

Los compuestos a analizar se ubican sobre tiras de papel filtro, estas son colocadas a ángulos rectos entre ellos. El patrón de la zona de inhibición en la intersección de las tiras es comparado para indicar antagonismo o sinergismo.

Esta prueba es más bien aplicada a la investigación de antagonistas o potenciadores de un compuesto antimicrobiano cuando se investigan compatibilidades de distintos constituyentes de formulaciones.

Figura 5. Interacciones de compuestos



Fuente: Barry William. Pharmaceutical microbiology. p. 190.

2.6.5. Evaluación de la actividad bactericida

Un análisis bactericida es en el que una población microbiana se pone en contacto con un agente antimicrobiano por un tiempo definido o por períodos de tiempo tras lo que los microorganismos se recuperan.

La elección del punto final más adecuado en estos análisis puede variar. Algunos expertos consideran como punto final la muerte total, para lo cual Berry y Bean crearon una técnica del tiempo de extinción.

A pesar de múltiples repeticiones en este análisis ocurren variaciones considerables en los resultados, por lo que los autores recomiendan tomar un valor medio.

El método puede ser valioso cuando agrupar los organismos en análisis pudiera invalidar otros métodos de estimación de actividad bactericida.

Un punto de muerte total no necesariamente indica esterilidad pero si la ausencia de organismos reactivados en la muestra tomada, cuyo volumen influencia el resultado. Se tiene el criterio de muerte de 99.9%.

2.6.5.1. Técnica de conteo viable

La actividad bactericida de un agente antimicrobiano es usualmente evaluada al realizar cuentas viables al variar intervalos de tiempo en los miembros sobrevivientes de una población bacteriana en contacto con soluciones del agente.

Alternativamente se evalúa con el número de microorganismos sobrevivientes que se mantienen viables al final de tiempo de contacto dado, regularmente 10 minutos.

El resultado se expresa como el porcentaje de muerte obtenido a condiciones de tiempo y concentración fijadas, las condiciones de análisis deben ser registradas.

La técnica de conteos viables de organismos sobrevivientes, se puede lograr colocando volúmenes usualmente de 1 mL de la mezcla de la droga y el organismo o diluciones de esta, en agar fundido a 45-48 °C y verterlos en cajas.

Los platos son inoculados por 48-72 horas a la temperatura óptima para el microorganismo de análisis, después de este tiempo las colonias son contadas.

Conteos exactos son usualmente hechos de diluciones conteniendo de 30-300 organismos por mililitro, usando el factor de dilución conocido y el número de organismos sobreviviente pueden calcularse; asumiendo que cada colonia se origina de una sola célula.

La desventaja de este método es que las células dañadas que se encuentren en contacto con el agente antimicrobiano pueden destruirse por la adición de agar caliente, y por lo tanto puede no recuperarse. Esto puede dar la impresión de una mayor actividad bactericida de lo que es en realidad.

El contacto de células recuperadas con agar caliente puede ser eliminado usando la técnica de conteo de superficie de *Miles* y *Misra*. Una gota de cada dilución de suspensión bactericida es colocada en la superficie de un plato de agar seco, usando pipetas calibradas. Después de la incubación las colonias pueden ser contadas si se utilizan diluciones adecuadas. Otro método de evitar agar caliente es de filtrar la suspensión a través de una membrana de filtración que es lavada *in situ* y después se coloca en la superficie de un medio de agar.

Las cuentas viables pueden llevarse a cabo por series de diluciones en medio líquido. El número más probable de células viables en la muestra original puede ser estimado por referencia de la dilución a la que el crecimiento se detiene. En este tipo de análisis debe tenerse cuidado en el sentido de aseguramiento de que el proceso letal se detenga inmediatamente, retirando la muestra inmediatamente.

Esta inactivación es lograda por la dilución con fenol o con un agente de inactivación en el medio de recuperación. Se realizan controles adecuados para demostrar que la desactivación del agente ha sido lograda. La elección del fluido para diluir es importante: agua destilada, disolución salina y disolución de Ringer tienen todos efectos deletéreos en la bacteria. Por lo que se usa disolución acuosa de peptona.

2.6.5.2. Prueba del coeficiente fenólico

Estas pruebas son utilizadas en desinfectantes. Para realizarlas se usa fenol como estándar. Desde la incidencia de la fiebre tifoidea la *Salmonella Typhi*, el organismo causante, fue utilizado en estas pruebas.

2.6.5.2.1. La prueba de *Rideal-Walker*

Fue introducido en 1903 por *Ridel y Walker*. Aunque ha sido criticado se utiliza como una herramienta de control de calidad. El principio del análisis es comparar cinco diluciones seleccionadas de desinfectantes contra soluciones estándar de fenol por su acción bactericida contra la *Salmonella Typhi* NCTC 786. El coeficiente fenólico se calcula al dividir la dilución del desinfectante que permite la supervivencia de las bacterias a 2.5 y 5 minutos, pero no a 7.5 y 10, por la dilución del fenol de la misma respuesta.

2.6.5.2.2. La prueba de *Chick-Martin*

En 1908 *Chick y Martin* notaron que los desinfectantes usualmente deben actuar en presencia de materia orgánica, por lo que sugirieron la adición de 3% de heces humanas en el análisis.

También consideraron que el tiempo de desinfección de 10 minutos del análisis de *Rideal-Walker* era muy corto e introdujeron un tiempo de contacto de 30 minutos con duplicados. Una cepa distinta de *Salmonella Typhi* fue utilizada. El material fecal después fue reemplazado por células de levadura muertas.

La interpretación de todos los análisis de coeficiente fenólico es que la concentración menor (o la dilución más alta) del desinfectante deber ser 20 veces el coeficiente fenólico.

2.6.5.2.3. La prueba AOAC

Esta prueba compara la actividad de un desinfectante desconocido con el fenol, sin embargo permite escoger las cepas y trabaja con dos microorganismos: *Salmonella Typhi* y *Staphilococcus aureus*. Esta prueba se utiliza como control de producción de desinfectantes fenólicos. Existen problemas cuando el análisis es usado indiscriminadamente para evaluar cualquier formulación que tenga constituyentes distintos. En la actualidad muchos desinfectantes aunque basados en fenol, contienen compuestos o mezclas insolubles, en contraste con la alta solubilidad del fenol en agua.

La *pseudomona aeruginosa* es una mejor opción de microorganismo pues es considerada uno de los microorganismos más resistentes a los desinfectantes químicos. Un organismo alternativo es la *escherichia coli*. Otra crítica al método es que el resultado final depende de la transferencia de uno o más microorganismos viables de la mezcla desinfectante-bacteria en el medio de recuperación. En la transferencia de grandes volúmenes se utiliza una pipeta para tener mayor exactitud, la transferencia de volúmenes pequeños de 5-10 mL no es posible por el riesgo de bacteriostasis.

Al llevarse a cabo la desinfección el número de organismos viables por rizo de aza disminuye, como es de esperarse.

El tiempo de contacto también ha sido criticado por ser irrealmente corto para la mayoría de los propósitos de los desinfectantes.

Finalmente los 37 °C establecidos como temperatura de recuperación puede no ser la óptima para células dañadas en contacto con el desinfectante.

2.6.5.3. Otros métodos estándar

La prueba de *Kelsey-Sykes*, permite escoger el microorganismo, condiciones de limpieza o suciedad, se adiciona una suspensión de levaduras con pipeta. La temperatura de recuperación en incubación es de 30-32 °C y los subcultivos son hechos en cinco tubos.

El desinfectante es satisfactorio en la dilución que no muestra crecimiento en dos o más tubos de los cinco.

Una prueba *Kelsey-Sykes* mejorada ha sido recientemente descrita. Difiere de la primera en los siguientes aspectos:

- El crecimiento de los microorganismos de análisis es en medio líquido químicamente definido para obtener reproducibilidad de resultados.
- Una suspensión acuosa del microorganismo es utilizada en condiciones “limpias” y “sucias”, el material orgánico es siempre levadura.
- El medio de recuperación consiste en caldo al 3% en peso.

2.6.5.4. Pruebas para desinfectantes agrícolas

Hasta 1970 los desinfectantes eran aprobados bajo los principios de la prueba de *Chick-Martin*. Actualmente, son aprobados en cinco categorías de acuerdo al uso propuesto:

- Enfermedad del pie y la boca

- Enfermedad vesicular del cerdo
- Enfermedad de *Newcastle*
- Tuberculosis
- Enfermedades específicas: ántrax

El microorganismo para el grupo cuatro es *Salm. Cholerausuis* y para el grupo tres *Mycobacterium fortuitum*, ambas pruebas son realizadas con levaduras. La dilución aprobada es en la que el inóculo es reducido por lo menos en un factor de 10^4 en 30-60 minutos a 4 °C.

La crítica a esta prueba es que pueden dar resultados reproducibles con algunos desinfectantes y con otros no. Se ha establecido que la edad de la levadura tiene un marcado efecto en el punto final para yodoformo, lo cual es un problema pues no se ha estandarizado.

2.6.5.5. Pruebas adicionales

Aunque por definición un desinfectante no deba eliminar esporas, en ocasiones es útil saber si lo hace. La prueba del conteo viable puede aplicarse a pruebas con esporas, así como métodos de filtración y extinción

2.6.5.6. Miscelánea de métodos

2.6.5.6.1. Reproducción de capa

Realizada en 1952 para seleccionar mutantes resistentes, puede adaptarse a pruebas bactericidas para medios sólidos.

Almohadillas de terciopelo o papel filtro son usados para transferir organismos vivos desde el área de análisis a una superficie de agar estéril para detectar organismos sobrevivientes. Las réplicas generalmente son tomadas al final de la prueba de bacteriostasis, indicando actividad bactericida después de un periodo de contacto de 18-24 horas a 37 °C. Este método es útil para formulaciones semisólidas y puede también ser usado para pruebas de desinfección de superficie.

2.6.5.6.2. Pruebas de desinfección de superficie

Este tipo de desinfección es importante en la industria de alimentos. La prueba del tubo de Lisboa fue diseñada para determinar la eficiencia bactericida de agentes químicos.

2.6.6. Pruebas de estabilidad y estudio de formulaciones

Habiendo determinado la actividad básica antimicrobiana de cualquier agente nuevo, su estabilidad en solución y en formulación debe establecerse por ensayos químicos o microbiológicos. La estabilidad afectará cualquier uso proyectado del agente e influenciará la formulación final.

2.6.7. Pruebas de uso

La etapa final de evaluación debe ser realizada con condiciones tan cercanas como sea posible a las encontradas en la práctica. Un bactericida es considerado como satisfactorio a una concentración que causa una reducción de más del 85%, en tres pruebas separadas, en la cuenta bacteriana en la muestra tomada de la cámara de la prueba entre el cuarto y el sexto minuto después de la exposición del bactericida.

2.7. Características fisicoquímicas

2.7.1. Características organolépticas

Dentro de los procesos directos de identificación de la materia prima están las características organolépticas, aquellas que pueden ser definidas por los sentidos. Es de importancia el registro de éstas en los tejidos botánicos, así como la presencia o ausencia de olor. La monografía individual puede incluir información botánica sobre posibles especies adulterantes para ayudar a garantizar su ausencia en el material crudo.

2.7.2. Características fitoquímicas

Aunado al examen botánico está el análisis fitoquímico que ayuda a autenticar la identidad del material vegetal. La identificación química, generalmente utiliza procedimientos cromatográficos para detectar la presencia de compuestos marcadores. Los perfiles cromatográficos o espectroscópicos pueden ser usados para obtener la identificación química comparando siempre contra un estándar o muestra de referencia.

Algunos ejemplos de métodos espectroscópicos son: el ultravioleta-visible (UV-Vis), infrarrojo (IR) e infrarrojo con transformada de *Fourier* (FTIR). Los ejemplos de métodos cromatográficos incluyen: cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), cromatografía de capa fina (TLC), TLC bidimensional y cromatografía de gas (GC). Los métodos analíticos usados para obtener la huella digital (*fingerprinting*) de un material vegetal deben ser capaces de detectar la mayor cantidad de compuestos químicos como sea posible. Las huellas digitales múltiples obtenidas utilizando una combinación de métodos analíticos, con diferentes principios de separación y condiciones de ensayo, pueden ser de gran utilidad (Solís, 2005. 55).

2.7.3. Constituyentes

La quimiotaxonomía es la clasificación de plantas basadas en sus constituyentes químicos y ésta puede ser de utilidad en la identificación de material vegetal. Los compuestos metabólicos encontrados en los tejidos vegetales pueden ser divididos en dos grandes categorías basadas en sus funciones. La primera categoría comprende los metabolitos primarios que son los involucrados en los procesos fisiológicos de la planta, absolutamente necesarios para la vida y son omnipresentes en el reino vegetal; estos procesos incluyen, la fotosíntesis, respiración y metabolismo del ácido nucléico, proteínas, carbohidratos y lípidos.

La segunda comprende los metabolitos secundarios, compuestos que se cree no son absolutamente necesarios para los procesos de la vida, aunque pueden tener funciones importantes en las interacciones de la planta con otros organismos, tales como interacciones alelopáticas, defensa química contra herbívoros y patógenos y atracción para la polinización y animales dispersadores de semilla.

Muchos metabolitos secundarios son conocidos por tener actividad farmacológica y, además, son la base para la quimiotaxonomía de las plantas.

Los metabolitos secundarios pueden ser clasificados en diferentes clases químicas, tales como: aminoácidos no proteicos, flavonoides, xantonas, cumarinas, poliacetilenos, policétidos cíclicos, monoterpenos, sesquiterpenos, iridoides, triterpenos, esteroides, terpenos que contienen nitrógeno y alcaloides. Estas clases químicas no son omnipresentes en el reino vegetal, pero tienden a ser específicas de ciertas clases botánicas, órdenes y familias. Además, muchas subclases químicas y compuestos secundarios individuales son específicos para ciertas subfamilias, géneros y especies (Solís, 2005. 56). Son estas subclases químicas y compuestos individuales los que pueden ser usados como compuestos marcadores para ayudar en la identificación apropiada del material vegetal.

2.7.4. Identificación química

Para la identificación química de artículos botánicos se preparan extractos, los cuales son mezclas complejas de varios constituyentes químicos. Para la gran mayoría de extractos botánicos, se puede decir que no se conoce con certeza cuál de los componentes es el responsable del efecto farmacológico registrado. Generalmente, se cree que varios constituyentes actúan sinérgicamente para proveer dicho efecto. Para el material vegetal que posee una monografía, ciertos constituyentes químicos son elegidos y se describen ensayos cuantitativos para evaluar su contenido. La elección de tales componentes, generalmente conocidos como marcadores, está basada en ciertas consideraciones. Actualmente, los siguientes tipos de marcadores son especificados en las monografías y pueden ser identificados en la materia prima.

2.7.4.1. Principios activos

Son constituyentes que tienen actividad clínica probada. El contenido mínimo o rango para los principios activos es especificado usualmente en la monografía individual. Una determinación cuantitativa de los principios activos durante los estudios de estabilidad de las formas de dosificación botánicas proporciona la información necesaria para llegar a la fecha de vencimiento conveniente.

2.7.4.2. Marcadores activos

Son compuestos que tienen actividad farmacológica conocida y contribuyen en cierto grado a su eficacia. Sin embargo, la eficacia clínica para estos constituyentes puede no estar demostrada. Un contenido mínimo o rango de marcadores activos es especificado usualmente en la monografía individual. Una determinación cuantitativa de los marcadores activos durante los estudios de estabilidad de las formas de dosificación botánicas, proporciona la información necesaria para llegar a la fecha de vencimiento conveniente.

2.7.5. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

El cribado o tamizaje fitoquímico tiene como objetivo general la determinación cualitativa de los principales grupos químicos presentes en el material vegetal y que, por lo general, son los grupos responsables de la actividad farmacológica. Estos ensayos son simples y pueden utilizarse de forma general para la caracterización de extractos obtenidos de material vegetal pero no son ensayos cuantitativos, por lo tanto, no indican por sí solos la calidad del material vegetal.

Las técnicas de determinación cualitativa más corrientemente utilizadas incluyen la determinación de la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, antracenos, esteroides insaturados, saponinas, glicósidos cardioactivos y otros grupos fenólicos.

2.7.5.1. Saponinas

Los glucósidos saponínicos también llamados saponinas o sapogeninas son derivados terpénicos que agitados en el agua producen espuma semejante al jabón, así reducen la tensión superficial del agua. Son unos excelentes emulsivos, se encuentran frecuentemente en las plantas medicinales (Solís, 2005. 59). Una de las características de las saponinas es producir la hemólisis de los glóbulos rojos (eritrocitos) por lo cual son muy dañinas si se inyectan directamente en sangre; a causa de esto, algunas plantas no son útiles en medicina; sin embargo, para los animales de sangre caliente apenas tiene toxicidad.

Se han utilizado mucho como agentes limpiadores y como espumantes, especialmente en líquidos de extinción de incendios la hidrólisis de las saponinas mediante óxidos o enzimas, elabora un azúcar (generalmente una glucosa) y una sapogenina; algunos de estos azúcares son utilizados como materias primas para sintetizar hormonas esteroideas. Algunas plantas con alto contenido de glucósidos saponínicos son: hoja de acacia, hoja de abedul, castaño de indias, ginseng, flor de gordolobo, regaliz, hiedra primavera raíz de saponaria o jabonera, violeta y zarzaparrilla. Medicinalmente, las saponinas relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales fluidifican éstas y facilitan la expectoración (como la violeta, gordolobo y saponaria).

Se emplean también como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias (como la zarzaparrilla). En usos externos son analgésicas y cicatrizantes (como la hiedra).

2.7.5.2. Taninos

Los taninos son sustancias, de alto peso molecular, es un complejo polímero de ácidos fenólicos y algunos además contienen azúcares. Las uniones entre los taninos y las macromoléculas son de tipo hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los grupos fenólicos de los taninos y las proteínas. Uniones covalentes aparecen para asegurar la estabilidad del complejo, ello implica enlaces luego de la oxidación de los fenoles quinonas.

Según su composición se pueden clasificar los taninos en:

Taninos hidrolizables: Son ésteres de una azúcar y un variable número de moléculas fenólicas, el azúcar es generalmente glucosa y el ácido fenólico puede ser ácido gálico en caso de galotaninos o puede ser ácido hexahidrodifénico en el caso de elagitaninos.

Taninos condensados: Son polímeros flavanoles, que son unidades de flavan-3-ol unidas por enlaces carbono-carbono, principalmente 4-8 o 4-6. Estos taninos, biogenéticamente son derivados del metabolismo de los flavonoides.

2.7.5.3. Flavonoides

En el amplio sentido son los pigmentos virtualmente universales en las plantas. Casi siempre solubles en agua y son responsables por el color de flores, frutos y algunas veces las hojas.

Los flavonoides están también universalmente presentes en la cutícula de la hoja y células epidérmicas donde ellos aseguran protección contra el efecto de la radiación ultravioleta.

Todos los flavonoides, aproximadamente 3000, tienen en común el origen biosintético, y por ende posee la misma estructura básica, denominada 2-fenilcromano. La migración del anillo de fenilo a la posición 3 resulta en un esqueleto de 3-fenilcromano, dando origen a los isoflavonoides. Cuando es un esqueleto de 4-fenilcromano se llaman neoflanoides.

Los flavonoides propiamente dichos puede ser clasificados de acuerdo al estado de oxidación del anillo de pirano central en el menos 12 grupos, como flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, flavan-3-oles, flavan-3-dioles, charconas, auronas y antocianidinas.

Además de los OH en las posiciones 3, 5,7 y 4' pueden encontrarse en formas diméricas unidas a través de enlaces C-C de las posiciones 8 y 6 reactivas. También estos OH, puede estar unidos por enlaces O-glicósidos, los C-glicósidos aparecen unidos en las posiciones.

2.7.5.3.1. Actividad biológica de los flavonoides

La principal propiedad de los flavonoides es una actividad Vitamina P, potencialmente activa sobre las venas, estas disminuyen la fragilidad y permeabilidad capilar.

En adición, al hecho de la naturaleza de vitamina de estos compuestos es cuestionable, ya que no hay prueba que la deficiencia de flavonoides conduzca a algún síndrome, es mejor referirse a estos como factor P o vitamina factor P- la FDA no reconoce ninguna actividad de este grupo de compuestos, sin embargo, en algunos países europeos, estos son ampliamente prescritos, recomendados por los farmacéuticos y comúnmente automedicados para tratar desórdenes circulatorios menores. Adicionalmente algunas moléculas han probado su eficacia en altas dosis.

El concepto de factor P es consecuencia de la observación que ciertos síntomas de escorbuto, no son curados por la administración de jugo de limón, no son curados por el ácido ascórbico. Por tanto se asume que el ácido ascórbico es sólo activo en combinación con el factor P, primero identificado como flavonoides, luego como antocianinas y oligómeros flavanólicos.

Los flavonoides son a menudo antiinflamatorios, interfiriendo con el metabolismo del ácido araquidónico, como apigenina, crisina, taxifolina, gospina, etc. También pueden ser antialérgicos, hepatoprotectores, antiespasmódicos, disminuyen el colesterol, diuréticos, antibacterianos, citostáticos y captadores de radicales libres *in vitro*. La presencia de los flavonoides puede justificar en muchos casos el uso venáculo para enfermedades relacionadas.

2.7.6. Cromatografía de adsorción

La separación de sustancias por adsorción diferencial fue introducida en 1906 por Tswett, que separó varios pigmentos (clorofilas, xantofilas, carotenos) de las hojas verdes, haciendo pasar un extracto de las hojas en éter de petróleo a través de una columna de carbonato cálcico en polvo.

Los distintos componentes coloreados quedaron retenidos (adsorbidos) en bandas que ocupaban distintas posiciones en la columna, cuyo conjunto recibió el nombre de cromatograma.

Los componentes separados se recuperaron sacando de la columna el adsorbente, cortándolo en secciones y extrayendo en cada una los compuestos adsorbidos. Aproximadamente desde 1930, las separaciones fundadas en la adsorción preferencial han cobrado importancia en la metodología analítica (Ayres, 1970. 74).

Existen varias etapas en un análisis cromatográfico (Perry, 2001. 15-46):

- Adsorción de las sustancias a separar, normalmente disueltas en disolventes no polares como éter de petróleo.
- Desarrollo, en que los materiales adsorbidos se extienden por la acción de un flujo continuo de la disolución de un disolvente puro.
- Recuperación de los componentes separados, realizada normalmente por elución del material adsorbido mediante un disolvente más polar, o varios disolventes sucesivamente empleados, que van separando los materiales deseados.
- Identificación y medida de las sustancias individuales por distintos medios, como reacciones coloreadas, fluorescencia ultravioleta, espectrofotometría de absorción, etc.

La eficacia de la separación depende de factores como la naturaleza química de los componentes a separar, del disolvente y del absorbente; la geometría de la columna; la velocidad y el flujo de la disolución y del disolvente utilizado en el desarrollo del cromatograma.

2.7.6.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía de capa fina es una técnica de separación en la cual la fase estacionaria es esparcida sobre un soporte (placa) de vidrio, metal o plástico, como una capa delgada y uniforme. Las soluciones de los analitos son depositadas sobre la placa y luego corridas. La separación se basa en adsorción, partición, intercambio iónico o en combinaciones de estos mecanismos y se lleva a cabo por la migración a través de la fase estacionaria de los solutos en un disolvente o mezcla apropiada de disolventes.

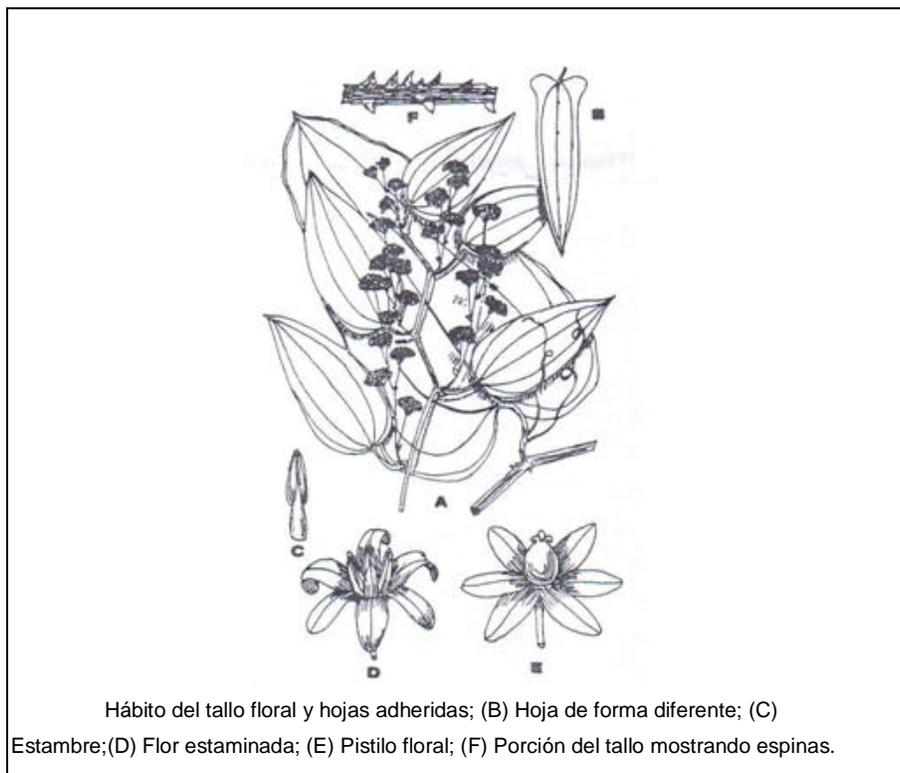
Inicialmente, es necesario pre acondicionar las placas cromatográficas, lo cual se puede realizar corriéndolas en un disolvente apropiado y, al momento de uso, calentándolas en un horno de 100 a 105°C por una hora. La técnica de capa fina es imprescindible cuando se quieren valorar componentes individuales, pues permite la separación de mezclas de sustancias (Ayre, 1970. 77). En el pasado, luego del desarrollo del cromatograma, era necesario raspar la placa y eluir los componentes de interés pero, actualmente, con el uso del densitómetro, se pueden analizar las manchas *in situ*. Sin embargo, a pesar de la ventaja que implica el uso de esta técnica, la densitometría no es un método oficial de ninguna farmacopea, hasta el momento.

En capa fina las fases estacionarias pueden ser: sílica gel 6OF254, óxido de aluminio y celulosa. La capa fina se utiliza sólo para identificación del material vegetal, aún cuando existan otros métodos cromatográficos en la monografía, como cromatografía de gas y cromatografía líquida.

Este método cromatográfico tiene como fin elucidar el cromatograma del material, en comparación con una determinación es muy importante para drogas subterráneas y, además, para detectar adulteraciones en un material vegetal, pues pueden agregarse minerales a la materia prima.

2.8. Descripción de Zarzaparrilla

Figura 6. **Zarzaparrilla**



Fuente: Armando Cáceres, Plantas de uso medicinal en Guatemala. p. 375.

- Nombre científico: *Smilax domingensis*
- Sinonimia: *Smilax caudata* Lundell, *S. lundellii* Killip & Morton, *S. lanceolata* auctnon, Linneo, *S. microscola* Robinson Killip et C. Morton.
- Otros nombres populares: Bejuco de la vida, Cocolmecca, Cuculmecca, Diente de Chucho, Palo de la vida

2.8.1. Descripción botánica

Glabras completamente. Tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con agujones robustos recurvados, inermes en la parte superior. Hojas 6-15 cm por 1.5-10 cm, 1.4-6 veces más largas que anchas, ovadas, lanceoladas-ovadas, o lanceoladas, cartáceas, inermes, 5-nervias desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado o brevicuspidado, la base aguda, el margen entero; pecíolos 0.5-2 cm. Umbelas estaminadas solitarias; pedúnculo 1-5 mm, más corto que el pecíolo subyacente, subterete. Tépalos de las flores estaminados 4-6 mm; filamentos 2-4 mm; anteras 1-2 mm. Tépalos de las flores pistiladas 4 mm. Bayas 7-10 mm, rojas, purpúreas o negras (Cáceres, 1996. 374).

2.8.2. Hábitat

Crece en bosques o matorrales húmedos, desde cerca del nivel del mar hasta los 1,200 msnm; se ha descrito en Alta Verapaz, Escuintla, Izabal, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa.

2.8.3. Historia

Las *Smilax* del viejo mundo eran utilizadas por Dioscórides y Plinio. Los rizomas de zarzaparrilla fueron introducidas del Nuevo Mundo, a la medicina europea por comerciantes españoles del siglo XVI de acuerdo con Monardes fue introducida por primera vez en Sevilla en 1536. Se conocen como un remedio contra los dolores crónicos de las articulaciones y la cabeza y contra los resfríos.

La zarzaparrilla tuvo buen mercado por su uso para el tratamiento de sífilis y una variedad de enfermedades que requería purificación de la sangre. En el siglo XVII; era recomendada por famosos clínicos como Doryce y Cullen, pero hacia principios del siglo XVIII dejó de usarse, posiblemente por adulteraciones. En 1850 vuelve a tener importancia al incorporarse a la U.S. Pharmacopoeia donde permanece para tratar sífilis hasta 1950. Por una combinación de factores ha tenido una pérdida de popularidad, aunque pareciera seguir siendo una droga útil en el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas.

2.8.4. Agricultura

Este cultivo puede considerarse como orgánico ya que se recomienda sembrarlas en bosques y su manejo no requiere utilización de productos químicos. La siembra se recomienda en bosques, latifoliadas junto a árboles que le servirán de sostén y tengan una arquitectura que facilite que los tallos trepen y los zarcillos se enrollen en ramas delgadas.

La cosecha bajo manejo puede llevarse a cabo a partir de siete años contados a partir del momento en que se produjeron las plantas de almácigo. La cosecha consiste en extraer los rizomas del suelo. Una forma que se plantea para no hacer una extracción destructiva es cosechar los rizomas secundarios, dejando el rizoma principal para mantener la planta madre. Para su cultivo se requiere suelo bien drenado, caliente a media sombra, abundante humedad y condiciones boscosas para la enredadera. La propagación puede hacerse por semillas, estacas de madera o divisiones del rizoma; El rizoma se colecta al final de las lluvias y se seca al sol.

2.8.5. Usos medicinales atribuidos

El cocimiento del rizoma es de uso medicinal en la región. Por vía oral para tratar anemia, afecciones gastrointestinales, hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores; tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eczema, liquen plano, tinea, psoriasis). Se le atribuye propiedad antirreumática, antiinflamatoria y diurética, está indicado su uso oral en el tratamiento de artritis reumatoidea, reumatismo crónico, lepra y disuria.

2.8.6. Otros usos populares

Las raíces de varias especies del género se han utilizado como colorantes de refrescos o como componentes de arreglos florales.

2.8.7. Farmacología experimental

En 1997 Oscar Castro, comprobó la actividad antihemorrágica de *Smilax* ya que la investigación demostró que los extractos crudos hidroalcohólicos derivados de una muestra de 400g de rizoma, anulaba el efecto hemorrágico provocado por una dosis controlada de veneno de terciopelo inyectado intradérmicamente en la piel del ratón. La decocción y extracto metabólico son activos contra *C. albicans*. La tintura es activa contra bacterias gramnegativo y grampositivo, pero inactiva contra *Vibrio cholerae* y causales de infecciones de la piel (*E.coli*). La decocción y extracto metabólico son activos contra *C. albicans*. La decocción es diurética en ratas comparable a hidroclorotiazida. La infusión no es espasmolítica, pero tiene actividad hepatoprotectora.

La decocción tiene cierta actividad inmunomoduladora en ratones medida por un aumento de la población de linfocitos y en los títulos de anticuerpos séricos. En un estudio realizado en Alemania con material de México, se encontró actividad antibacteriana (*Bacillus subtilis* 1,0 µg/disco, *Micrococcus luteus*, 10,0 µg/disco, *Escherichia coli*, 20 µg/disco).

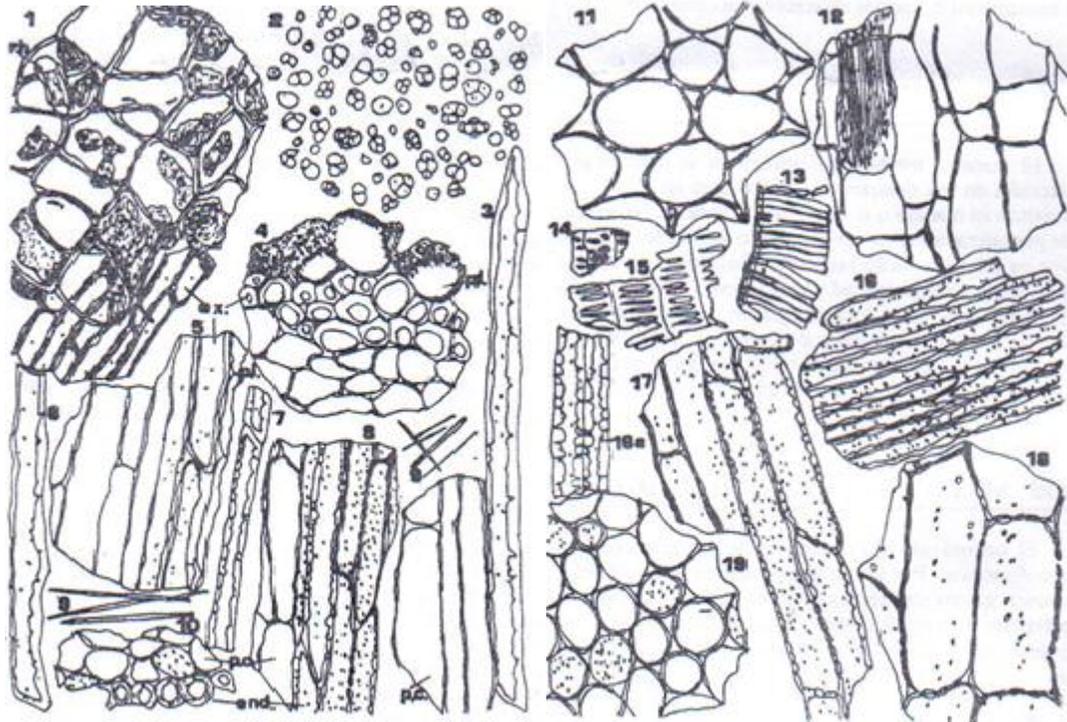
2.8.8. Farmacología clínica

Estudios clínicos con 50 Pacientes con vaginitis por *C. albicans* Demuestran que los óvulos de tintura se comportan en forma similar a Nystatina¹. En otro ensayo se probó una crema a base de tintura en trabajadores de dos industrias de alimentos con pie de atleta, se confirmó la infección dermatofítica demostró mejoría clínica similar a Tolnaftalato después de 15 días de tratamiento, aunque no se demostró negativización.

2.8.9. Composición química

El tamizaje fitoquímico indica la presencia de alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glucósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas 2. Se han aislado agliconas esteroidales (parillina, sarsasapogenina, smilagenina), beta-sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico

Figura 7. Composición química zarzaparrilla



- | | | | |
|---|--|---|--|
| (1) Capa pilifera | (2) Gránulos de almidón | (11) Parénquima de corteza en corte transverso | (12) Parénquima en corte longitudinal |
| (3) Células de exodermis | (4) Capa pilifera, exodermis y parénquima | (13) Parte de un vaso reticular engrosado | (14) Fragmento de un vaso punteado |
| (5) Capa pilosa, exodermis y vista longitudinal de la corteza | (6) Célula de exodermis | (15) Parte de un vaso escleriformemente engrosado | (16) Parte de un grupo de células fibrosas |
| (7) Vista longitudinal de células de endodermis | (8) Endodermis con parénquima asociado y células fibrosas | (17) Vista longitudinal del parénquima del xilema | (18) Vista longitudinal del parénquima |
| (9) Cristales aciculares de oxalato de calcio | (10) Endodermis y parénquima punteado en sección transversal | (19) Vista transversal del parénquima | |

Fuente: Armando Cáceres, Plantas de uso medicinal en Guatemala. p. 378.

2.8.10. Farmacognosia

La actividad antimicrobiana se le atribuye a las saponinas; la parillina es antimicótico y antitumoral 12. La sarsapogenina tiene actividad antiinflamatoria.

2.8.11. Toxicología

La decocción tiene una DL50 por vía oral en ratones mayor de 30 g/kg. La administración aguda del extracto no tiene efectos tóxicos en ratones; la crónica no produce ni síntomas, ni cambios sanguíneos sugestivos de toxicidad.

La DL50 del extracto de la parillina cristalizada en ratones es de 10 mg/kg administrada por vía intraperitoneal y 30 mg/kg por vía oral.

2.8.12. Indicaciones terapéuticas

Se usa por vía oral para el tratamiento de anemia, afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, inapetencia) hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis reumatismo, y tumores. La decocción se aplica tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eczema, liquen plano, tinea, psoriasis).

2.9. Descripción de Eucalipto

Nombre científico: *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae).

Figura 8. Ilustraciones Eucalipto



Fuente: Armando Cáceres, Plantas de uso medicinal en Guatemala. p. 171.

2.9.1. Descripción botánica

Es de 75 - 90 m de alto, corte azul-grisácea, se pela en cierta época del año. Hojas con capa cerosa blanca, cuando jóvenes son opuestas, oblongas, 7-15cm de largo; cuando adultas son alternas. Inflorescencia axilar, solitaria, botones sésiles, flores 3-4 cm de ancho, masa prominente de estambres. Fruto cónico, 2-3 cm de ancho, con orilla, numerosas semillas, 3 mm de largo.

2.9.2. Historia

Descubierto en Australia por Labillardiere a fines del siglo XVII; género con más de 500 especies las que poblan $\frac{3}{4}$ partes de este continente y tienen un gran significado en su cultura (Cáceres, 1996. 172).

Se cultivan en regiones secas donde se han introducido con fines de reforestación por su rápido crecimiento, excelente forma de fuste, resistencia a la sequía, buena calidad de madera y aceite esencial usado en la industria. Las primeras especies fueron introducidas en América a finales del siglo XVIII; se usa medicinalmente en Europa desde 1792.

2.9.3. Agricultura

Se adapta a múltiples suelos. Se propaga por semilla en semilleros con tierra, arena y ceniza, cubrir con tierra fina y mojar por gravedad o vapor, germinan de 4-14 días. Al tener 2-4 pares de hojas pasar a bolsas, dejar a la sombra 2-3 días y al sol 2-6 meses. La siembra definitiva se hace a pleno sol a distancia de 2-3 m; a los 3-4 años entresacar los árboles mal formados o hacer un corte a tala raza (15-20 cm del suelo) para permitir el rebrote. Las hojas adultas se colectan en cualquier época y se secan a la sombra.

El rendimiento en follaje y aceite varía según el clima y densidad de siembra, hay más rendimiento al sembrar con mayor densidad y hacer los cortes a mayor altura.

2.9.4. Usos medicinales atribuidos

El cocimiento, infusión e inhalación de hojas se usa para tratar afecciones respiratorias (asma, amigdalitis, bronquitis, faringitis, resfrío, tos, tuberculosis) y digestivas (diarrea, dispepsia), artritis, cistitis, diabetes, fiebre, estomatitis, malaria y reumatismo. En homeopatía se usa para bronquitis, resfrío, laringitis y reumatismo. Tópicamente se aplica a heridas, lepra, leucorrea, llagas, pústulas, quemaduras, úlceras, vaginitis, fibromas y tumores. Las hojas frescas se mastican para fortalecer las encías.

Se le atribuye propiedad anestésica, antiséptica, depurativa, digestiva, espasmolítica, estimulante, expectorante, febrífuga, hipoglicémica, insecticida, rubefaciente y vermífuga.

2.9.5. Otros usos populares

La madera es dura y pesada (densidad 0.7-1.1), arde en forma constante, se usa para hacer leña, carbón, postes, pulpa de papel y en carpintería. Las flores son melíferas, por lo que las visitan las abejas.

2.9.6. Farmacología experimental

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas de *E. globulus* se activa contra *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. pyogenes*; la decocción de hojas no tiene actividad antidermatofítica; el aceite esencial es activo contra *E. coli* y *S. aureus* y repelente de áfidos y mosquitos. De 12 especies del género, el aceite de *E. citrodora* demostró ser el más potente antimicrobiano (*A. niger*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*).

Estudios farmacológicos demuestran que la decocción de hojas de *E. globulus* es poco diurética en ratas. La esencia por vía oral en dosis de 1 g/kg tiene efecto relajante muscular, actividad anticonvulsiva, hipolipémica e hipotensiva en modelos animales. La infusión de hojas es hipoglicémica en ratones aloxanizados.

2.9.7. Farmacología clínica

Ensayos clínicos de Boué refieren disminución de la glucosa sanguínea 8 días después de administrar la infusión de hojas a una paciente diabética.

2.9.8. Composición química

Las hojas contienen aceite volátil (1-3%), ácidos elágico y gálico, taninos, principio amargo, cera y resinas. El aceite de *E. globulus* tiene cineol (70-90%), α -pineno (24%), aromadendreno (1%), borneol, canfeno, cariofileno, citral, eudesmol, felandreno, fenchona, mirceno, sabineno, terpineol, timol, alcoholes sesquiterpénicos, aldehídos (valeriano, butílico, caprónico), alcoholes (etílico, amílico, isoamílico) α - y β -tujona, verbenona, fenoles y terpenos.

El aceite de *E. citriodora* tiene citronelal (86-90), citronelol (4-6%), pulegol (0.7%), α -pineno (1%), canfeno (0.1%), β -pineno (1%), mirceno (0.6%), limoneno (0.47.1%), cineol (1-185), p-cimeno (0.3-0.9%), geraniol y citriodorol.

2.9.9. Farmacognosia

La materia médica son hojas secas y aceite esencial de *E. globulus*. Microscópicamente se observa una construcción equifacial, grandes orificios oleíferos, cicatrices de corcho compuestas por diez o más capas, células de la epidermis muy pequeñas pero con estomas grandes; presenta granos y cristales de oxalato de calcio. Las calcificaciones son raras, la más frecuente son hojas jóvenes que presentan a contraluz apariencia punteada muy marcada.

El aceite esencial es antiséptico respiratorio, antihelmíntico, balsámico, expectorante e hipoglicémico. La acción antibacteriana se atribuye a cineol y citriodorol. Se obtienen tres aceites por destilación con vapor: el aceite medicinal (*E. globulus*) con alto contenido de cineol y carácter alcanforáceo, el de perfumería (*E. citriodora*) con carácter cítrico por citronelal y el rico de felandreno o piperitona. (*E. dives*).

El aceite de *E. globulus* es incoloro, aroma característico, picante, densidad 0.906-0.915, rotación óptica +5° a -9°, índice de refracción 1.463-1.466, índice de saponificación 8.9-20, soluble 1:8 en etanol a 20°C, cineol 60-65%, punto de congelación 15.4 °C. Las hojas y el aceite de *E. globulus* son de uso oficial en varios países; existen múltiples formas galénicas como extractos, jarabes, tinturas y esencias.

El cineol (*eucaliptol*) [CAS470-82-6] es un aceite blanco, olor, alcanforado, monoterpeno neutro, peso molecular 154, densidad 0.921-0.923, ebulle a 176 °C, índice de refracción 1.456, insoluble en agua, soluble en alcohol, cloroformo, éter; es irritante, expectorante, antiséptico y antibiótico contra *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus*. El α -pineno es líquido, punto de ebullición 155°C, densidad 0.8592, índice de refracción 1.4664, insoluble en agua, soluble en alcohol, cloroformo. El l-felandreno es un aceite de peso molecular 136, ebulle a 171 °C, densidad 0.8410, índice de refracción 1.4709, rotación óptica -21.7 °, insoluble en agua soluble en éter.

El citronelal es líquido, peso molecular 154, ebulle a 47 °C, índice de refracción 1.4460, rotación óptica +11.5°, densidad 0.848-0.856, soluble en alcohol, es aromático y repelente. El citronelol es aceite, peso molecular 156, ebulle a 224, densidad 0.855, poco soluble en agua, soluble en alcohol. El citriodorol es un alcaloide básico, peso molecular 462, es un polvo café-amarillento, rotación óptica +12.5, con actividad contra *S. aureus* (CIM 25 mg/mL) y anti fúngica.

2.9.10. Toxicología

Altas dosis del aceite son irritantes producen convulsión, delirio, dificultad respiratoria, gastroenteritis y hematuria; se han informado de muerte o recuperación por ingestión de 4-24 mL; los síntomas son náusea, vómito, diarrea, mareo, debilidad, estupor, parálisis y muerte; las personas sensibles pueden desarrollar urticaria por manejo del follaje; esta contraindicado en el embarazo, lactancia y alergia respiratoria; es incompatible con sedantes y anestésicos. El aceite por vía subcutánea en ratonas gestantes (135 mg/kg) durante la organogénesis (6-15 días) no provoca embriotoxicidad ni fetotoxicidad.

2.9.11. Indicaciones terapéuticas

Por vía oral está indicado para tratar afecciones respiratorias y diabetes. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 2-3 g/taza de decocción; 0.5-1 g de polvos; 1-3 mL de tintura 1:8 en etanol al 35%; 200-300 mg de extracto seco; 20-30 gotas de extracto fluido; 10-30 gotas de jarabe al 10%; 3-9 gotas de esencia.

Tópicamente está indicado para tratar llagas y heridas. Se aplica en forma de fricciones para combatir el reumatismo y como inhalaciones y gargarismos con aceite o pomada para tratar afecciones respiratorias.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Definición operacional de las variables

3.1.1. Cantidad de materia prima

La cantidad de materia prima utilizada para cada tratamiento del experimento es la siguiente:

Tabla I. Cantidad de materia prima

Método de Obtención	Tintura	Disolvente	Masa de sólido por tratamiento (g)	Número de repeticiones	Masa de sólido total (g)
Percolación	1:10	30 % v/v	40	3	240
		50% v/v	40	3	240
		70% v/v	40	3	240
Percolación	1:15	30 % v/v	27	3	120
		50% v/v	27	3	120
		70% v/v	27	3	120
Percolación	1:20	30 % v/v	20	3	60
		50% v/v	20	3	60
		70% v/v	20	3	60
Maceración dinámica	1:10	30 % v/v	40	3	240
		50% v/v	40	3	240
		70% v/v	40	3	240
Maceración dinámica	1:15	30 % v/v	27	3	120
		50% v/v	27	3	120
		70% v/v	27	3	120
Maceración dinámica	1:20	30 % v/v	20	3	60
		50% v/v	20	3	60
		70% v/v	20	3	60

Fuente: datos experimentales.

3.1.2. Tamaño promedio de partícula

El rango de tamaño de partícula para cada planta es el siguiente:

Tabla II. **Tamaño promedio de partícula**

Parte de la planta	Tamaño de partícula (µm)
Rizoma de zarzaparrilla	600-425
Hoja de eucalipto	2000-600

Fuente: datos experimentales.

3.1.3. Tipo de disolvente

Se utiliza como disolvente extractor una solución hidro-alcohólica de alcohol etílico, a distintos porcentajes en volumen, siendo éstos: de 30%, 50% y 70% en volumen.

3.1.4. Cantidad de disolvente

Tabla III. Cantidad de disolvente total

Método de Obtención	Tintura	Disolvente	Volumen de disolvente por tratamiento (mL)	Número de repeticiones	Volumen de disolvente total (mL)
Percolación	1:10	30 % v/v	480	3	1,140
		50% v/v	480	3	1,140
		70% v/v	480	3	1,140
Percolación	1:15	30 % v/v	480	3	1,140
		50% v/v	480	3	1,140
		70% v/v	480	3	1,140
Percolación	1:20	30 % v/v	480	3	1,140
		50% v/v	480	3	1,140
		70% v/v	480	3	1,140
Maceración dinámica	1:10	30 % v/v	480	3	1,140
		50% v/v	480	3	1,140
		70% v/v	480	3	1,140
Maceración dinámica	1:15	30 % v/v	480	3	1,140
		50% v/v	480	3	1,140
		70% v/v	480	3	1,140
Maceración dinámica	1:20	30 % v/v	480	3	1,140
		50% v/v	480	3	1,140
		70% v/v	480	3	1,140

Fuente: datos experimentales.

Tabla IV. Volumen de disolvente total por especie

Disolvente	Método de obtención		Disolvente total (mL)
	Percolación (mL)	Maceración dinámica (mL)	
30 % v/v	4,320	4,320	8,640
50% v/v	4,320	4,320	8,640
70% v/v	4,320	4,320	8,640

Fuente: datos experimentales.

Tabla V. **Preparación de solución etanol-agua**

	Solución etanólica 70% v/v		Solución etanólica 50% v/v		Solución etanólica 30% v/v	
	Etanol (mL)	Agua (mL)	Etanol (L)	Agua (L)	Etanol (L)	Agua (L)
Tinturas zarzaparrilla	6,367	2,273	4,548	4,092	2,728	5,912
Tinturas eucalipto	6,367	2,273	4,548	4,092	2,728	5,912
Total (mL)	12,734	4,546	9,096	8,184	5,456	11,824
Total (L)	12.7	4.6	9.1	8.2	5.5	11.8

Fuente: datos experimentales.

3.1.5. Temperatura de sistema

La elaboración de las tinturas para cada tratamiento se realiza a temperatura ambiente. En la ciudad de Guatemala el rango de temperatura es de 21-26 °C.

3.1.6. Velocidad de agitación

La velocidad de agitación es constante y la misma para todos los tratamientos de maceración dinámica, de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla VI. **Velocidad de agitación**

Tintura	Agitación
Zarzaparrilla	400 rpm
Eucalipto	400 rpm

Fuente: datos experimentales.

3.1.7. Tiempo de maceración

El tiempo de maceración de cada planta es el mismo para todas las tinturas obtenidas:

Tabla VII. **Tiempo de maceración**

Tintura	Percolación	Maceración dinámica
Zarzaparrilla	26 horas	70 minutos
Eucalipto	26 horas	70 minutos

Fuente: datos experimentales.

3.2. Delimitación del campo de estudio

3.2.1. Universo de estudio

Se realiza el estudio para el rizoma de zarzaparrilla de la variedad *Smilax domingensis willd* y las hojas de eucalipto de la variedad *Ecucalyptus globulus labill.*

3.2.2. Selección y tamaño de muestra

La materia prima vegetal es adquirida en el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA. El rizoma de zarzaparrilla (*Smilax domingensis willd*) se obtuvo previamente molido en polvo fino, y posteriormente es tamizado a un tamaño de partícula de 600-425 μm . Las hojas de eucalipto se compran en la misma institución y se reduce su tamaño a un tamaño de partícula de 600 – 2000 μm .

Independiente del método de obtención el tamaño de las muestras es el siguiente:

Tabla VIII. **Tamaño de muestras de laboratorio**

Tintura	Materia prima (g)	Disolvente (mL)
1:10	40	400
1:15	27	400
1:20	20	400

Fuente: datos experimentales.

3.3. Recursos humanos disponibles

- Investigadora: Carmen María Navas Segura
- Asesora: Inga. Telma Maricela Cano Morales
- Coasesor: Ing. Mario José Mérida Meré
- Coasesor: Lic. Armando Cáceres Estrada

3.4. Recursos materiales disponibles

3.4.1 Materia prima

- Rizoma de Zarzaparilla (*Smilax Lundelli Willd*)
- Hojas de Eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*)
- Alcohol Etílico 99%
- Agua Destilada

3.4.2 Equipo

- Percoladores de acero inoxidable
- Reactor con agitador de paletas, nivel laboratorio
- Papel PH Merck
- Picnómetro de 1.027 mL
- Plancha de calentamiento con sistema de calentamiento de medio a fuerte
- Balanza digital marca *Sartorius*, precisión de 0.001g, percibe hasta 400 g
- Desecadora
- Horno Mufla marca *Thermolyne* 1400 Furnace, calienta hasta 1100°C
- Campana para medios de agar-planta

- Campana microbiológica
- Incinerador
- Asas de nicromo
- Autoclave
- Incubadora a 36°C
- Pipeta automática
- Refrigeradora
- Lámpara de luz UV
- Cámara de cromatografía capa fina

3.4.3 Cristalería

- Beakers con capacidad de 50,100, 250, 600 y 1000 mL
- Balones aforados de 500 y 1000 mL
- Probetas 100 y 250 mL
- Tubos de ensayo
- Embudo de vidrio
- Pinzas
- Crisoles
- Erlenmeyer de 100,250 y 1000 mL
- Varillas de agitación
- Tubos de tapón de rosca de 15 mL
- Atomizador de vidrio esmerilado

3.4.4 Materiales

- Cajas de Petri Simples y cuádruples
- Puntas amarillas de 200 µL

- Puntas azules de 1000 µL
- Plantilla para siembra
- Frascos de vidrio color ámbar 400 mL
- Placa sílica-gel

3.4.5 Reactivos

- *Agar Muller Hinton*
- *Agar tripticasa soya*
- *Caldo tripticasa soya*
- Cloruro de sodio
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido clorhídrico concentrado
- Magnesio metálico
- Hidróxido de sodio
- Ácido bórico en anhídrido acético
- Acetato de Etilo
- Ácido fórmico
- Ácido acético glacial
- Solución metabólica 1% de definelboriloxietilamina
- Solución etanólica 5% de polietilenglicol
- Control de saponinas 0.5%
- Cloroformo
- Metanol
- Agua destilada
- Reactivo de *Lieberman-Buchard*
- Reactivo de *Komarowsky*

3.5. Técnicas cualitativas y cuantitativas

3.5.1. Materia extraña

Es todo aquella materia que no es parte de la planta y que en el proceso de obtención de tinturas podría contaminar el producto final.

Procedimiento

- Tomar 500 g de muestra del rizoma de la Zorzaparrilla y 250 g de hoja de eucalipto secos y extenderlos en una superficie en donde se determinará;
 - Rizoma café oscuro de 5 cm de largo para la zorzaparrilla
 - Hojas oblongas de 7- 15 cm de largo
- Después de extraer de la muestra todo material que no cumpla con estos requerimientos se pesa y se determina el porcentaje de materia extraña en la muestra;
- Si el porcentaje de materia extraña determinado es menor a 1% se considera aprobada la materia prima y se procede a tamizar previamente eliminando del primer lote todo aquello que no cumpla.

3.5.2. Determinación de porcentaje de humedad

La humedad de una muestra no es sólo el contenido de agua, comprende también toda materia volátil que se elimina por calentamiento, conduciendo a pérdida de peso.

Entre estas sustancias se tienen: agua, grasas, aceites, alcoholes, disolventes, materias aromáticas, componentes volátiles y productos de descomposición. El exceso de agua en drogas vegetales es el responsable de la hidrólisis de sus constituyentes y del crecimiento de microorganismos. Con pocas excepciones, el contenido de agua en estas drogas debe variar entre 8 y 12%. En la balanza de humedad se deposita una muestra de 1 g, la balanza indica el porcentaje de humedad en la muestra.

3.5.3. Molienda y tamizado de la materia prima

El material previamente molido se hace pasar por una torre de tamices, con distinta secuencia según la planta tamizada, de la siguiente forma:

Tabla IX. **Tamices para Zorzaparrilla**

No. Tamiz	Tamaño de tamiz	Tamaño promedio de partícula
8	2.38 mm	2.38 mm
10	2 mm	2.19 mm
30	600µm	1.2 mm
40	425 µm	812.5 µm
50	300 µm	512.5 µm
80	180 µm	330 µm
Fondo	>180 µm	>180 µm

Fuente: datos experimentales.

Tabla X. **Tamices para Eucalipto**

No. Tamiz	Tamaño de tamiz	Tamaño promedio de partícula
8	2.38 mm	2.38 mm
10	2 mm	2.19 mm
30	600µm	1.2 mm
45	354 µm	477 µm
50	300 µm	327 µm
80	180 µm	330 µm
Fondo	>180 µm	>180 µm

Fuente: datos experimentales.

3.5.4. Determinación del tiempo de maceración dinámica

Realizar ensayos de obtención de tinturas para cada planta con las siguientes combinaciones:

Tabla XI. **Ensayo tiempo de maceración dinámica**

Tiempo	Tintura 1:10		
	30%	50%	70%
1			
2			
3			

Fuente: datos experimentales.

Cada 30 minutos tomar una alícuota de 4 mL de cada tintura y medir el índice de refracción, hasta que éste sea constante. Se utiliza este parámetro de control puesto que el índice de refracción es directamente proporcional a la concentración de soluto.

3.5.5. Preparación de tinturas por maceración dinámica

Procedimiento

- Utilizar las tablas de Cantidad de Materia Prima y Cantidad de Solvente de la sección de metodología, Tabla I .y III. respectivamente;
- Humedecer la materia prima con disolvente. Se coloca la materia humedecida en el fondo del reactor. Verter la cantidad de solvente restante y se cerrar el reactor;
- Mantener la agitación constante a 400 RPM durante el tiempo encontrado para cada planta;
- Detener la agitación y filtrar la tintura de la materia exhausta;
- Almacenar la tintura en frasco de vidrio color ámbar y refrigerar.

3.5.6. Preparación de tinturas por percolación

En pequeña escala se realiza en percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior para regular el flujo de disolvente.

Procedimiento

- En un percolador limpio y seco, colocar algodón en la parte inferior y papel filtro de acuerdo al diámetro. Pesar la cantidad de material de acuerdo al tamaño del percolador, humedecerlo con el disolvente en un vaso de precipitar, transferir al percolador y agregar disolvente hasta cubrirlo;
- Dejar reposar 24 horas, abrir la llave inferior y gotear a una velocidad adecuada;
- Recoger el líquido, añadir suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen agregado al inicio y dejar reposar durante 2 horas más;
- El material sólido que ha quedado, se presiona y este líquido se añade la tintura obtenida anteriormente.

3.5.7. Sólidos extraíbles

Consiste en desecar en un horno, una muestra de extracto durante un tiempo determinado y enfriar en un desecador.

Procedimiento

- En una cápsula de fondo plano de 50 mm de diámetro y 30 mm de altura, introducir 25 mL del extracto a examinar;
- Evaporar hasta sequedad sobre un baño de agua y secar en un horno a 105°C durante 2 horas;
- Enfriar en un desecador sobre gel de sílice anhídrido R y pesar.

3.5.8. Determinación de densidad

La densidad relativa es la relación entre la masa de un determinado volumen a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. La densidad y el peso específico se encuentran entre los caracteres físicos más utilizados para el ensayo de drogas.

Procedimiento

- Tarar el picnómetro limpio y seco;
- Llevar el picnómetro hasta el borde con la solución y colocar el termómetro tapadera, se producirá un pequeño rebalse por el canal lateral; colocar la tapadera del canal lateral;
- Secar perfectamente y tarar en una balanza analítica.

3.5.9. Determinación de pH

El pH es un valor que representa convencionalmente la concentración de iones hidrógeno de una disolución acuosa. Por razones prácticas se define una manera experimental.

Procedimiento

- Introducir el extremo inferior en la alícuota de la tintura y retirar después de 1 minuto;
- Comparar la combinación de las marcas con el patrón.

3.5.10. Determinación de color

Se coloca una muestra de la planta en un vidrio de reloj haciendo uso del estereoscopio se determina el color. El color se basara en el *Pantone® Color Formula Guide* 1000 SICPA.

3.5.11. Determinación cualitativa de saponinas

3.5.11.1. Ensayo macro

- **Prueba de espuma**
 - Tubo 1: 0.25 mg de extracto
 - Tubo 2: 2 mL de control de saponinas (0.5%)
 - Tubo 3: 2 mL de agua

A cada tubo se le adiciona 10 mL de agua destilada. Calentar en baño maría (60 °C) durante 30 min. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 seg. Dejar reposar los tubos durante 30 min, observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 min, se presume la presencia de saponinas.

- **Ensayo semimicro: cromatografía en capa fina**

Cromatografía en capa fina: Aplicar 10 μ L de tintura etanólica en un cromatoplaque de silicagel 60 F_{254} . Aplicar 10 μ L de estándares de saponinas: Ergosterol, β -sitafesol, saponinas en metanol 0.5% y saponinas 0.1%.

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

Detección: reactivo de *Liebermann-Buchard*: UV-365 zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides

Reactivo de *Komarowski*: zonas azules, amarillas y rojas

3.5.12. Determinación cualitativa de flavonoides

- **Ensayo macro**

Agregar 1 mL de tintura a cada tubo

- Tubo 1: agregar 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado
- Tubo 2: agregar 3 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 min
- Tubo4: agregar magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado
- Tubo 5: agregar 10 gotas de NaOH
- Tubo 6: testigo

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

- **Ensayo semimicro: cromatografía en capa fina**

Cromatografía en capa fina: Aplicar 10 µL de cada muestra en una cromatoplaaca de silicagel 60 F254; como estándar emplear 10µ de Kaenperol, rutina, ácido clorogénico y ácido caféico.

Fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50)

Detección: sin tratamiento químico: UV 254 nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescente amarillo, azul o verde. Reactivo de productos naturales (NP/PEG) Fluorescencia intensiva en UV-365 nm.

Solución 1: solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP)

Solución 2: solución etanólica al 5% de polietilenglicol 40000 (PEG)

3.5.13. Determinación de taninos

Los taninos son sustancias, de alto peso molecular, es un complejo polímero de ácidos fenólicos y algunos además contienen azúcares.

Adicionar 3 mL de tintura a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: testigo
 - Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1% (p/v)
 - Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10%)
 - Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v)
-
- Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración;
 - Con cloruro férrico: grisáceo-negro catecol; negro-azulado: pirogalol.

3.5.14. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

Las bacterias son organismos de vida libre que tienen curvas de crecimiento máximo de 24 a 48 horas en medios artificiales específicamente diseñados. El tamizaje de la actividad antibacteriana consiste en poner de manifiesto la inhibición del crecimiento de una bacteria determinada en condiciones estándar con una concentración previamente determinada como punto de corte (500 – 1000 mg/mL) de un extracto, fracción o compuesto obtenidos de una droga vegetal.

3.5.14.1. Resiembra

Los microorganismos a utilizar para tamizaje son los siguientes:

- *Bacillus cereus* ATCC 14579
 - *Escherichia coli* ATCC 25922
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - *Salmonella typhi* ATCC 14028
- Para cada microorganismo se preparan dos cajas de agar Trypticase Soya con 20 mL cada una. Calcular el volumen para cuatro microorganismos;

$$4 \text{ m. o.} * 2 \text{ cajas} * \frac{20 \text{ ml}}{\text{caja}} = 160 \text{ mL}$$

- Para el agar TS la relación es 40 g por cada litro de agua, para 150 mL;

$$0.15 \text{ L} * \frac{40 \text{ g}}{1 \text{ L}} = 6.4 \text{ g de agar TS}$$

- Pesar 6.4 g de agar TS y se colocar en un earlenmeyer de 500 mL, a continuación verter los 150 mL de agua y colocar un agitador magnético en el fondo para mezclar homogéneamente. Colocar sobre una plancha para activar el agitador magnético y calentar la mezcla. La mezcla se calienta hasta aclararse, puesto que al inició presenta turbidez.

3.5.14.2. Ensayo

- Por cada extracto realizar dos tubos con 3 mL de agar Mueller Hinton, seguir los cálculos;

$$2 \text{ tubos} * 9 \text{ mL} * 6 \text{ extractos} = 108 \text{ mL MH} \approx 120 \text{ mL MH}$$

- Para el agar MH la relación es de 34 g por cada litro de agua, para 40 mL;

$$0.12 \text{ L} * \frac{34 \text{ g}}{1 \text{ L}} = 4.08 \text{ g de agar MH}$$

- Seguir el mismo procedimiento que con el agar TS. Al tener la solución aclarada se vierte en cada tubo de ensayo con tapón;
- Por cada microorganismo realizar lo siguiente dos tubos con 5 mL de caldo TS;

$$2 \text{ tubos} * 5 \text{ mL caldo TS} * 4 \text{ m. o.} = 40 \text{ mL} \approx 40 \text{ mL}$$

$$0.04 \text{ L} * \frac{30 \text{ g}}{1 \text{ L}} = 1.2 \text{ g caldo TS}$$

- Seguir el mismo procedimiento, excepto en la agitación y el calor. Puesto que el caldo es mas soluble en agua que el agar;

- Verter la mezcla en los tubos de ensayo midiendo con pipeta automática y utilizando puntas desechables y esterilizadas;
- Dos tubos con 4.95 mL de solución salina al 0.85%;

$$2 \text{ tubos} * 4.95 \text{ mL solución salina} * 4 \text{ m. o.} = 39.6 \text{ mL} \approx 40 \text{ mL}$$

$$40 \text{ mL} * \frac{0.85 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = 0.34 \text{ g NaCl}$$

- Medir con pipeta automática el volumen requerido y depositar en los tubos con tapón;
- Esterilizar las soluciones en autoclave a 15 psi, 121 °C durante 15 minutos.

3.5.14.3. Preparación de cajas con agar TS

Esterilizar la campana para medios. Verter agar TS en cada caja de petri y distribuir uniformemente en la caja con movimientos circulares. Dejar solidificar dentro de la campana. Incubar a 36 °C durante 24 horas.

3.5.14.4 Filtración de extractos

Utilizar jeringa de 10 mL debidamente esterilizada, succionar un volumen de tintura y pasar a través de un filtro para microorganismos.

3.5.14.5 Preparación de agar-planta

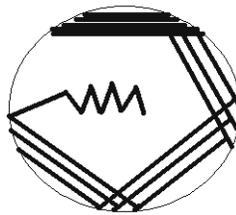
- En caja de petri simple agregar 1 mL de solución de cada extracto y a continuación los 9 mL de agar MH. Homogenizar con ocho movimientos circulares en cada sentido;

- Incubar a 36 °C por 24 horas, para comprobar la esterilidad. Pasado el tiempo de incubación se almacenan en bolsas en refrigeración.

3.5.14.6 Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en una caja de petri con agar tripticasa soya, incubar a 36 °C durante 24 h;
- Con el siguiente patrón;

Figura 9. **Patrón de estriado**



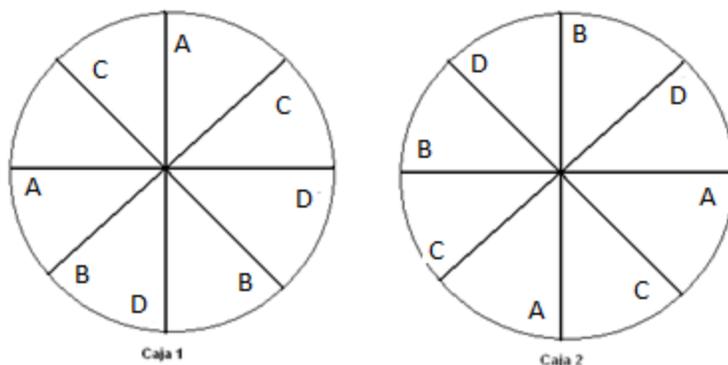
Fuente: datos experimentales.

- Llenar el aro del aza con microorganismo y depositar en tubos con 5 mL de tripticasa soya. Incubar a 36°C durante 24 horas;
- En campana bacteriológica con flujo laminar debidamente esterilizada diluir 0.05 mL de la suspensión microorganismo-caldo tripticasa soya en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85 %.

3.5.14.7 Demostración de la actividad antibacteriana

Inocular en el agar-planta una asada del microorganismo siguiendo el patrón de la plantilla con 15 siembras.

Figura 10. **Cajas cuadrilate con inoculación**



Fuente: datos experimentales.

Tabla XII. **Distribución de microorganismos en cajas de bioensayo**

Microorganismo	Caja 1	Caja 2
A <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	3 y 7	3 y 5
B <i>Salmonella typhi</i> ATCC 25923	4 y 6	4 y 7
C <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1 y 8	1 y 6
D <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2 y 5	2 y 8

Fuente: datos experimentales.

Incubar a 36 °C durante 24 horas.

3.5.14.8 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

3.5.15. Concentración mínima inhibitoria (CIM)

Consiste en la cuantificación de la concentración mínima de un extracto, fracción o compuesto (originado de una droga vegetal) que previene el crecimiento visible de microorganismos, es decir, que ha demostrado su actividad en una prueba de tamizaje previo. Para su realización se emplean diluciones seriadas del extracto y concentraciones constantes del microorganismo y se evalúa el crecimiento del microorganismo en un ensayo estandarizado similar al que sirvió de tamizaje.

3.5.15.1. Preparación de agar planta

- Preparar tubos con agar *Muller Hinton*, con la siguiente distribución;

Tabla XIII. Distribución de agar *Muller Hinton*

Contenido (mL de agar <i>Muller Hinton</i>)	Cantidad de Tubos
3.6	6
3.8	6
3.9	6
4	6

Fuente: datos experimentales.

- Preparar tres tubos con 5 mL de caldo tripticasa soya y tres tubos con 4.95 mL de solución salina al 0.85%. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Enfriar los tubos con agar *Muller Hinton* a 50 °C y agregar la solución del extracto disuelto en una caja cuadriplate de la siguiente manera;

Tabla XIV. **Distribución en caja cuadrilate**

Clave	Agar MH (mL)	Solución extracto (1:8) (mL)	Total (mg/mL)
1	3.6	0.4	1
0.5	3.8	0.2	0.5
0.25	3.9	0.1	0.25
C	4	0	0

Fuente: datos experimentales.

- Incubar a 36 °C por 24 horas, para comprobar la esterilidad. Terminado el tiempo de incubación refrigerar hasta su uso.

3.5.15.2. Preparación del inóculo

- Inocular una asada de cultivo puro microbiano (de cada microorganismo) en un tubo de 5 mL de caldo tripticasa soya incubar a 36 °C durante 24 horas;
- Después del tiempo de incubación de cada tubo de caldo tripticasa soya diluir 0.05 mL (50 µL) de la suspensión en 4.95 mL de agua solución salina estéril.

3.5.15.3. Demostración de la concentración inhibitoria mínima

Inocular tres estrías en cada cuadrante de la caja, dejar reposar durante 5 a 10 minutos e incubar a 36 °C por 24 horas.

3.5.15.4. 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 microorganismo fuera de la inoculación

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

El procedimiento experimental se realiza según la secuencia especificada en el cronograma, los datos de cada prueba se registran en el mismo orden. Respecto a su recolección, se diseñan registros en forma de tablas según cada prueba.

3.6.1. Materia extraña

Tabla XV. Datos originales materia extraña

	Rizoma de Zorzaparrilla			Hoja de Eucalipto		
Masa de muestra (g)	500	500	500	250	250	250
Masa de materia extraña (g)	2	2.5	4	0.5	0.9	1.2

Fuente: datos experimentales.

3.6.2. Determinación de porcentaje de humedad

Tabla XVI. Datos originales determinación de porcentaje de humedad

	Rizoma de Zorzaparrilla			Hoja de Eucalipto		
Masa de muestra (g)	1.000	1.001	1.004	1.001	1.003	1.001
% humedad	6.1	6.3	6.4	5.8	6.0	5.9

Fuente: datos experimentales.

3.6.3. Determinación del tiempo de maceración dinámica

Tabla XVII. Datos originales índice de refracción y tiempo de maceración dinámica de tinturas de zarzaparrilla

	Tiempo (min)								
ID MUESTRA	5	10	15	20	25	30	35	40	45
1:10, 30%	1.33	1.34	1.38	1.46	1.53	1.59	1.6	1.68	1.75
1:10, 50%	1.34	1.43	1.48	1.51	1.6	1.68	1.76	1.79	1.8
1:10, 70%	1.37	1.45	1.52	1.59	1.67	1.74	1.8	1.83	1.85
1:15, 30%	1.32	1.35	1.36	1.44	1.49	1.6	1.62	1.67	1.73
1:15, 50%	1.34	1.42	1.47	1.53	1.61	1.69	1.74	1.81	1.83
1:15, 70%	1.36	1.43	1.54	1.58	1.65	1.78	1.8	1.84	1.85
1:20, 30%	1.33	1.35	1.38	1.45	1.51	1.58	1.62	1.69	1.72
1:20, 50%	1.34	1.45	1.47	1.52	1.62	1.7	1.77	1.8	1.81
1:20, 70%	1.36	1.44	1.57	1.6	1.64	1.77	1.81	1.82	1.83
	Tiempo (min)								
ID MUESTRA	50	55	60	70	75	80	85	90	50
1:10, 30%	1.82	1.86	1.89	1.9	1.91	1.9	1.9	1.9	1.82
1:10, 50%	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.89
1:10, 70%	1.88	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.88
1:15, 30%	1.79	1.88	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.79
1:15, 50%	1.88	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.88
1:15, 70%	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.89
1:20, 30%	1.8	1.87	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.8
1:20, 50%	1.88	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.88
1:20, 70%	1.85	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.85

Fuente: datos experimentales.

Tabla XVIII. **Datos originales índice de refracción y tiempo de maceración dinámica de tinturas de eucalipto**

	Tiempo (min)								
ID muestra	5	10	15	20	25	30	35	40	45
1:10, 30%	1.31	1.31	1.31	1.33	1.35	1.36	1.36	1.37	1.38
1:10, 50%	1.32	1.32	1.33	1.34	1.34	1.35	1.36	1.38	1.39
1:10, 70%	1.35	1.35	1.37	1.37	1.38	1.39	1.4	1.4	1.42
1:15, 30%	1.31	1.31	1.32	1.33	1.34	1.35	1.37	1.37	1.39
1:15, 50%	1.31	1.32	1.32	1.33	1.35	1.36	1.37	1.37	1.38
1:15, 70%	1.36	1.36	1.36	1.36	1.38	1.39	1.39	1.41	1.43
1:20, 30%	1.31	1.32	1.32	1.33	1.34	1.35	1.35	1.37	1.38
1:20, 50%	1.31	1.31	1.31	1.34	1.36	1.36	1.36	1.37	1.39
1:20, 70%	1.36	1.37	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.41
	Tiempo (min)								
ID muestra	50	55	60	70	75	80	85	90	50
1:10, 30%	1.4	1.43	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.4
1:10, 50%	1.41	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.41
1:10, 70%	1.43	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.43
1:15, 30%	1.41	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.41
1:15, 50%	1.43	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.43
1:15, 70%	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.44
1:20, 30%	1.41	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.41
1:20, 50%	1.42	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.42
1:20, 70%	1.42	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.42

Fuente: datos experimentales.

3.6.4. Sólidos extraíbles

Tabla XIX. Datos originales sólidos extraíbles: zarzaparrilla por maceración dinámica

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.5466	42.5405	42.5437	42.7896	42.8231	42.8245	42.5813	42.5901	42.5778
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.6123	42.6286	42.6299	42.9053	42.9012	42.8996	42.6397	42.6411	42.6523
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.596	9.6153	9.6492	9.5385	9.6642	9.6521	9.6703	9.4972	9.4512
Masa crisol (g)	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.5976	42.6012	42.6027	42.8612	42.8652	42.8635	42.6274	42.6204	42.6196

Fuente: datos experimentales.

Tabla XX. **Datos originales sólidos extraíbles: zarzaparrilla por percolación**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.5734	42.5689	42.57	42.6214	42.6276	42.6201	42.5576	42.5607	42.5611
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.5772	42.5815	42.5744	42.8578	42.8634	42.8617	42.5956	42.6021	42.5978
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.596	9.6153	9.6492	9.5385	9.6642	9.6521	9.6703	9.4972	9.4512
Masa crisol (g)	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.5659	42.5667	42.5703	42.7143	42.7252	42.7214	42.5967	42.6026	42.5962

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXI. **Datos originales sólidos extraíbles: eucalipto por maceración dinámica**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.8134	42.8216	42.8042	43.1341	43.0946	43.1005	42.9683	42.9743	42.9726
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.8845	42.8964	42.8873	43.2451	43.2139	43.2368	42.9894	42.9903	42.9914
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.596	9.6153	9.6492	9.5385	9.6642	9.6521	9.6703	9.4972	9.4512
Masa crisol (g)	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278
Masa crisol más sólidos depositados (g)	43	42.7916	42.8008	43.0915	43.1005	43.1019	42.9594	42.9499	42.9509

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXII. **Datos originales sólidos extraíbles: eucalipto por percolación**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.6194	42.6087	42.6207	42.7643	42.7893	42.7945	42.6685	42.6711	42.6697
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.4563	9.5698	9.6743	9.5543	9.5472	9.2547	9.1578	9.2045	9.3567
Masa crisol (g)	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427	42.427
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.7665	42.7549	42.7529	42.8154	42.8173	42.814	42.6954	42.6972	42.6939
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa de muestra (g)	9.596	9.6153	9.6492	9.5385	9.6642	9.6521	9.6703	9.4972	9.4512
Masa crisol (g)	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278	42.4278
Masa crisol más sólidos depositados (g)	42.7113	42.702	42.6931	42.7934	42.7843	42.7851	42.6741	42.6803	42.6765

Fuente: datos experimentales.

3.6.5. Determinación de densidad

Tabla XXIII. Datos originales densidad: zarzaparrilla por maceración dinámica

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2341	5.234	5.2344	5.2114	5.2099	5.2101	5.1883	5.2049	5.201
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2501	5.2489	5.2504	5.2017	5.204	5.2028	5.1812	5.1833	5.182
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2311	5.2314	5.2315	5.1977	5.2112	5.1994	5.1825	5.1823	5.1824

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXIV. **Datos originales densidad: zarzaparrilla por percolación**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2408	5.2415	5.2421	5.2044	5.2043	5.2041	5.1731	5.1728	5.173
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2286	5.2286	5.2288	5.1864	5.1865	5.1862	5.1523	5.152	5.1526
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2213	5.2217	5.2216	5.2046	5.2048	5.2051	5.1841	5.1843	5.1844

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXV. **Datos originales densidad: eucalipto por maceración dinámica**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2015	5.2027	5.2019	5.1768	5.1732	5.1799	5.1579	5.1487	5.159
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2321	5.2341	5.2451	5.2527	5.2514	5.2489	5.2433	5.2435	5.2431
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2329	5.2331	5.2267	5.2511	5.2516	5.2522	5.2397	5.2411	5.2428

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXVI. **Datos originales densidad: eucalipto por percolación**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.1896	5.1883	5.189	5.1527	5.1526	5.1527	5.1339	5.133	5.1336
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2019	5.2015	5.2018	5.2375	5.237	5.2369	5.2221	5.222	5.2224
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Volumen del picnómetro (mL)	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027	1.027
Masa picnómetro (g)	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813	4.2813
Masa picnómetro más tintura	5.2137	5.2134	5.2133	5.2325	5.2327	5.2331	5.1216	5.1268	5.1287

Fuente: datos experimentales.

3.6.6. Determinación de pH

Tabla XXVII. Datos originales pH: zarzaparrilla por maceración dinámica

Tintura	1:10									1:15									1:20											
Concentración del solvente	30%			50%			70%			30%			50%			70%			30%			50%			70%					
pH	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXVIII. Datos originales pH: zarzaparrilla por percolación

Tintura	1:10									1:15									1:20											
Concentración del solvente	30%			50%			70%			30%			50%			70%			30%			50%			70%					
pH	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXIX. Datos originales pH: eucalipto por maceración dinámica

Tintura	1:10									1:15									1:20											
Concentración del solvente	30%			50%			70%			30%			50%			70%			30%			50%			70%					
pH	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXX. **Datos originales pH: eucalipto por percolación**

Tintura	1:10									1:15									1:20											
Concentración del solvente	30%			50%			70%			30%			50%			70%			30%			50%			70%					
pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Fuente: datos experimentales.

3.6.7. Determinación de color

Tabla XXXI. **Datos originales de color**

ID Muestra	Código de color			
	Zarzaparrilla método dinámico	Zarzaparrilla método estático	Eucalipto método dinámico	Eucalipto método estático
1:10, 30%	PMS 724	PMS 724	PMS 376	PMS 376
1:10, 50%	PMS 724	PMS 724	PMS 376	PMS 376
1:10, 70%	PMS 724	PMS 724	PMS 376	PMS 376
1:15, 30%	PMS 732	PMS 732	PMS 384	PMS 384
1:15, 50%	PMS 732	PMS 732	PMS 384	PMS 384
1:15, 70%	PMS 732	PMS 732	PMS 384	PMS 384
1:20, 30%	PMS 725	PMS 725	PMS 378	PMS 371
1:20, 50%	PMS 725	PMS 725	PMS 378	PMS 371
1:20, 70%	PMS 725	PMS 725	PMS 371	PMS 371

Fuente: datos experimentales.

3.6.8. Determinación de saponinas

- Ensayo macro

Tabla XXXII. Datos originales ensayo macro saponinas

ID muestra	Tubo 1 (muestra)			Tubo 2 (control)	Tubo 3 (agua)
	R_1	R_2	R_3	R_1	R_1
E1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
E2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Z1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Z2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Fuente: datos experimentales.

- Ensayo semimicro

Tabla XXXIII. Datos originales ensayo semimicro saponinas

ID muestra	Altura (cm)			Altura Disolvente (cm)		
	R_1	R_2	R_3	R_1	R_2	R_3
E1	0.4	0.6	0.6	7.5	7.5	7.5
E2	1.6	1.5	1.6	7.5	7.5	7.5
Z1	1.2	1.2	1.3	7.5	7.5	7.5
Z2	2	2.1	2.1	7.5	7.5	7.5

Fuente: datos experimentales.

3.6.9. Determinación de flavonoides

- Ensayo macro

Tabla XXXIV. **Datos originales ensayo macro flavonoides**

	E1	E2	Z1	Z2
Tubo 1	Turbidez en el fondo	Turbidez	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 2	Coloración verde oscura	Coloración negra	Coloración negra	Coloración negra
Tubo 3	Precipitado café	Precipitado café	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 4	Turbidez	Turbidez	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 5	Precipitado café	Precipitado café	Coloración rojiza	Coloración rojiza
Tubo 6	Coloración verde	Coloración verde	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 7	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio

Fuente: datos experimentales.

- Ensayo semimicro

Tabla XXX. **Datos originales ensayo semimicro flavonoides**

ID muestra	Altura (cm)			Altura disolvente (cm)		
	R₁	R₂	R₃	R₁	R₂	R₃
E1	6.5, 4.4, 3, 2.6, 0.1	6.5, 4.4, 3, 2.6, 0.1	6.5, 4.4, 3, 2.6, 0.1	7.5	7.5	7.5
E2	6.5, 4.4, 3, 2, 0.1	6.5, 4.4, 3, 2, 0.1	6.5, 4.4, 3, 2, 0.1	7.5	7.5	7.5
Z1	3.1, 0.1	3.1, 0.1	3.1, 0.1	7.5	7.5	7.5
Z2	3.5	3.5	3.5	7.5	7.5	7.5

Fuente: datos experimentales.

3.6.10. Determinación de taninos

- Ensayo macro

Tabla XXXVI. Datos originales ensayo macro taninos

	E1	E2	Z1	Z2
Tubo 1	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Tubo 2	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Tubo 3	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
Tubo 4	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio

Fuente: datos experimentales.

3.6.11. Actividad biocida *in vitro*

Los resultados obtenidos por este ensayo son cualitativos, un símbolo positivo (+) indica la inhibición del microorganismo, mientras que un símbolo negativo (-) indica que no hay inhibición del microorganismo.

Tabla XXXVII. Datos originales bioensayo

ID muestra	Microorganismo			
	A	B	C	D
E1	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
E2	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Z1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Z2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos experimentales.

3.6.12. Concentración mínima inhibitoria

Tabla XXXVIII. Datos originales CIM: muestra E1

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 mg/mL	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
0.5 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos experimentales.

Tabla XXXIX. Datos originales CIM: muestra E2

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 mg/mL	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
0.5 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos experimentales.

Tabla XL. Datos originales CIM: muestra Z1

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.5 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos experimentales.

Tabla XLI. Datos originales CIM: muestra Z2

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 ^{mg} / _{mL}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.5 ^{mg} / _{mL}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 ^{mg} / _{mL}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos experimentales.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

3.7.1. Materia extraña

Tabla XLII. Datos calculados: materia extraña

Porcentaje materia extraña (%)	Rizoma de Zarzaparrilla			Hoja de Eucalipto		
	0.4	0.5	0.8	0.2	0.36	0.48
Promedio materia extraña (%)	0.567			0.347		

Fuente: muestra de cálculo.

3.7.2. Determinación de porcentaje de humedad

Tabla XLIII. Datos calculados: porcentaje de humedad

Promedio % humedad	Rizoma de Zarzaparrilla	Hoja de Eucalipto
	6.267	5.9

Fuente: muestra de cálculo.

3.7.3. Sólidos extraíbles

Tabla XLIV. Datos calculados: sólidos extraíbles zarzaparrilla por maceración dinámica

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.1188	0.1127	0.1159	0.3618	0.3953	0.3967	0.1535	0.1623	0.15
Sólidos extraíbles (%)	1.273	1.207	1.237	3.931	4.248	4.149	1.704	1.779	1.627
Promedio sólidos extraíbles (%)	1.239			4.109			1.703		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.1845	0.2008	0.2021	0.4775	0.4734	0.4718	0.2119	0.2133	0.2245
Sólidos extraíbles (%)	1.951	2.098	2.089	4.997	4.958	5.097	2.313	2.317	2.399
Promedio sólidos extraíbles (%)	2.046			5.018			2.343		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.1698	0.1734	0.1749	0.2865	0.2974	0.2936	0.1689	0.1748	0.1684
Sólidos extraíbles (%)	1.769	1.803	1.812	3.003	3.077	3.041	1.746	1.840	1.781
Promedio sólidos extraíbles (%)	1.795			3.040			1.789		

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla XLV. **Datos calculados: sólidos extraíbles zarzaparrilla por percolación**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.1456	0.1411	0.1422	0.1936	0.1998	0.1923	0.1298	0.1329	0.1333
Sólidos extraíbles (%)	1.588	1.538	1.551	2.088	2.147	2.064	1.422	1.449	1.457
Promedio sólidos extraíbles (%)	1.559			2.099			1.443		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.1494	0.1537	0.1466	0.43	0.4356	0.4339	0.1678	0.1743	0.17
Sólidos extraíbles (%)	1.561	1.605	1.529	4.461	4.517	4.501	1.810	1.876	1.836
Promedio sólidos extraíbles (%)	1.565			4.493			1.841		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.1381	0.1389	0.1425	0.3134	0.3174	0.3157	0.1896	0.1826	0.1818
Sólidos extraíbles (%)	1.439	1.444	1.476	3.285	3.284	3.270	1.960	1.922	1.923
Promedio sólidos extraíbles (%)	1.453			3.280			1.935		

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla XLVI. **Datos calculados: sólidos extraíbles eucalipto por maceración dinámica**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.3856	0.3938	0.3764	0.7063	0.6668	0.6727	0.5405	0.5465	0.5448
Sólidos extraíbles (%)	3.641	3.729	3.585	6.638	6.296	6.362	5.107	5.155	5.166
Promedio sólidos extraíbles (%)	3.653			6.432			5.143		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.4567	0.4686	0.4595	0.8173	0.7861	0.809	0.5616	0.5625	0.5636
Sólidos extraíbles (%)	4.326	4.437	4.352	7.735	7.434	7.665	5.317	5.328	5.334
Promedio sólidos extraíbles (%)	4.372			7.612			5.326		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.5722	0.3638	0.373	0.6637	0.6727	0.6741	0.5316	0.5221	0.5231
Sólidos extraíbles (%)	5.473	3.476	3.563	6.353	6.437	6.447	5.085	4.989	4.999
Promedio sólidos extraíbles (%)	4.171			6.412			5.024		

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla XLVII. Datos calculados: sólidos extraíbles eucalipto por percolación

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.1916	0.1809	0.1929	0.3365	0.3615	0.3667	0.2407	0.2433	0.2419
Sólidos extraíbles (%)	1.825	1.722	1.838	3.200	3.436	3.488	2.292	2.316	2.301
Promedio sólidos extraíbles (%)	1.795			3.375			2.303		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.3387	0.3271	0.3251	0.3876	0.3895	0.3862	0.2676	0.2694	0.2661
Sólidos extraíbles (%)	3.224	3.115	3.092	3.692	3.702	3.675	2.543	2.564	2.533
Promedio sólidos extraíbles (%)	3.144			3.690			2.547		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
M_{ST} (g)	0.2835	0.2742	0.2653	0.3656	0.3565	0.3573	0.2463	0.2525	0.2487
Sólidos extraíbles (%)	2.711	2.621	2.536	3.495	3.407	3.415	2.354	2.414	2.378
Promedio sólidos extraíbles (%)	2.623			3.439			2.382		

Fuente: muestra de cálculo.

3.7.4. Determinación de densidad

Tabla XLVIII. Datos calculados: densidad zarzaparrilla por maceración dinámica

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9595	0.9602	0.9608	0.9231	0.923	0.9228	0.8918	0.8915	0.8917
ρ_i (g/mL)	0.934	0.934	0.935	0.898	0.898	0.898	0.868	0.868	0.868
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.934			0.898			0.868		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9473	0.9473	0.9475	0.9051	0.9052	0.9049	0.871	0.8707	0.8713
ρ_i (g/mL)	0.922	0.922	0.922	0.881	0.881	0.881	0.848	0.847	0.848
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.922			0.881			0.848		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.94	0.9404	0.9403	0.9233	0.9235	0.9238	0.9028	0.903	0.9031
ρ_i (g/mL)	0.915	0.915	0.915	0.899	0.899	0.899	0.879	0.879	0.879
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.915			0.899			0.879		

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla XLIX. Datos calculados: densidad zarzaparrilla por percolación

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9528	0.9527	0.9531	0.9301	0.9286	0.9288	0.907	0.9236	0.9197
ρ_i (g/mL)	0.927	0.927	0.928	0.905	0.904	0.904	0.883	0.899	0.895
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.927			0.904			0.905		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9688	0.9676	0.9691	0.9204	0.9227	0.9215	0.8999	0.902	0.9007
ρ_i (g/mL)	0.943	0.942	0.943	0.896	0.898	0.897	0.876	0.878	0.877
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.943			0.897			0.877		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9498	0.9501	0.9502	0.9164	0.9299	0.9181	0.9012	0.901	0.9011
ρ_i (g/mL)	0.924	0.925	0.925	0.892	0.905	0.893	0.877	0.877	0.877
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.925			0.897			0.877		

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla L. **Datos calculados: densidad eucalipto por maceración dinámica**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9202	0.9214	0.9206	0.8955	0.8919	0.8986	0.8766	0.8674	0.8777
ρ_i (g/mL)	0.896	0.897	0.896	0.871	0.868	0.874	0.853	0.844	0.854
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.896			0.871			0.850		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9508	0.9528	0.9638	0.9714	0.9701	0.9676	0.962	0.9622	0.9618
ρ_i (g/mL)	0.925	0.927	0.938	0.945	0.944	0.942	0.936	0.936	0.936
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.930			0.944			0.936		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9516	0.9518	0.9454	0.9698	0.9703	0.9709	0.9584	0.9598	0.9615
ρ_i (g/mL)	0.926	0.926	0.920	0.944	0.944	0.945	0.933	0.934	0.936
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.924			0.944			0.934		

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla LI. **Datos calculados: densidad eucalipto por percolación**

Tintura	1:10								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9083	0.907	0.9077	0.8714	0.8713	0.8714	0.8526	0.8517	0.8523
ρ_i (g/mL)	0.884	0.883	0.883	0.848	0.848	0.848	0.830	0.829	0.829
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.9083			0.907			0.9077		
Tintura	1:15								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9206	0.9202	0.9205	0.9562	0.9557	0.9556	0.9408	0.9407	0.9411
ρ_i (g/mL)	0.896	0.896	0.896	0.931	0.930	0.930	0.916	0.915	0.916
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.896			0.930			0.916		
Tintura	1:20								
Concentración del solvente	30%			50%			70%		
Masa (g)	0.9324	0.9321	0.932	0.9512	0.9514	0.9518	0.8403	0.8455	0.8474
ρ_i (g/mL)	0.907	0.907	0.907	0.926	0.926	0.926	0.818	0.823	0.825
$\bar{\rho}_i$ (g/mL)	0.907			0.926			0.822		

Fuente: muestra de cálculo.

3.7.5. Determinación de pH

Tabla LII. Datos calculados: pH zarzaparrilla por maceración dinámica

Tintura	Tintura de Zarzaparrilla								
	1:10			1:15			1:20		
	30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
Concentración del solvente									
Promedio pH	4	4	4	4	4	4	4	5	5

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla LIII. Datos Calculados: pH zarzaparrilla por percolación

Tintura	Tintura de Zarzaparrilla								
	1:10			1:15			1:20		
	30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
Concentración del solvente									
Promedio pH	4	4	4	4	4	4	4.667	5	5

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla LIV. Resultados pH: eucalipto por maceración dinámica

Tintura	Tintura de Eucalipto								
	1:10			1:15			1:20		
	30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
Concentración del solvente									
Promedio pH	5	5.3333	6	6	6	6	6	6	6

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla LV. Resultados pH: eucalipto por percolación

Tintura	Tintura de Eucalipto								
	1:10			1:15			1:20		
	30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
Concentración del solvente									
Promedio pH	5	5	5	6	6	6	6	6	6

Fuente: muestra de cálculo.

3.7.6. Determinación de taninos, flavonoides y saponinas

Tabla LVI. Datos calculados: ensayo macro saponinas

ID Muestra	R_f			Promedio
	R_1	R_2	R_3	
E1	0.053	0.08	0.08	0.071
E2	0.213	0.2	0.213	0.209
Z1	0.16	0.16	0.173	0.164
Z2	0.267	0.28	0.28	0.276

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla LVII. Datos calculados: ensayo macro flavonoides

ID Muestra	Altura (cm)		
	R_1	R_2	R_3
E1	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013
E2	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013
Z1	0.413, 0.013	0.413, 0.013	0.413, 0.013
Z2	0.467	0.467	0.467

Fuente: muestra de cálculo.

Tabla LVIII. **Datos calculados: costo por tintura**

ID muestra	Tintura de Zarzaparrilla		Tintura de Eucalipto	
	Maceración dinámica	Percolación	Maceración dinámica	Percolación
1:10, 30%	Q.6.47	Q.4.80	Q.6.79	Q.5.12
1:10, 50%	Q.7.13	Q.5.46	Q.7.45	Q.5.78
1:10, 70%	Q.7.80	Q.6.13	Q.8.12	Q.6.45
1:15, 30%	Q.6.05	Q.4.38	Q.6.27	Q.4.60
1:15, 50%	Q.6.72	Q.5.05	Q.6.93	Q.5.26
1:15, 70%	Q.7.38	Q.5.71	Q.7.60	Q.5.93
1:20, 30%	Q.5.83	Q.4.16	Q.5.99	Q.4.32
1:20, 50%	Q.6.49	Q.4.82	Q.6.65	Q.4.98
1:20, 70%	Q.7.16	Q.5.49	Q.7.32	Q.5.65

Fuente: muestra de cálculo.

3.8. Análisis estadístico

Tabla LIX. Análisis de varianza del rendimiento de extracción

Fuente	Grados de libertad (DF)	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrado medio (MS)	Prueba F (F)	Probabilidad (P)
Especie (A)	1	78.4892	78.4892	1948.65	0.0000
Método (B)	1	57.4713	57.4713	1426.84	0.0000
Tintura (C)	2	11.1701	5.5850	138.66	0.0000
Disolvente (D)	2	78.7363	39.3681	977.39	0.0000
A*B	1	31.4671	31.4671	781.23	0.0000
A*C	2	0.2737	0.1369	3.40	0.0389
A*D	2	0.9516	0.4758	11.81	0.0000
B*C	2	1.0101	0.5051	12.54	0.0000
B*D	2	6.3299	3.1650	78.58	0.0000
C*D	4	3.9704	0.9926	24.64	0.0000
A*B*C	2	0.2474	0.1237	3.07	0.0525
A*B*D	2	2.0662	1.0331	25.65	0.0000
A*C*D	4	2.1170	0.5293	13.14	0.0000
B*C*D	4	1.4807	0.3702	9.19	0.0000
A*B*C*D	4	3.2107	0.8027	19.93	0.0000
Error	72	2.9001	0.0403		
Total	107				

Fuente: Statistix 9.0.

Tabla LX. Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por especie

Especie	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	4.0805	A
Zarzaparrilla	2.3755	B

Fuente: Statistix 9.0.

Tabla LXI. **Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por tintura**

Tintura	Media	Grupos homogéneos
1:10	3.6667	A
1:15	3.1124	B
1:20	2.9048	C

Fuente: *Statistix* 9.0.

Tabla LXII. **Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por disolvente**

Disolvente	Media	Grupos homogéneos
30%	4.4170	A
50%	2.8154	B
70%	2.4515	C

Fuente: *Statistix* 9.0.

Tabla LXIII. **Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por especie*método**

Especie	Método	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	Maceración dinámica	5.3497	A
Eucalipto	Percolación	2.8112	B
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	2.5652	C
Zarzaparrilla	Percolación	2.1858	D

Fuente: *Statistix* 9.0.

Tabla LXIV. **Prueba de Tukey comparación de rendimiento por especie*tintura**

Especie	Tintura	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	1:15	4.4487	A
Eucalipto	1:20	4.0090	B
Eucalipto	1:10	3.7837	C
Zarzaparrilla	1:15	2.8846	D
Zarzaparrilla	1:20	2.2158	E
Zarzaparrilla	1:10	2.0259	E

Fuente: Statistix 9.0.

Tabla LXV. **Prueba de Tukey comparación de rendimiento por especie*disolvente**

Especie	Disolvente	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	30%	3.2931	C
Eucalipto	50%	5.1604	B
Eucalipto	70%	3.7879	B
Zarzaparrilla	30%	1.6098	E
Zarzaparrilla	50%	3.6737	B
Zarzaparrilla	70%	1.8429	D

Fuente: Statistix 9.0.

Tabla LXVI. **Prueba de Tukey comparación de rendimiento por método*tintura**

Método	Tintura	Media	Grupos homogéneos
Maceración dinámica	1:15	4.4531	A
Maceración dinámica	1:10	3.7135	B
Maceración dinámica	1:20	3.7057	B
Percolación	1:15	2.8803	C
Percolación	1:20	2.5191	D
Percolación	1:10	2.0960	E

Fuente: Statistix 9.0.

Tabla LXVII. Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por tintura*disolvente

Tintura	Disolvente	Media	Grupos homogéneos
1:15	50%	5.2034	A
1:20	50%	4.0434	B
1:10	50%	4.0044	B
1:15	70%	3.0147	C
1:20	70%	2.7831	CD
1:15	30%	2.7819	CD
1:10	70%	2.6483	DE
1:20	30%	2.5108	E
1:10	30%	2.0616	F

Fuente: *Statistix* 9.0.

Tabla LXVIII. Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por especie*método*tintura

Espece	Método	Tintura	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	Maceración dinámica	1:15	5.7702	A
Eucalipto	Maceración dinámica	1:20	5.2029	B
Eucalipto	Maceración dinámica	1:10	5.0760	B
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	1:15	3.1359	C
Eucalipto	Percolación	1:15	3.1272	CD
Eucalipto	Percolación	1:20	2.8151	DE
Zarzaparrilla	Percolación	1:15	2.6334	EF
Eucalipto	Percolación	1:10	2.4913	FG
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	1:10	2.3510	FG
Zarzaparrilla	Percolación	1:20	2.2231	G
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	1:20	2.2086	G
Zarzaparrilla	Percolación	1:10	1.7008	H

Fuente: *Statistix* 9.0.

Tabla LXIX. **Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por especie*método*disolvente**

Especie	Método	Disolvente	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	Maceración dinámica	50%	6.8192	A
Eucalipto	Maceración dinámica	70%	5.1648	B
Eucalipto	Maceración dinámica	30%	4.0652	C
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	50%	4.0562	C
Eucalipto	Percolación	50%	3.5016	D
Zarzaparrilla	Percolación	50%	3.2912	D
Eucalipto	Percolación	30%	2.5210	E
Eucalipto	Percolación	70%	2.4109	E
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	70%	1.9457	F
Zarzaparrilla	Percolación	70%	1.7400	FG
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	30%	1.6935	FG
Zarzaparrilla	Percolación	30%	1.5260	G

Fuente: *Statistix* 9.0.

Tabla LXX. Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por especie*tintura*disolvente

Espece	Tintura	Disolvente	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	15	50	6.3150	A
Eucalipto	10	50	5.2712	B
Eucalipto	20	50	4.7269	C
Zarzaparrilla	15	50	4.0918	D
Eucalipto	15	70	3.8350	DE
Eucalipto	10	70	3.4235	EF
Eucalipto	20	70	3.4071	F
Eucalipto	20	50	3.3598	FG
Eucalipto	15	30	3.2091	FG
Zarzaparrilla	20	30	2.9832	GH
Zarzaparrilla	10	50	2.7375	HI
Eucalipto	10	30	2.4458	IJ
Zarzaparrilla	15	30	2.3548	IJ
Zarzaparrilla	15	70	2.1944	JK
Zarzaparrilla	20	70	2.1590	JK
Zarzaparrilla	20	30	2.0384	JKL
Zarzaparrilla	10	70	1.8731	KL
Zarzaparrilla	10	30	1.6774	L

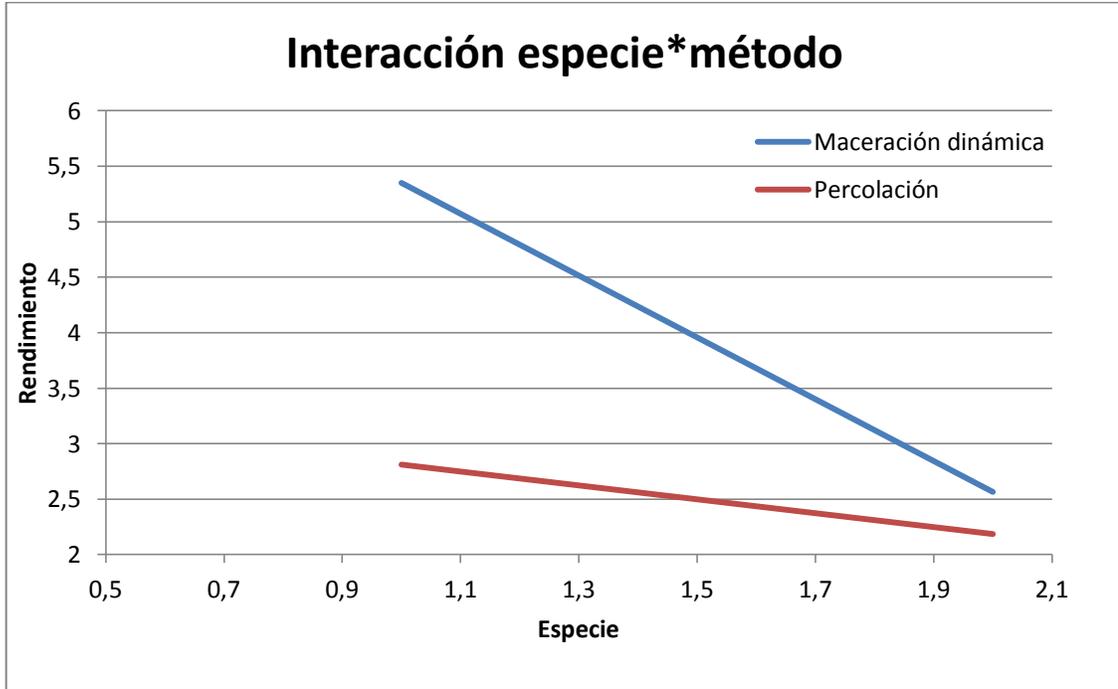
Fuente: *Statistix* 9.0.

Tabla LXXI. Prueba de *Tukey* comparación de rendimiento por especie*tintura*disolvente*método

Especie	Método	Tintura	Disolvente	Media	Grupos homogéneos
Eucalipto	Maceración dinámica	1:15	50%	7.6120	A
Eucalipto	Maceración dinámica	10	50	6.4326	B
Eucalipto	Maceración dinámica	20	50	6.4128	B
Eucalipto	Maceración dinámica	15	70	5.3265	C
Eucalipto	Maceración dinámica	10	70	5.1431	CD
Eucalipto	Maceración dinámica	20	70	5.0246	CDE
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	15	50	5.0181	CDE
Zarzaparrilla	Percolación	15	50	4.4933	DEF
Eucalipto	Maceración dinámica	15	30	4.3721	EF
Eucalipto	Maceración dinámica	20	30	4.1713	FG
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	10	30	4.1097	FG
Eucalipto	Percolación	15	50	3.6902	GH
Eucalipto	Maceración dinámica	10	30	3.6523	GH
Eucalipto	Percolación	20	50	3.4395	H
Eucalipto	Percolación	10	50	3.3751	H
Zarzaparrilla	Percolación	20	50	3.2802	H
Eucalipto	Percolación	15	30	3.1442	HI
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	20	50	3.0409	HI
Eucalipto	Percolación	20	30	2.6233	IJ
Eucalipto	Percolación	15	70	2.5473	IJK
Eucalipto	Percolación	20	70	2.3824	JKL
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	15	70	2.3435	JKLM
Eucalipto	Percolación	10	70	2.3032	JKLM
Zarzaparrilla	Percolación	10	50	2.1000	JKLMN
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	15	30	2.0461	JKLMNO
Zarzaparrilla	Percolación	20	70	1.9356	KLMNO
Zarzaparrilla	Percolación	15	70	1.8415	LMNOP
Eucalipto	Percolación	10	30	1.7956	LMNOP
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	20	30	1.7951	LMNOP
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	20	70	1.7896	LMNOP
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	10	70	1.7039	MNOP
Zarzaparrilla	Percolación	15	30	1.5653	NOP
Zarzaparrilla	Percolación	10	30	1.5593	NOP
Zarzaparrilla	Percolación	20	30	1.4535	NOP
Zarzaparrilla	Percolación	10	70	1.4430	OP
Zarzaparrilla	Maceración dinámica	10	30	1.2393	P

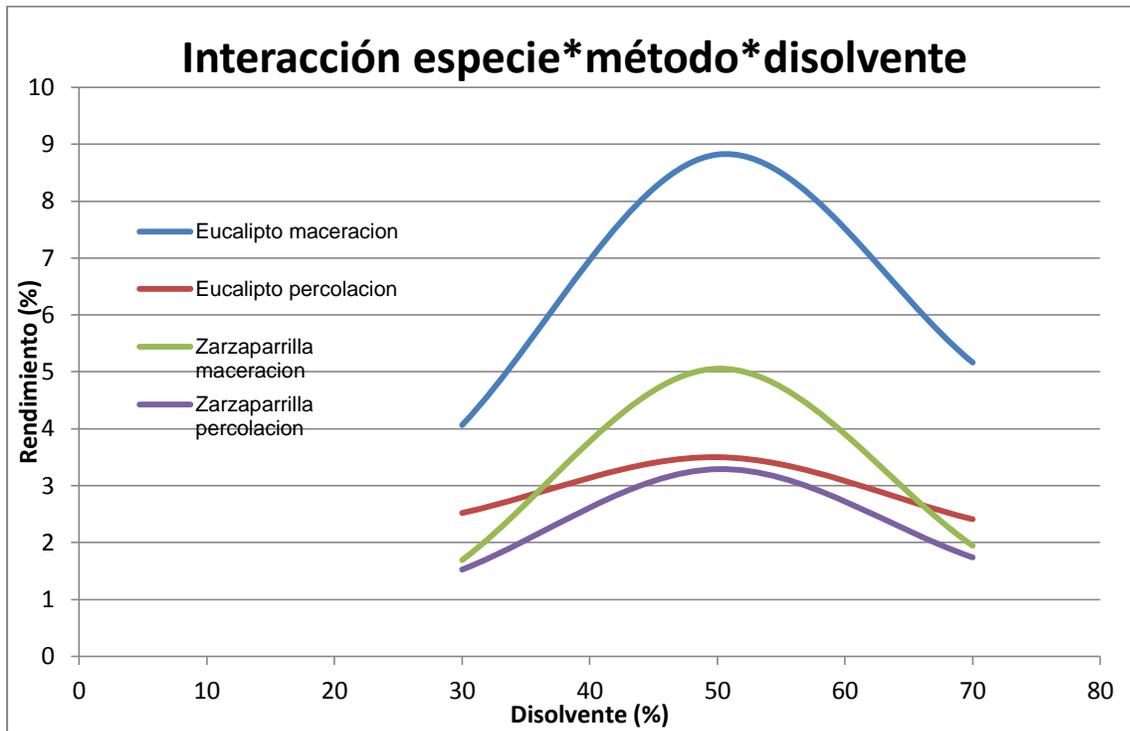
Fuente: Statistix 9.0.

Figura 11. Prueba de *Tukey* rendimiento contra especie*método



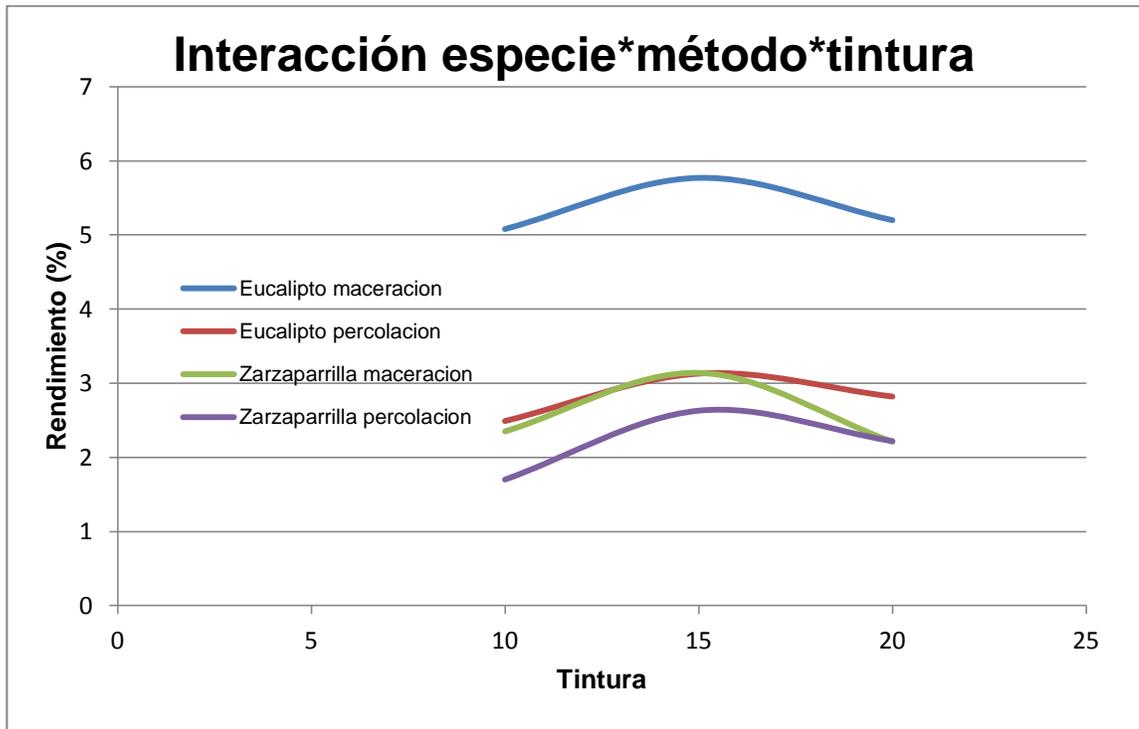
Fuente: *Statistix* 9.0.

Figura 12. Prueba de *Tukey* rendimiento contra especie*método*disolvente



Fuente: *Statistix* 9.0.

Figura 13. Prueba de *Tukey* rendimiento contra especie*método*tintura



Fuente: *Statistix* 9.0.

4. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de extracción en función de sólidos extraíbles

Tabla LXXII. **Resultados: sólidos extraíbles zarzaparrilla**

ID muestra	Porcentaje sólidos extraíbles (%) maceración dinámica	Porcentaje sólidos extraíbles (%) Percolación
1:10, 30%	1.559	1.239
1:10, 50%	2.099	4.109
1:10, 70%	1.443	1.703
1:15, 30%	1.565	2.046
1:15, 50%	4.493	5.018
1:15, 70%	1.841	2.344
1:20, 30%	1.453	1.795
1:20, 50%	3.280	3.040
1:20, 70%	1.935	1.789

Fuente: elaboración propia, Tabla XLIV. y XLV.

Tabla LXXIII. **Resultados: sólidos extraíbles eucalipto**

ID muestra	Porcentaje sólidos extraíbles (%) maceración dinámica	Porcentaje sólidos extraíbles (%) Percolación
1:10, 30%	1.795	3.652
1:10, 50%	3.375	6.432
1:10, 70%	2.303	5.143
1:15, 30%	3.144	4.372
1:15, 50%	3.690	7.612
1:15, 70%	2.547	5.326
1:20, 30%	2.623	4.171
1:20, 50%	3.439	6.412
1:20, 70%	2.382	5.024

Fuente: elaboración propia, Tabla XLVI. y XLVII.

4.2. Caracterización fisicoquímica

Tabla LXXIV. **Resultados: densidad zarzaparrilla**

ID muestra	Densidad (g/mL) maceración dinámica	Densidad (g/mL) percolación
1:10, 30%	0.934	0.927
1:10, 50%	0.898	0.904
1:10, 70%	0.868	0.905
1:15, 30%	0.922	0.943
1:15, 50%	0.881	0.897
1:15, 70%	0.848	0.877
1:20, 30%	0.915	0.925
1:20, 50%	0.899	0.897
1:20, 70%	0.879	0.877

Fuente: elaboración propia, Tabla XLVIII. y XLIX.

Tabla LXXV. **Resultados: densidad eucalipto**

ID muestra	Densidad (g/mL) maceración dinámica	Densidad (g/mL) percolación
1:10, 30%	0.896	0.883
1:10, 50%	0.871	0.848
1:10, 70%	0.850	0.829
1:15, 30%	0.930	0.896
1:15, 50%	0.944	0.930
1:15, 70%	0.936	0.916
1:20, 30%	0.924	0.907
1:20, 50%	0.944	0.926
1:20, 70%	0.934	0.822

Fuente: elaboración propia, Tabla L. y LI.

Tabla LXXVI. **Resultados: pH zarzaparrilla**

Tintura	Tintura de Zarzaparrilla								
	1:10			1:15			1:20		
Concentración del solvente	30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
pH Maceración Dinámica	4	4	4	4	4	4	4	5	5
pH Percolación	4	4	4	4	4	4	4.667	5	5

Fuente: elaboración propia, Tabla LII. y LIII.

Tabla LXXVII. **Resultados: pH eucalipto**

Tintura	Tintura de Eucalipto								
	1:10			1:15			1:20		
Concentración del solvente	30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
pH Maceración Dinámica	5	5.333	6	6	6	6	6	6	6
pH Percolación	5	5	5	6	6	6	6	6	6

Fuente: elaboración propia, Tabla LIV. y LV.

Tabla LXXVIII. **Resultados de color**

ID muestra	Código de color			
	Zarzaparrilla método dinámico	Zarzaparrilla percolación	Eucalipto método dinámico	Eucalipto percolación
1:10, 30%	PMS 724	PMS 724	PMS 376	PMS 376
1:10, 50%	PMS 724	PMS 724	PMS 376	PMS 376
1:10, 70%	PMS 724	PMS 724	PMS 376	PMS 376
1:15, 30%	PMS 732	PMS 732	PMS 384	PMS 384
1:15, 50%	PMS 732	PMS 732	PMS 384	PMS 384
1:15, 70%	PMS 732	PMS 732	PMS 384	PMS 384
1:20, 30%	PMS 725	PMS 725	PMS 378	PMS 371
1:20, 50%	PMS 725	PMS 725	PMS 378	PMS 371
1:20, 70%	PMS 725	PMS 725	PMS 371	PMS 371

Fuente: datos originales, Tabla XXXI.

Tabla LXXIX. **Resultados: ensayo macro saponinas**

ID muestra	Presencia saponinas
E1	Positivo
E2	Positivo
Z1	Positivo
Z2	Positivo

Fuente: datos originales, Tabla XXXII.

Tabla LXXX. **Resultados: ensayo micro saponinas**

ID muestra	R_f
E1	0.071
E2	0.208
Z1	0.164
Z2	0.275

Fuente: elaboración propia, Tabla XXXIII.

Tabla LXXXI. **Resultados: ensayo macro flavonoides**

	E1	E2	Z1	Z2
Tubo 1	Turbidez en el fondo	Turbidez	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 2	Coloración verde oscura	Coloración negra	Coloración negra	Coloración negra
Tubo 3	Precipitado café	Precipitado café	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 4	Turbidez	Turbidez	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 5	Precipitado café	Precipitado café	Coloración rojiza	Coloración rojiza
Tubo 6	Coloración verde	Coloración verde	Sin cambio	Leve turbidez
Tubo 7	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio

Fuente: datos originales, Tabla XXXIV.

Tabla LXXXII. **Resultados: ensayo micro flavonoides**

ID muestra	Altura (cm)		
	<i>R</i> ₁	<i>R</i> ₂	<i>R</i> ₃
E1	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013
E2	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013	0.867, 0.586, 0.4, 0.347, 0.013
Z1	0.413, 0.013	0.413, 0.013	0.413, 0.013
Z2	0.467	0.467	0.467

Fuente: elaboración propia, Tabla XXXV.

Tabla LXXXIII. **Resultados: ensayo macro taninos**

	E1	E2	Z1	Z2
Tubo 1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Tubo 2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Tubo 3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Tubo 4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fuente: datos originales, Tabla XXXVI.

4.3. Actividad antimicrobiana

Tabla LXXXIV. **Resultados: bioensayo**

ID muestra	Microorganismo			
	A	B	C	D
E1	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
E2	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Z1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Z2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella Typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos originales, Tabla XXXVII.

Tabla LXXXV. **Resultados: CIM muestra E1**

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 mg/mL	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
0.5 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella Typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos originales, Tabla XXXVIII.

Tabla LXXXVI. **Resultados: CIM muestra E2**

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 mg/mL	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
0.5 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella Typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos originales, Tabla XXXIX.

Tabla LXXXVII. **Resultados: CIM muestra Z1**

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.5 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella Typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos originales, Tabla XXXIX.

Tabla LXXXVIII. Resultados: CIM muestra Z2

Concentración	Microorganismo			
	A	B	C	D
1 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.5 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0.25 mg/mL	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Microorganismos: A= *Bacillus cereus*, B= *Escherichia coli* C= *Pseudomonas aeruginosa*, D= *Salmonella Typhi*. Positivo (+), negativo (-)

Fuente: datos originales, Tabla XL.

4.4. Costo por tintura

Tabla LXXXIX. Resultados: costo unitario por tintura

ID muestra	Tintura de Zarzaparrilla		Tintura de Eucalipto	
	Maceración dinámica	Percolación	Maceración dinámica	Percolación
1:10, 30%	Q.6.47	Q.4.80	Q.6.79	Q.5.12
1:10, 50%	Q.7.13	Q.5.46	Q.7.45	Q.5.78
1:10, 70%	Q.7.80	Q.6.13	Q.8.12	Q.6.45
1:15, 30%	Q.6.05	Q.4.38	Q.6.27	Q.4.60
1:15, 50%	Q.6.72	Q.5.05	Q.6.93	Q.5.26
1:15, 70%	Q.7.38	Q.5.71	Q.7.60	Q.5.93
1:20, 30%	Q.5.83	Q.4.16	Q.5.99	Q.4.32
1:20, 50%	Q.6.49	Q.4.82	Q.6.65	Q.4.98
1:20, 70%	Q.7.16	Q.5.49	Q.7.32	Q.5.65

Fuente: elaboración propia, Tabla LVIII.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El control de calidad en el inicio del proceso extractivo de tinturas de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis willd*) y Eucalipto (*Ecucalyptus globulus labill*) adquiridas en el Laboratorio de Productos Fitofarmacéuticos FARMAYA indica para el lote de zarzaparrilla 0.567% de materia extraña y para el lote de eucalipto 0.347% de materia extraña, ambos porcentajes de materia extraña son menores al 1%. Por tanto la materia prima es considerada aprobada para la extracción de tinturas.

En la determinación de porcentaje de humedad de zarzaparrilla tiene 6.267% y de eucalipto 5.9%. Ambos valores son menores del 12% de contenido de humedad, el cual es el valor máximo permisible en drogas vegetales para extracción de principios activos al evitar la hidrólisis de sus constituyentes y el crecimiento de microorganismos.

Para la validación de la hipótesis estadística se realiza el análisis de varianza para las cuatro fuentes de variación en el experimento, siendo estas la especie con dos niveles, el método de extracción con dos niveles, la proporción de tintura con tres niveles y el porcentaje de disolvente con tres niveles. El análisis es extensivo a todas las interacciones posibles entre las cuatro fuentes de variación.

Utilizando el análisis de variaciones en las medias del rendimiento y cada fuente de variación en el experimento, se determina la existencia de un efecto de diferencia significativa en el rendimiento de extracción debido a la especie, método de extracción, proporción de tintura y porcentaje de disolvente.

La prueba de F para el efecto especie indica variación en el porcentaje de rendimiento entre las especies aún bajo las mismas condiciones de operación, por tanto se rechaza la hipótesis nula.

Una analogía se hace extensiva al efecto del método de extracción en el rendimiento extractivo. Debido a que éste produce diferencias significativas en el rendimiento.

Se obtienen valores para la prueba F relativamente mayores a la unidad para los efectos de proporción de tinturas y porcentaje de disolvente, por lo que ambas fuentes de variación producen diferencias significativas en el rendimiento de extracción.

En la segunda parte del análisis estadístico se utiliza la prueba estadística *Tukey*, en la que se comparan medias del rendimiento para interacciones de las diferentes fuentes de variación.

En la figura 12. se ilustra la comparación en el rendimiento para la interacción especie*método. Para la especie eucalipto se obtiene mayor rendimiento extractivo utilizando el método de maceración dinámica, se obtiene una media de rendimiento extractivo de 5.3497% por maceración dinámica y 2.8112% por percolación. Para la especie zarzaparrilla el mayor rendimiento extractivo se obtiene por maceración dinámica siendo de 2.5612% y por percolación 2.1858%.

En la figura 14. se grafican los rendimientos de extracción para la interacción especie*método*proporción de tintura. Para la especie eucalipto se mantiene la tendencia de mayor rendimiento extractivo para el método de maceración dinámica, para los dos métodos de extracción el mayor rendimiento se obtiene a la proporción de tintura 1:15, y el mínimo se obtiene para proporción 1:10. Para la especie zarzaparrilla el mayor rendimiento de extracción se obtiene para la proporción 1:15 en ambos métodos y el menor rendimiento se obtiene para la proporción 1:20.

En la figura 13. se realiza la comparación del rendimiento de extracción para la interacción de especie*método *disolvente. Para la especie eucalipto por ambos métodos de extracción se obtiene el máximo rendimiento extractivo a un porcentaje de disolvente al 50% v/v. En la maceración dinámica el mínimo se obtiene al 30% v/v de disolvente y para la percolación el mínimo es cuando se utiliza disolvente al 70% v/v. Para la especie zarzaparrilla el máximo de rendimiento para los dos métodos de extracción se obtiene utilizando disolvente al 50% v/v y el mínimo cuando el disolvente se encuentra al 30% para ambos métodos.

Las tinturas obtenidas para cada especie se caracterizan fisicoquímicamente para identificarlas con las propiedades de pH, color, densidad y sólidos extraíbles. Se autentica la identidad del material vegetal mediante la determinación de metabolitos secundarios como las saponinas, flavonoides y taninos.

El potencial de hidrógeno para las tinturas de zarzaparrilla está en el rango de 4-5, para todos los tratamientos. Se obtienen tinturas ácidas independientes del porcentaje de disolvente, proporción de tintura y método de extracción. Para eucalipto el potencial de hidrógeno tiende a ser menos ácido oscilando en el intervalo de 5-6, esta tendencia es independiente de la fuente de variación en el experimento.

La tabla LXXVI. detalla la densidad para cada tintura de zarzaparrilla, la tendencia general es un valor de densidad mayor por el método de percolación. La tabla LXXVII. detalla valores de densidad para eucalipto, la densidad en este caso es mayor para las tinturas obtenidas por el método de maceración dinámica. Esto se debe a que la agitación constante del disolvente y la materia prima aumentan al área de contacto y el tiempo para la extracción.

A partir del catálogo *Pantone® Color Formula Guide* 1000 SICPA se determina el color de las tinturas, en la tabla LXXX. se detalla el color leído para cada tratamiento. Para ambas especies la intensidad de color aumentó con la proporción de tintura sin importar el método de extracción.

El análisis de identificación de metabolitos secundarios comprende saponinas, flavonoides y taninos. Estos análisis se realizan a la combinación de especie, proporción de tintura y porcentaje de disolvente que presentan los mayores porcentajes de rendimiento por método de extracción. Las muestras seleccionadas son E1: eucalipto - percolación - 1:15 - 50%, E2: eucalipto – maceración dinámica - 1:15 - 50%, Z1: zarzaparrilla - percolación - 1:15 - 50% y Z2: zarzaparrilla – maceración dinámica - 1:15 - 50%.

Para determinar la presencia de saponinas se realiza un ensayo semimacro cualitativo, en el que se determina la presencia o ausencia de saponinas. Para las muestras eucalipto (E1, E2) y zarzaparrilla (Z1, Z2) la prueba es positiva. Se procede con el ensayo semimicro cualitativo, que comprende cromatografía en capa fina. En el cromatograma de capa fina figura 19. para el metabolito saponina se identifica para las muestras de eucalipto (E1, E2) y zarzaparrilla (Z1, Z2) la presencia de ergosterol y β -sitafesol. La intensidad de las saponinas es mayor para las muestras obtenidas por maceración dinámica.

En el ensayo de flavonoides semimacro cualitativo se confirma la presencia de éstos para las muestras de eucalipto (E1, E2) y zarzaparrilla (Z1, Z2). El ensayo semimacro cualitativo comprende una cromatografía en capa fina, ilustrada en la figura 20., para las muestras de eucalipto (E1, E2) y zarzaparrilla (Z1, Z2) se determina la presencia de kaenperol y ácido caféico. En las muestras eucalipto (E1, E2) se encuentra el flavonide rutina, y las muestras de zarzaparrilla presentan ausencia de rutina.

En la determinación de taninos los resultados fueron negativos, es decir las especies de eucalipto y zarzaparrilla no presentan taninos en sus principios activos.

El análisis de actividad antimicrobiana para las muestras eucalipto (E1, E2) y zarzaparrilla (Z1, Z2), se realizó en dos etapas: la confirmación de actividad antimicrobiana con cuatro microorganismos y la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Las muestras de eucalipto presentan actividad antimicrobiana solamente para dos de los cuatros microorganismos analizados, *Salmonella typhi* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En la segunda parte del análisis se determinó que la concentración mínima inhibitoria para *Salmonella typhi* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 es de 1 mg/mL, para concentraciones menores de esta habrá crecimiento microbiano.

Las muestras de zarzaparrilla presentan actividad antimicrobiana para los cuatro microorganismos analizados, siendo estos *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En el análisis de concentración mínima inhibitoria para toda dilución existió crecimiento bacteriano, por lo que las tinturas de zarzaparrilla presentan actividad antimicrobiana como tintura pura.

Para las tinturas extraídas de la zarzaparrilla los rendimientos de extracción tienden a presentar diferencias bajas respecto al método de extracción, este criterio permite seleccionar como método de extracción económicamente viable a la percolación, puesto que el reducido aumento de rendimiento extractivo por maceración dinámica no compensa el costo adicional de energía eléctrica. Debido a que el costo para la tintura por maceración dinámica es de Q.6.72 y por percolación es de Q.5.05 el método a seleccionar es la percolación puesto que la diferencia en rendimiento es mínima y se excluye el costo por electricidad.

Para las tinturas de Eucalipto el mayor rendimiento de extracción es obtenido por maceración dinámica, esto justifica el aumento de costos por unidad debido al factor de energía eléctrica. Este aumento es de Q.1.67.

CONCLUSIONES

1. Existe diferencia significativa en el porcentaje de rendimiento de la tintura de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) y de Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) para cada método de extracción, bajo las mismas condiciones de operación.
2. La proporción de tintura y el porcentaje de disolvente producen diferencias significativas en el rendimiento de extracción.
3. Para la especie eucalipto el mayor porcentaje de extracción de tinturas se obtiene por maceración dinámica, en proporción de tintura 1:15 y con disolvente alcohol etílico-agua al 50% v/v.
4. Para la especie zarzaparrilla el mayor porcentaje de extracción de tinturas se obtiene por maceración dinámica, en proporción de tintura 1:15 y con disolvente alcohol etílico-agua al 50% v/v.
5. Para la especie Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) se determinó la presencia de kaenperol, ácido cafeico y rutina.
6. Para la especie Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) se determinó la presencia de kaenperol y ácido cafeico.
7. Las tinturas de Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) son activas contra los microorganismos *Bacillus cerius* ATCC 14579 y *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración mínima inhibitoria de 1 mg/mL.

8. Las tinturas de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) son activas para *Bacillus cerius* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, esta actividad es positiva al no ser diluidas las tinturas.
9. Para las tinturas de Zarzaparrilla (*Smilax domingensis Willd*) el método de extracción económicamente viable es la percolación.
10. Para las tinturas de Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) el mayor rendimiento de extracción es obtenido por maceración dinámica.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar la técnica de disco impregnado para confirmación de actividad antimicrobiana para evitar problemas de solidificación con agar tripticasa soya.
2. Filtrar mediante membranas de 0.22 μm las tinturas previo a su análisis o utilización antimicrobiana, para esterilizarla.

BIBLIOGRAFÍA

1. AYRES, Gilbert. *Análisis químico cuantitativo*. Ortiz Rocha, Oswaldo (edi). 2da. Edición. Madrid: Harla, 1970 p 43-54. ISBN 006-3100 50-9.
2. ALVARADO SILVA, Silvia Ruth. "Confirmación de la actividad antibacteriana de algunos extractos vegetales". Tesis Qco. Biólogo, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 1997. p 20-37.
3. BATISTA CARMONA, Aidelys. *Caracterización de los compuestos pungentes en la tintura de jengibre al 50 %*. [En línea]. Primera edición. [La Habana, Cuba]: Empresa Laboratorio Farmacéutico "Saúl Delgado", marzo 2003 [ref. 31 de marzo 2003]. Disponible en Web: F:\tesis\Caracterización de los compuestos pungentes en la tintura de jengibre al 50 %.mht
4. BIOSANIT. *Desinfectante ecológico*. [En línea]. [ref octubre 2009] Disponible en Web: <http://www.reinmark.com/higiene/es/biosanit.php>
5. CÁCERES, Armando. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial universitaria, 1996. p 170-172 y 373-376.

6. CONCEPCIÓN ROJAS, Miriam. *Evaluación de la efectividad del producto furfural como posible desinfectante*. [En línea]. Primera edición. [La Habana, Cuba]: Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, diciembre 2005 [ref. 31 julio 2006]. Disponible en Web: F:\tesis\pruebas a desinfectantes.mht
7. DE LA CRUZ BERRANDA, Brenda Carolina “Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales Nativas de Guatemala, validadas científicamente”. Tesis Qca. Farmacéutica, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 1997. p 24-33.
8. DE LEÓN JUAREZ, Mauricio Leonardo “Comparación del rendimiento del aceite esencial de dos Especies de eucalipto (*eucalyptus citriodora hook* y *eucalyptus Camaldulensis dehnh*), aplicando el método de hidrodestilación a nivel laboratorio”. Tesis Ing. Qco., Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2008. p 22-45.
9. ESCOBAR ROBLES, Carla Sofía. “Estandarización de dos extractos del rizoma de la planta Zarzaparrilla (*smilax domingensis*), proveniente del Departamento de santa rosa, para desarrollo Fitofarmacéutico a nivel de laboratorio, utilizando la Extracción por percolación de lecho estático con 24 Horas de reposo”. Tesis Ing. Qca., Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2007. p 19-28.

10. GUERRA CORADO, Alvaro Enrique. "Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio". Tesis Ing. Qca., Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2005. p 19-25, 49-52.
11. GIRÓN, M y otros. IX *Seminario nacional de plantas medicinales y VI Exposición nacional de plantas medicinales y productos derivados*. Quirigúa, Los Amates, Izabal .1996 p 43- 75.
12. JIMÉNEZ NAVAS, Mayra Ofelia. "Determinación de la actividad biocida de cinco plantas del género *acalypha*". Tesis Qca. Farmacéutica, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 1997. p 27-52.
13. MORALES DE LEÓN, Claudia Annelize. "Caracterización de extracto y tintura de Macuy (*solanum americanum miller*) como Antifúngico contra la *candida albicans*". Tesis Ing. Qca. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2006. 9-18 pp.
14. PERRY, Robert y otros. *Manual del ingeniero químico*. García Brague, Antonio (edi); Luis Alemany Arrébola (trad). 4ta. ed. en español. España: McGraw-Hill Interamericana de España, S.A., 2001 Tomo III 18-68 a 18-74, 16-46 a 16-49 ISBN 84-481-3342-0.

15. REYNOSO REVOLORIO, David Alejandro. "Desarrollo de un sistema tutoria inteligente -STI- usando Visual basic 0.6 para la fundamentación teórica de la operación unitaria de lixiviación inducia (extracción sólida-líquida) orientada a materiales biológicos (metabolitos)". Tesis Ing. Qco., Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2009. p 55-57, 68-73.
16. RICO MARTÍNEZ, Glenda Arcely. "Actividad antimicrobiana de cinco plantas de la familia compositae nativas de Guatemala". Tesis Qco. Biólogo, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 1997. p 50-68.
17. RODRÍGUEZ CORONADO, Juan José. "Determinación de una combinación de variables apropiadas: en la extracción del aceite de la hoja de eucalipto a partir de la evaluación de métodos de extracción convencional". Tesis Ing. Qco., Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 1993. p 45-54.
18. SCHWALBE Richard y otros. *Antimicrobial suceptibility testing protocols*. Estados Unidos: Taylor and Francis Group LLC, 2007 p 275-298.
19. SOBERÁNIS IBÁÑEZ, Adrian Antonio. "Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la Oleorresina de cardamomo (*elletteria cardamomum*, l. Matton) obtenida a nivel laboratorio utilizando dos Métodos de lixiviación a tres diferentes Temperaturas". Tesis Ing. Qco., Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, 2009. p 40-54.

20. SOLÍS, Pablo N. y otros. *Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos*. Guatemala 2005. p 55-63, 132- 136.
21. WALPOLE Ronald. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. 6ta. ed. México: Prentice-Hall Hispanoamerica, S.A. 1999. Capítulos 9, 10,13 y 14.
22. WILLIAM BARRY, Hugo y RUSSELL AD. *Pharmaceutical microbiology*. 2da. ed. Estados Unidos: Blackwell scientific publications, 1981 p 185-201.

APÉNDICES

Apéndice A pruebas preliminares

1. Calidad de materia prima

1.1 Materia extraña

	Rizoma de Zarzaparrilla	Hoja de Eucalipto
Porcentaje materia extraña (%)	0.567	0.347

Fuente: datos calculados, Tabla XLII.

1.2 Porcentaje de humedad

	Rizoma de Zarzaparrilla	Hoja de Eucalipto
Porcentaje de Humedad (%)	6.267	5.9

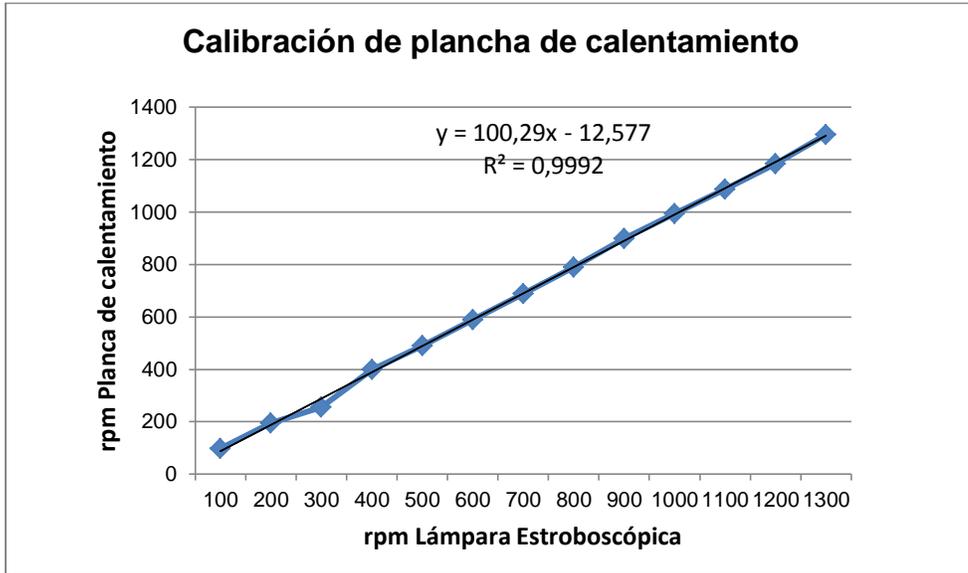
Fuente: datos calculados, Tabla XLIII.

2. Confirmación de actividad antibacteriana *in vitro*

Microorganismo	<i>Ecucalyptus globulus labill</i>	<i>Smilax spinosa</i>	<i>Smilax dominguensis Willd</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativa	Negativa	Positiva
<i>Salmonella Typhi</i>	Negativa	Negativa	Positiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa	Negativa	Positiva
<i>Escherichia Coli</i>	Positiva	Negativa	Negativa

Fuente: datos originales.

3. Calibración de planchas de agitación



Fuente: datos originales.

4. Determinación del tiempo de lixiviación con maceración dinámica y estática

Datos originales índice de refracción y tiempo de maceración dinámica de tinturas de zarzaparrilla

	Tiempo (min)								
ID muestra	5	10	15	20	25	30	35	40	45
1:10, 30%	1.33	1.34	1.38	1.46	1.53	1.59	1.6	1.68	1.75
1:10, 50%	1.34	1.43	1.48	1.51	1.6	1.68	1.76	1.79	1.8
1:10, 70%	1.37	1.45	1.52	1.59	1.67	1.74	1.8	1.83	1.85
1:15, 30%	1.32	1.35	1.36	1.44	1.49	1.6	1.62	1.67	1.73
1:15, 50%	1.34	1.42	1.47	1.53	1.61	1.69	1.74	1.81	1.83
1:15, 70%	1.36	1.43	1.54	1.58	1.65	1.78	1.8	1.84	1.85
1:20, 30%	1.33	1.35	1.38	1.45	1.51	1.58	1.62	1.69	1.72
1:20, 50%	1.34	1.45	1.47	1.52	1.62	1.7	1.77	1.8	1.81
1:20, 70%	1.36	1.44	1.57	1.6	1.64	1.77	1.81	1.82	1.83
	Tiempo (min)								
ID muestra	50	55	60	70	75	80	85	90	50
1:10, 30%	1.82	1.86	1.89	1.9	1.91	1.9	1.9	1.9	1.82
1:10, 50%	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.89
1:10, 70%	1.88	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.88
1:15, 30%	1.79	1.88	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.79
1:15, 50%	1.88	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.88
1:15, 70%	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.89
1:20, 30%	1.8	1.87	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.8
1:20, 50%	1.88	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.88
1:20, 70%	1.85	1.89	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.85

Fuente: datos experimentales.

Datos originales índice de refracción y tiempo de maceración dinámica de tinturas de eucalipto

	Tiempo (min)								
ID muestra	5	10	15	20	25	30	35	40	45
1:10, 30%	1.31	1.31	1.31	1.33	1.35	1.36	1.36	1.37	1.38
1:10, 50%	1.32	1.32	1.33	1.34	1.34	1.35	1.36	1.38	1.39
1:10, 70%	1.35	1.35	1.37	1.37	1.38	1.39	1.4	1.4	1.42
1:15, 30%	1.31	1.31	1.32	1.33	1.34	1.35	1.37	1.37	1.39
1:15, 50%	1.31	1.32	1.32	1.33	1.35	1.36	1.37	1.37	1.38
1:15, 70%	1.36	1.36	1.36	1.36	1.38	1.39	1.39	1.41	1.43
1:20, 30%	1.31	1.32	1.32	1.33	1.34	1.35	1.35	1.37	1.38
1:20, 50%	1.31	1.31	1.31	1.34	1.36	1.36	1.36	1.37	1.39
1:20, 70%	1.36	1.37	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1.41
	Tiempo (min)								
ID muestra	50	55	60	70	75	80	85	90	50
1:10, 30%	1.4	1.43	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.4
1:10, 50%	1.41	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.41
1:10, 70%	1.43	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.43
1:15, 30%	1.41	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.41
1:15, 50%	1.43	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.43
1:15, 70%	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.44
1:20, 30%	1.41	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.41
1:20, 50%	1.42	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.42
1:20, 70%	1.42	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.42

Fuente: datos experimentales.

Apéndice B muestra de cálculo

1. Materia extraña

$$\frac{M_{me}}{M_m} * 100\% = \% \text{ Materia Extraña} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde:

M_{me} : Masa de materia extraña, g

M_m : Masa de muestra, g

Para la primera corrida de materia extraña para la zarzaparrilla:

$$\frac{2}{500} * 100\% = 0.4\%$$

Siguiendo el mismo procedimiento se calcularon los datos de la tabla XLII.

2. Sólidos extraíbles

$$\frac{M_T - M_C}{M_{alicuota}} * 100\% = \% \text{ Sólidos Extraíbles} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde:

M_T : Masa total de crisol y sólido extraído, g

M_C : Masa de crisol, g

$M_{alicuota}$: Masa de alícuota inicial de tintura, g

Para la primera corrida de zarzaparrilla por el método de maceración dinámica para la relación 1:10 al 30% de solvente:

$$\frac{42.5466 - 42.4278}{9.329} * 100\% = 1.273\%$$

Siguiendo el mismo procedimiento se calcularon los datos de las tablas XLIV. – XLVII.

3. Densidad

$$\frac{M_T - M_P}{V_P} = \rho \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde:

ρ : Densidad, g/mL

M_T : Masa total de picnómetro y tintura, g

M_P : Masa de picnómetro, g

V_P : Volumen de picnómetro, g

Para la primera corrida de zarzaparrilla por el método de maceración dinámica para la relación 1:10 al 30% de solvente:

$$\frac{5.2408 - 4.2813}{1.027} = 0.934 \text{ g/mL}$$

Siguiendo el mismo procedimiento se calcularon los datos de las tablas XLVIII. – LI.

4. **Ratio of front (R_f)**

$$\frac{\text{Distancia muestra}}{\text{Distancia solvente}} = R_f \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde:

R_f : Ratio of front, adimensional

Distancia muestra: Distancia recorrida por la muestra, cm

Distancia solvente: Distancia recorrida por el solvente, cm

Para la primera corrida de saponinas de la muestra Z1:

$$\frac{0.4}{7.5} = 0.0533$$

Siguiendo el mismo procedimiento se calcularon los datos de las tablas LVI. – LVII.

5. **Costo tintura**

$$m * P_p + s * P_s + A * P_A + E = Costo \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde:

m: masa de la especie, g

P_p : Precio por especie, Q/1000 g

s: Volumen de alcohol etílico, L

P_s : Precio de alcohol etílico, Q/3.8 L

A: Volumen de agua desmineralizada, L

P_A : Precio de agua desmineralizada, Q/ 3.8 L

Para la tintura de zarzaparrilla 1:10 y 30% v/v por el método de maceración dinámica:

$$\frac{40 + 32}{1000} + \frac{151.8 + 45}{3800} + \frac{328.4 * 20}{3800} + 1.67 = 6.47$$

Siguiendo el mismo procedimiento se calcularon los datos de la tabla LVIII.

Apéndice C cromatogramas

Cromatograma de saponinas



Fuente: datos originales.

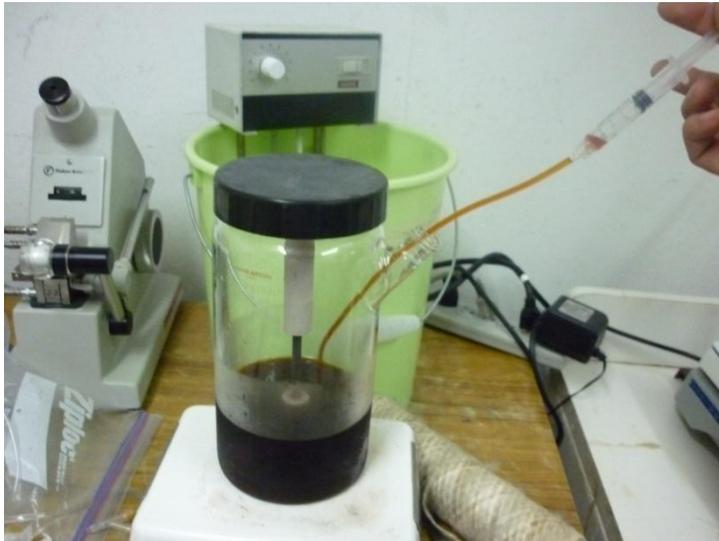
Cromatograma de flavonoides



Fuente: datos originales.

Apéndice D fotografías del proceso de obtención de tinturas

Equipo para determinación de tiempo de percolación



Fuente: elaboración propia.

Calibración de planchas (agitación)



Fuente: elaboración propia.

Equipo de percolación



Fuente: elaboración propia.

Equipo de maceración dinámica



Fuente: elaboración propia.

Balanza para determinación de porcentaje de humedad



Fuente: elaboración propia.

Determinación de densidad



Fuente: elaboración propia.

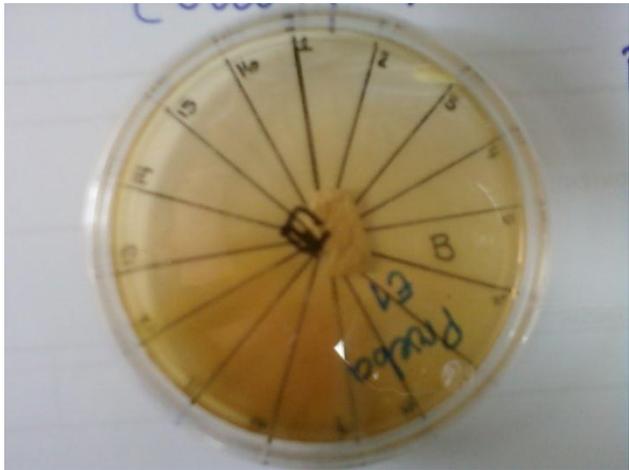
Determinación de sólidos extraíbles



Fuente: elaboración propia.

Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria

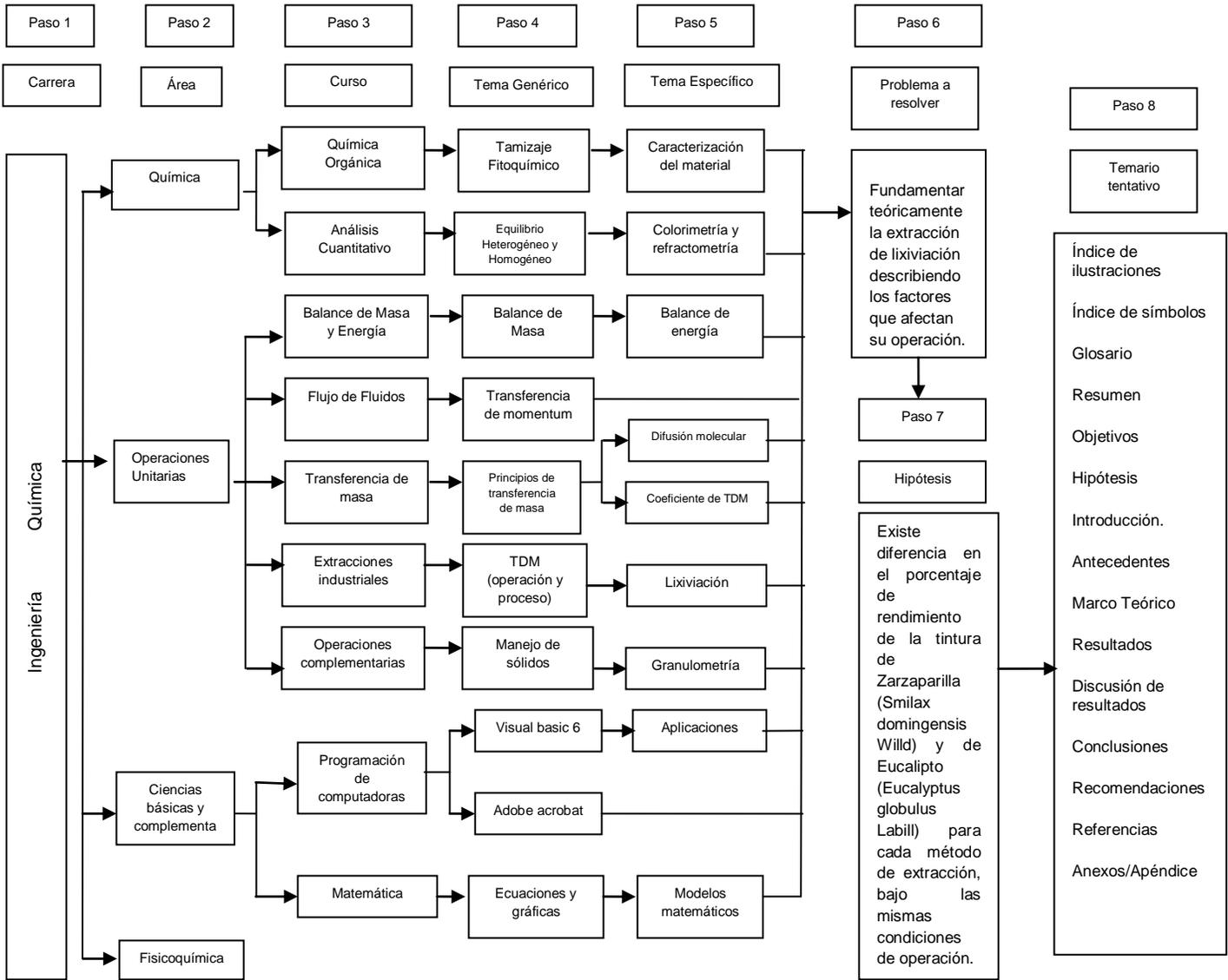




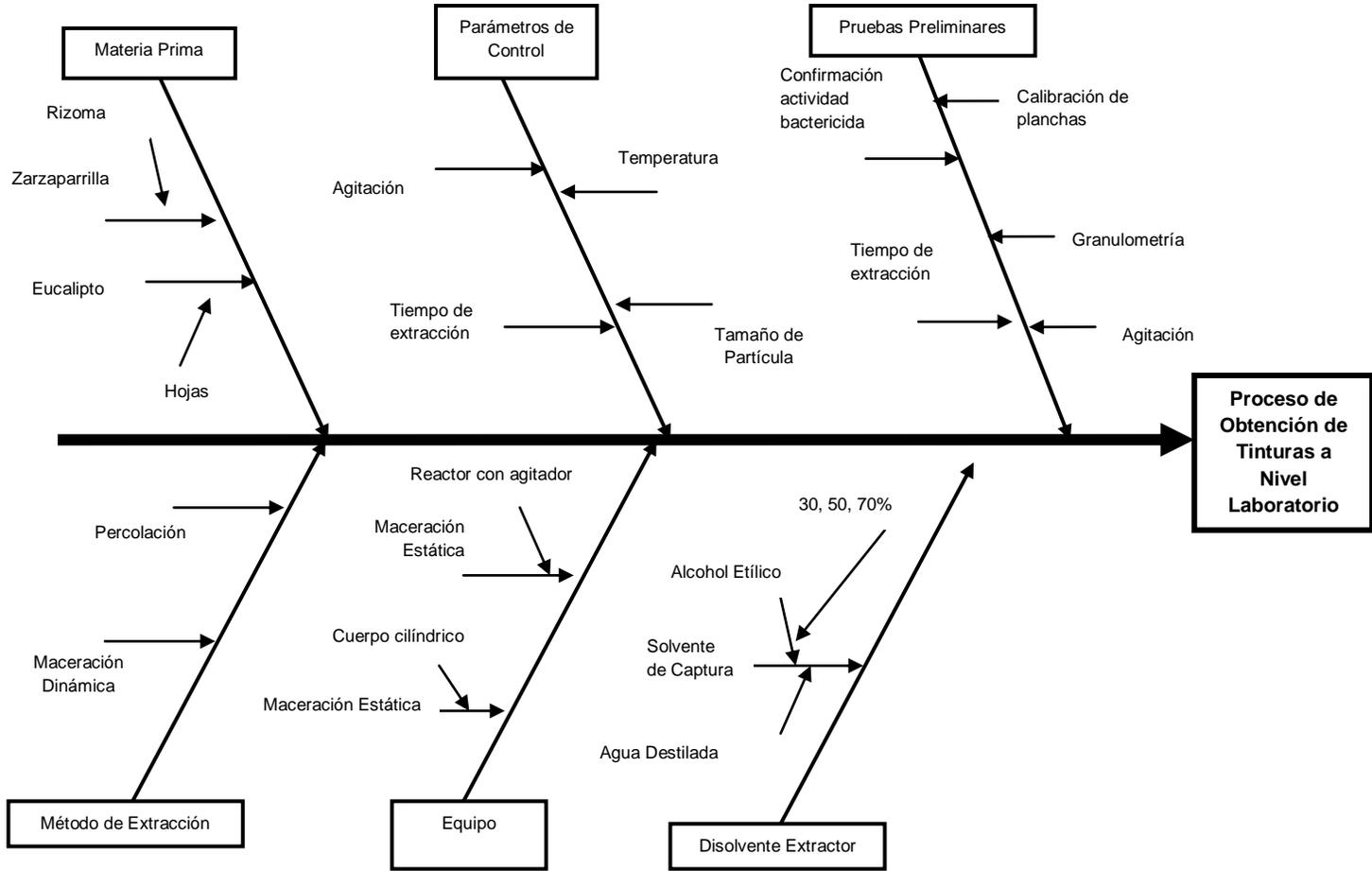
Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. **Tabla de requisitos académicos**



Fuente: metodología experimental



Anexo 1. Diagrama de Ishikawa

