



**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA –CONCYT-
SECRETARIA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA-SENACYT-
FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA -FONACYT-
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

INFORME FINAL

“Evaluación del potencial antioxidante y antimicrobiano del aceite esencial y extractos de laurel (*Litsea guatemalensis*) como preservante en alimentos y cosméticos (Fase II)”

PROYECTO FODECYT No. 07-2012

**Dra. Sully M. Cruz
Investigadora Principal**

Guatemala, Noviembre 2015.



AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología -FONACYT-, otorgado por La Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología -SENACYT- y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología -CONCYT-.

OTROS AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por el aval institucional, la infraestructura brindada, materiales y equipo para la ejecución del proyecto.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), y Depto de Farmacognosia y Fitoquímica de la Escuela de Química Farmacéutica por brindarnos la infraestructura, materiales y apoyo del personal que colaboró para la ejecución del proyecto.

Al Laboratorio de Productos Naturales Farmaya S.A. especialmente a Lic. Armando Cáceres por el apoyo, asesoría y colaboración brindada en el desarrollo de la investigación.

Al equipo de investigación por su compromiso, entrega y dedicación especialmente a Licda. Nereida Marroquín y Lic. Gerber Solórzano.

Al Laboratorio de Alimentos de la Escuela de Nutrición por brindarnos la infraestructura para la elaboración de quesos y chorizos.

Al Laboratorio Microbiológico de Alimentos por apoyarnos en los análisis de control de calidad de los productos elaborados.

RESUMEN

El género *Litsea* tiene 100 especies, 12 en América y 3 en Mesoamérica, *L. glaucescens*, *L. guatemalensis* y *L. neesiana*, siendo las últimas dos endémicas de Guatemala, son especies, aromáticas, condimentarias y medicinales, utilizadas como recursos forestales por las comunidades, que se encuentran distribuidas en diferentes departamentos de Guatemala, de las cuales existe poca información química y biológica, aunque representan una rudimentaria forma de explotación por los lugareños. Durante la fase I del proyecto Fodecyt 51-09, se evaluaron materiales de laurel de tres regiones de Guatemala y distintos puntos donde se comercializa en la capital, se establecieron los parámetros de calidad y se detectaron los marcadores de la especie, se demostró la actividad antioxidante como la más sobresaliente en extractos etanólicos y diclorometánicos y actividad antibacteriana e insecticida en el aceite volátil, por lo que en la fase II se realizó un fraccionamiento para evaluar los extractos activos y proponer un producto con fines agroindustriales como preservante y antioxidante en alimentos y cosméticos.

Se determinó la actividad antioxidante por DPPH mediante cromatografía en capa fina y cuantificación por métodos micrométricos, se realizó la extracción de aceite esencial mediante hidrodestilación y pruebas preliminares en planta piloto. Se determinó cuantitativamente mediante métodos micrométricos la presencia de fenoles totales en las particiones. Se realizó el tamizaje fitoquímico detectando la presencia de cumarinas, flavonoides, alcaloides y sesquiterpenlactonas mediante pruebas macro y semimicro y cromatografía en capa fina. Se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos la presencia de flavonoides expresados en quercetina. Se realizaron pruebas para evaluar la actividad antimicrobiana contra cepas contaminantes de alimentos y hongos filamentosos. Se realizaron las pruebas de auto oxidación para determinar el índice de peróxido empleando lanolina y aceite vegetal. Se realizó el fraccionamiento en columna del extracto procedente de Sololá identificando pinocembrina y escopoletina en la fracción diclorometánica. Se elaboró un queso fresco con aceite esencial de laurel e infusión y un chorizo con hojas de laurel, se realizó la evaluación organoléptica considerándose aceptable y de buen sabor con potencial para su comercialización, y el análisis microbiológico. El gel antibacteriano a partir del extracto etanólico de laurel, evidenció una disminución de la carga bacteriana de las manos después de la aplicación; lo que muestra que el mismo puede ser una alternativa para la desinfección de las manos.

ABSTRACT

The genus *Litsea* has 100 species, 12 in America and 3 in Mesoamerica, *L. glaucescens*, *L. neesiana* and *L. guatemalensis*, the last two being endemic to Guatemala, are species, herbs, seasoning and medicinal, used as forest resources by communities, which are distributed in different departments of Guatemala, of which there is little chemical and biological information, although representing a rudimentary form of exploitation by locals. During Phase I of the project Fodecyt 51-09, laurel materials in three regions of Guatemala and other places where it is marketed in the capital were evaluated, the quality parameters markers were established and the species is detected, the activity was demonstrated as the most outstanding antioxidant in ethanolic and dichloromethane extracts and antibacterial and insecticidal activity in the volatiles oils, so in phase II fractionation was performed to assess the active extracts and propose a product with industrial farming purposes as preservative and antioxidant in foods and cosmetics.

DPPH antioxidant activity was determined by thin layer chromatography and quantification by micrometer methods, the essential oil extraction was performed by hydrodistillation and preliminary tests in pilot plant. The presence of total phenols in the partitions are determined quantitatively by methods micrometer. Phytochemical screening was performed by detecting the presence of coumarins, flavonoids, alkaloids and sesquiterpenlactones by testing macro and semi-micro and thin layer chromatography. It was quantified by spectrophotometric methods the presence of flavonoids expressed in quercetin. Tests were conducted to evaluate the antimicrobial activity against strains of food contaminants and filamentous fungi. Auto oxidation tests were conducted to determine the peroxide value using vegetable oil and lanolin. The fractionation was performed in the extract from column Solola identifying pinocembrin and scopoletin in dichloromethane fraction. A fresh cheese with essential oil of laurel and infusion and a sausage with laurel leaves was prepared, sensory evaluation was performed it considered acceptable and palatable with potential for commercialization, and microbiological analysis. Antibacterial gel from the ethanol extract of laurel, showed evidence a decrease in bacterial load of hand after application; it is showing that the same may be an alternative for hand disinfection.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
TABLA DE CONTENIDOS	iii
PARTE I	
I.1 INTRODUCCIÓN	1
I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
I.2.1 Antecedentes en Guatemala	
I.2.2 Justificación del trabajo de investigación	10
I.3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	11
I.3.1 Objetivos	
I.3.1.1 General	
I.3.1.2 Específicos	
I.3.2 Hipótesis	
I.4 METODOLOGÍA	12
I.4.1 Localización	
I.4.2 Variables	
I.4.2.1 Variables dependientes	
I.4.2.2 Variables independientes	
I.4.3 Indicadores	
I.4.4 Estrategia metodológica	
I.4.4.1 Población y muestra	
I.4.5 El Método	
I.4.6 La Técnica Estadística	
I.4.7 Los Instrumentos a utilizar	
PARTE II	19
MARCO TEÓRICO	
PARTE III	
III. RESULTADOS	43
III.I DISCUSIÓN DE RESULTADOS	67
PARTE IV	
IV.1 CONCLUSIONES	77

IV.2 RECOMENDACIONES	79
IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	80
IV.4 ANEXOS	86
PARTE V	
V. INFORME FINANCIERO	105

PARTE I

I.1 INTRODUCCIÓN

Los productos naturales constituye todavía una fuente de alto potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos, nutraceúticos, alimentos, aditivos, cosméticos, etc, solamente de un 10% a un 15% del total de plantas superiores han sido investigadas con el fin de encontrar nuevos principios farmacológicamente activos.

En Guatemala existen especies aromáticas y medicinales de las cuales no se cuenta en su mayoría con la caracterización química y estudios de fraccionamiento que tiendan al desarrollo e innovación de nuevos productos, la gran mayoría de materias primas utilizados en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica, son importadas y no se le da un valor agregado a los recursos naturales con que cuenta el país para fomentar su aprovechamiento, conservación y manejo sostenible.

La naturaleza, más que la síntesis, ha demostrado una gran capacidad de proporcionar substancias realmente innovadoras, ya sea por sus estructuras químicas o por la singularidad de sus mecanismos de acción. Estas moléculas a menudo tienen funciones específicas y muchas de ellas tienen actividades biológicas que pueden ser útiles para los seres humanos, plantas y animales. También pueden constituirse en moléculas cabezas de serie para el desarrollo de nuevos fármacos, cosméticos, aditivos o convertirse en herramientas indispensables de investigación clínica. Los intentos que hace la industria para integrarlos en los programas de descubrimiento de fármacos, cosméticos, nutraceúticos, colorantes, plaguicidas, fertilizantes entre otros, dan una idea del interés actual en los productos naturales.

De las casi 400,000 especies de plantas del planeta sólo se han investigado fitoquímicamente un pequeño porcentaje y la cantidad sometida a selección biológica o farmacológica es incluso más pequeña. Un extracto puede contener una infinidad de metabolitos secundarios diferentes y cualquier investigación fitoquímica revelaría solo un espectro limitado de sus constituyentes. El reino vegetal representa un resorvorio enorme de moléculas valiosas que pueden tener una aplicación medicinal, cosmética, alimenticia y agroindustrial.

La región Mesoamericana se caracteriza por una alta diversidad biológica y cultural, sobresaliendo el uso tradicional de especies vegetales muchas veces endémicas, por lo que no se tiene información que valide su uso popular ni características fisicoquímicas, toxicológicas y farmacológicas. Es por ello que se justifica la necesidad de controlar el proceso de producción desde su inicio, es decir, desde el momento de la recolección del material a estudiar, durante el cultivo y manejo poscosecha, evaluar la actividad biológica y composición química bajo parámetros científicos, para la transformación y fabricación de un preparado, para su uso en la comunidad, por lo cual el estudio de la flora nativa es de suma importancia para garantizar la calidad bajo la aplicación de las normas de buenas prácticas.

La gran mayoría de investigaciones validan el conocimiento popular, se generan algunos datos, pero no se llega a las fracciones o compuestos activos, no se optimizan los procesos para el escalamiento, innovación y desarrollo de nuevos productos en base a las propiedades encontradas, no se explora el potencial de una especie promisoría, es por ello que en el presente proyecto se continuó con el estudio de laurel *L. guatemalensis* (laurel), ya que en la Fase I de investigación se evidenció actividad interesante como antioxidante, antimicrobiano e insecticida, por lo que se diseñó la propuesta de un producto natural de uso agroindustrial con el objetivo de fomentar la conservación y aprovechamiento de dicha especie y propiciar el desarrollo de nuevos productos naturales utilizados como preservantes en alimentos y cosméticos.

El género *Litsea* tiene 100 especies, 12 en América y 3 en Mesoamérica, *L. glaucescens*, *L. guatemalensis* y *L. neesiana*, siendo las últimas dos endémicas de Guatemala, son especies, aromáticas, condimentarias, medicinales, utilizadas como recursos forestales por las comunidades, que se encuentran distribuidas en diferentes departamentos de Guatemala, de las cuales existe poca información química y biológica. Por lo que la fase I del proyecto Fodecyt 51-09, se evaluaron materiales de laurel de 03 regiones de Guatemala y distintos puntos donde se comercializa en la capital, se establecieron los parámetros de calidad y se detectaron los marcadores de la especie, se demostró la actividad antioxidante como la más sobresaliente en extractos etanólicos y diclorometánicos y actividad antibacteriana e insecticida en el aceite volátil, por lo que en la fase II se realizó un fraccionamiento para evaluar los extractos activos y proponer un producto con fines agroindustriales como preservante y antioxidante en alimentos y cosméticos.

Por lo que a través de esta investigación se contribuyó a enriquecer el estudio químico y biológico de dicha especie tan utilizada por las diversas comunidades de nuestro país como un sustituto de Laurel Europeo (*Laurus nobilis*) y se diseñó un producto como preservante y antioxidante de uso agroindustrial, para darle un valor agregado para un mejor aprovechamiento de las poblaciones donde se distribuye dicha especie.

I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

I.2.1 Antecedentes en Guatemala

Especies y aceites esenciales han sido utilizados en la industria alimenticia como agentes naturales para extender la vida útil de los alimentos. Una gran variedad de plantas y especias se han usado para reducir o eliminar bacterias patógenas y mantener la calidad de los productos alimenticios (Angioni et al., 2004; Arques et al., 2008, Davidson & Naidu, 2000; Holley & Patel, 2005, Periago et al., 2006; Santos & Rao, 2001; Silva et al., 2007). Alrededor de 1340 plantas se han investigado sus compuestos antimicrobianos y alrededor de 30,000 componentes se han aislado de plantas, muchos grupos fenólicos y aceites esenciales han sido utilizados en la industria de alimentos, sin embargo la caracterización de las propiedades preservantes para el uso comercial está disponible en muy pocas especies y aceites volátiles.

En Guatemala se han realizado diversos estudios de validación, desde 1976 al 2003 se han estudiado alrededor de 637 especies vegetales mediante encuestas etnobotánicas en colaboración con CEMAT, Laboratorio de Productos Naturales Farmaya y la Universidad de San Carlos de Guatemala, en la cual se han estudiado diferentes etnias tales como quiché, cakchiquel, mam, tuzuthil, achí, kekchí, garífuna, kanjobal, pocomchí; así como algunos estudios de bioprospección en la Sierra de las Minas y áreas protegidas (Cáceres, et al., 2001).

Respecto a la investigación de actividad biocida se han evaluado alrededor de 250 especies con actividad antibacteriana de las cuales el 15% ha mostrado alguna actividad contra bacterias gramnegativo y grampositivo; actividad antifúngica han sido estudiadas alrededor de 100 especies de las cuales el 12% ha mostrado actividad contra *Candida*, *Cryptococcus*, dermatofitos subcutáneos; respecto a la actividad antiprotozoaria se han evaluado 89 especies de las cuales el 12% han mostrado actividad contra *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Entamoeba*; actividad antimicobacteriana se han evaluado 16 especies de las cuales el 12% han mostrado actividad y larvicida se han evaluado 60 especies de las cuales alrededor de 6% ha mostrado cierta actividad. Recientemente se ha evaluado actividad inmunomoduladora, antioxidante, inhibidoras de acetilcolinesterasa y trabajos colaborativos han permitido evaluar actividad anticáncer, elucidar y aislar algunos compuestos químicos, pero son muy pocas las que han pasado a fraccionamiento, ensayos clínico y formulación de productos.

Derivado de investigaciones de tesis y proyectos de investigación se han identificado especies con potencial en diferentes áreas, lo cual se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1.
Especies vegetales promisorias

ESPECIE VEGETAL	NOMBRE	A	B	C	D	E
<i>Bixa orellana</i>	Achiote	★		★		
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Nance	★	★	★		Tanino
<i>Gliricidia sepium</i>	Madrecacao	★	★			Pesticida
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	★			★	Antioxidante
<i>Litsea guatemalensis</i>	Laurel	★			★	Antioxidante
<i>Neurolaena lobata</i>	Tres puntas	★				Amargo
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Calahuala	★		★		Cosmético
<i>Rhizophora mangle</i>	Mangle rojo	★		★		Antioxidante
<i>Smilax domingensis</i>	Zarzaparilla	★		★		Antioxidante
<i>Solanum nigrescens</i>	Macuy	★	★			Fertilizante
<i>Tagetes lucida</i>	Pericón	★		★	★	Pesticida
<i>Tecoma stans</i>	Timboco	★		★		
<i>Valeriana prionophylla</i>	Valeriana	★			★	

A: Medicina; B: Alimento; C: Colorante; D: Aroma/Condimento; E: Otro

Género *Litsea*

El género *Litsea* se caracteriza por árboles siempreverdes, dioicos, con hojas alternas e inflorescencias umbeliformes. Flores con perianto de 6 segmentos y 9-12 estambres. Fruto en baya rodeado por el tubo del perianto persistente e inflado (Jiménez & Lorea, 2009). Comprende alrededor de 100 especies, 11 en América reconocidas por

Bartlett (1909). En un trabajo posterior realizado por Allen (1945) describió 4 especies para México y Centro América. *L. muelleri* Rehder, *L. pringlei* Bartlett (incluyendo *L. novoleontis* Bartlett), *L. parvifolia* Mez (incluyendo *L. pedicellata* Bartlett) y *L. glaucescens* Kunth con 3 variedades *L. glaucescens* var. *glaucescens*, *L. glaucescens* var. *schaffneri* (Bartlett) C.K. Allen y *L. glaucescens* var. *flavescens* (Bartlett) C.K. Allen. Se consideró a *L. neesiana* (Schauer) Hemsl., *L. guatemalensis* Mez y *L. orizabae* Mez como sinónimo de *L. glaucescens* var. *glaucescens*.

En la práctica algunos botánicos reconocen 3 complejos de especies: El complejo de *L. glaucescens* (*L. glaucescens* + *L. guatemalensis* + *L. flavescens* + *L. neesiana* + *L. orizabae* + *L. schaffneri*), el complejo *L. parvifolia* (*L. pedicellata* + *L. parvifolia*) y el complejo de *L. pringlei* (*L. pringlei* + *L. novoleontis*) (Jiménez & Lorea, 2009).

El complejo de *L. glaucescens* está ampliamente distribuido desde el Norte de México hasta Costa Rica, siendo la de mayor abundancia *L. guatemalensis* (Jiménez & Lorea, 2009); son especies aromáticas, condimentarias, medicinales, utilizadas como recursos forestales por las comunidades, las cuales existe poca información química y biológica.

El género *Litsea* de afinidad templada no posee especies endémicas en el sur de México, pero a nivel nacional llega al 66% de endemismo. Es probable que el origen del patrón de reparto del endemismo en las lauráceas esté vinculado no propiamente con un hábitat particular, sino en cómo se distribuye éste (continuo o fragmentado) (Lorea, 2002).

Algunas especies asiáticas y europeas del género *Litsea* han presentado una química y actividad farmacológica interesante que puede estudiarse en las especies nativas para la búsqueda de nuevas propiedades y así darles un mejor aprovechamiento. Tal es el caso de *L. cubeba*, la cual presentó actividad antioxidante en extractos metanólicos por las pruebas de DPPH, peroxidasa/guaiacol y TBA comparables con ácido ascórbico y α -tocoferol (Hwang et al. 2005). Fueron evaluados 11 constituyentes del aceite esencial de las hojas de *L. cubeba* contra *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* (mosquito) de los cuales 5 (1% en solvente 100 μ L) mostraron ser repelentes (Amer & Mehlhorn, 2006).

La corteza de *L. elliptibacea* presentó inhibición sobre los receptores 5HT₁, involucrados en desórdenes del sistema nervioso central, presentando un porcentaje promedio de inhibición de 84 \pm 1 (Chung et al. 2005). Los flavonoides totales de las hojas de *L. coreana* presentaron efectos preventivos sobre el modelo de esteatosis hepática inducida por dieta alta en grasa en ratas, reduciendo los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST); disminuyendo la acumulación de lípidos en suero e hígado, además de incrementar la expresión de PPAR α posiblemente por su acción antioxidante (Wang et al., 2009).

Se aislaron seis compuestos nor-neolignanicos, dehidroximetilailantoidol y 5 butanólicos de las hojas de *L. acutivena*, los cuales mostraron significativa actividad citotóxica *in vitro* contra líneas celulares P-388, A549 (adenocarcinoma humano de pulmón) y HT-29 (carcinoma humano de colon) (Cheng et al., 2001).

Los flavonoides de las hojas de *L. japonica* (epicatequina, afzelina, quercitrina y tilirósido) presentaron actividad inhibitoria del complemento con una CI₅₀ de 101-440 μ M, representando una especie promisoría en afecciones del sistema inmune y como

antiinflamatoria (Lee *et al.*, 2005). Además se ha utilizado como alimento en Corea (Lee, 1996), en estudios previos de la composición química se han reportado ácidos grasos, lactonas, alcaloides, terpenoides y aceite esencial (Takeda *et al.*, 1972; Nii *et al.*, 1978; Tanaka *et al.*, 1990)

Una revisión del género *Litsea* reporta la presencia de amidas, alcaloides, flavonoides, esteroides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, ácidos grasos, lignanos, butanólidos y butenolactonas (Agrawal, *et al.*, 2011).

***Litsea glaucescens* Kunth y *L. guatemalensis* Mez.**

Sinonimias:

L. guatemalensis: *L. acuminatissima* Lundell, *L. matudau* Lundell; *Tetranthera glaucescens* var *subsolitaria* Meisn. (Cáceres, 2009).

L. glaucescens: *Tetranthera glaucescens* var *subsolitaria* Meisn, *Litsea glaucescens* var *subsolitaria* (Meisn.) Hemsl., *L. guatemalensis* Mez., *L. flavescens* Bartlett, *L. schaffneri* Bartlett, *L. pallens* Lundel, *L. neesiana* (Schauer) Hemsl., *L. orizabae* (Mart. et Gal.) Mez. (Lorea, 2002).

Nombres populares:

L. guatemalensis: Aguarrel, laurel, laurelillo, spac-tzé, sufricalla, zit-zuch (Cáceres, 1996).

L. glaucescens: Tzil tzil ujch', tzijtzil ujch, uich te' (tzeltal), tzij uch (tzotzil) (Chiapas); li gua dsí, ma qu loh (chinanteco en Oaxaca), laurel (Veracruz, México, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Baja Verapaz, Chimaltenango, Quetzaltenango y Guatemala); laurill (Zacatecas, Nayarit y Jalisco); laurillo (Michoacán); laurel de la Sierra (Sinaloa); laurel aromático (Petén), laurel de especie (El Salvador); sufricalla, sufricaya o sufricago (Veracruz) y zin-uch (Chiapas) (Tucker, 1992).

Parte utilizada: Hojas

Descripción botánica:

L. glaucescens es un árbol de 3-12 m de alto, ramas glabras. Hojas coriáceas, peciolo 18 mm de largo, lanceoladas, perinervadas. Inflorescencia en racimos axilares, 4-9 flores unisexuales. Fruto en drupa, negro, 7-9 mm de diámetro, rodeado por una cúpula (Standley & Steyermark, 1946).

L. guatemalensis es un árbol de 6 m de alto, ramas delgadas caféas. Hojas coriáceas, peciolo 1.5 cm de largo, elíptico-lanceoladas, 8 cm de largo, agudas en la base, lustrosas, glabras. Flores axilares, pedúnculo simple, solitarias, 15 mm de largo, 5-11 flores; brácteas de involucro deciduo; filamentos glabros (Standley & Steyermark, 1946).

Hábitat:

L. glaucescens es nativo de México y Centro América; se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Huehuetenango, Quetzaltenango, San Marcos y Zacapa, se ha descrito en la sierra de los Cuchumatanes y la cadena volcánica de Guatemala entre 1,300 3,100 msnm (Islebe & Cleff, 1994).

L. guatemalensis es endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1,500-3,150 msnm; descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá. Se ha descrito como un árbol endémico de la zona del altiplano, ampliamente usado para sazonar comidas. Se ha encontrado en bosque mixto, bosque húmedo montano bajo y muy húmedo montano de 2,000 a 3,100 msnm, en comunidades con especies pionera como aliso (*Alnus* sp). En el Volcán Tolimán se ha encontrado en bosques secos de aliso-encino-laurel (Cáceres, 2009).

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

Usos y propiedades medicinales: Ambas especies se usan indistintamente como si fuera el laurel europeo (*L. nobilis*). Hernández en 1790 la menciona como medicina del viento con el nombre nahuatl *Ecapátli* y describe algunas de sus propiedades medicinales (Linares, *et al.*, 1990). Las hojas se aplican oralmente y en baños para diversas afecciones digestivas y femeninas (Argueta *et al.*, 1994) y en sahumeros se usan para tratar la parálisis, aliviar el cansancio y la epilepsia de los niños (Tucker *et al.*, 1992), extendiéndose su uso oral y tópico hasta El Salvador (Mena, 1994) y Honduras (House *et al.*, 1995). El cocimiento o infusión de hojas por vía oral se usa para el tratamiento de afecciones respiratorias y gastrointestinales (cólico, diarrea, disentería), carencia de leche en la madre e hinchazón, cáncer (Cáceres, 2009; García-Alvarado *et al.*, 2001; Giovannini & Heinrich, 2009; Martínez, 1969; Márquez *et al.*, 1999).

Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia; en sahumeros se usa para parálisis y en gargarismos para la inflamación de la garganta. Se le atribuye propiedad aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espasmolítica, febrífuga y pectoral. Las hojas tienen un amplio uso como condimento (Cáceres, 2009).

En un estudio se caracterizó el sistema ganadero e identificó el potencial nutricional y conocimiento local de árboles y arbustos forrajeros en dos comunidades de Chiapas, México de las cuales *L. glaucescens* se clasificó dentro de las 13 especies de mayor utilidad en dicha comunidad, reportando usos medicinales, condimentarios, ornamentales y utilizado como leña (Jiménez *et al.* 2007; Estrada *et al.*, 2007).

Las especies *L. glaucescens* y *L. neesiana* (tzi'tz'il ujch') se encuentran dentro de las especies del cuadro básico de la farmacopea tzeltal-tzotzil (Berlín, 1998). Se reporta en Oaxaca México, el uso médico por estudios etnobotánicos de las hojas de *L. glaucescens* (Frei *et al.*, 1998).

Farmacología experimental y clínica: Se realizó un estudio utilizando las hojas de *L. glaucescens* colectada en Huitán, Quetzaltenango, se evaluaron las infusiones a tres diferentes concentraciones (5, 10 y 20%), obteniendo como resultados que la infusión al

20% presentó un promedio de inhibición de 13.80% contra *Streptococcus mutans* y de 6.7% contra *Lactobacillus acidophilus* (Alvarez, 1999), mientras que la infusión al 10% presentó una inhibición de 13.40% contra *Streptococcus mutans*.

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

El extracto etanólico de la corteza seca de *L. glaucescens* tiene actividad contra *A. salina* (160 ppm). La infusión de las hojas no tiene actividad espasmolítica en duodeno aislado de rata (Cáceres, 2005).

Hernández (2007) realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria de las infusiones al 10% a dosis de 750 y 1000 mg/Kg, determinando que no presentó dicha actividad. Los extractos metanólicos de *L. neesiana* y *L. glaucescens* presentaron una actividad antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Meckes et al., 1995). El extracto metanólico de *L. glaucescens* presentó un efecto contráctil muscular moderado sobre el jejunio mostrando una CI_{50} de 885 ± 125 μ g/mL (Cortés et al., 2004).

El extracto etanólico de *L. guatemalensis* presentó actividad contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/mL y contra *S. aureus* y *Salmonella typhi* a 1 mg/mL. Ninguno de los extractos vegetales evaluados presentó actividad antimicótica, citotóxica y larvicida. El aceite esencial de *L. guatemalensis*, colectada en San Lucas Sacatepéquez, no presentó ninguna actividad antibacteriana, antilevadura, antimicótica, citotóxica ni larvicida (Cruz, et al., 2008). La presencia de limoneno en el aceite esencial reduce la dismenorrea por inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas (Cáceres, 2009).

Composición química: En la revisión de literatura en *Chemical Abstracts* y NAPRALERT se encontró poca información sobre la composición química de las dos especies nativas del país. Por su olor característico similar a *L. nobilis*, se describe que tiene un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoleico (Cáceres, 1996).

El aceite esencial de *L. glaucescens* contiene 1,8-cineol (22%), sabineno (13%), terpineno-4-ol (10%), α -terpineno (9%), acetato de α -terpinilo (7%), acetato de nerilo (7%), β -pineno (5%), sabineno y α -pineno (4%). El extracto etanólico de la corteza contiene flavanonas (pinostrobina, pinocembrina y dihidrochalconas) (López et al., 1995). Se reporta 6.9% de fenoles totales como equivalentes a ácido tánico, no se detectaron alcaloides ni glicósidos cianogénicos (Jiménez, et al., 2007).

Algunos estudios realizados en las hojas de *L. guatemalensis* han reportado que el aceite esencial contiene 1,8-cineol (26 - 49.6%), α -terpineol (14%), linalol (10%), terpinen-4-ol (6%) y 70 compuestos más (Svoboda & Parks, 1950; Vallverdú et al., 2005). Otro estudio demuestra que las hojas de *L. guatemalensis* colectadas en San Lucas Sacatepéquez, presentaron un porcentaje de rendimiento de aceite esencial de 0.70, identificando nueve constituyentes siendo el compuesto mayoritario 1,8-cineol (61.34%) el cual es de importancia como saborizante, fragancia en cosmética y en medicina se ha utilizado en infecciones respiratorias y en el alivio de la inflamación y dolor (Cruz, et al., 2008).

Pérez (2006), describe la composición química del laurel (*L. guatemalensis*)

colectada en la aldea San Bernabé, municipio de Parramos, Chimaltenango colectada en 2004; obteniendo un porcentaje de rendimiento del 0.8% de aceite esencial, identificando dentro de los constituyentes mayoritarios, (*Z*) nerolidol (23.2%), linalool (23%), 1,8 cineol (15.5%), terpinen-4-ol (7%), cis-diidrocarvona (4.5%) y α -terpineol (0-7%), los cuales pueden ser promisorios en la industria farmacéutica y cosmética, por lo que sugiere estudiar otras poblaciones para investigar el polimorfismo químico y evaluar las diferentes calidades de aceite esencial.

El aceite esencial de *L. guatemalensis* y *L. glaucescens* tiene el olor característico pero difieren en su composición química, contienen 10 compuestos más que *L. nobilis* y hay 17 compuestos comunes a ambos (Cáceres, 2009).

Los metabolitos secundarios presentes en *L. guatemalensis*, según el tamizaje fitoquímico realizado en extractos etanólicos mediante cromatografía en capa fina y pruebas de coloración, fueron flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenoides, taninos, cumarinas y saponinas y en extractos diclorometánicos los metabolitos detectados fueron esteroides y triterpenoides y cumarinas (Cruz *et al.*, 2008).

El análisis proximal de las hojas de *L. guatemalensis* indica que contiene 329 cal, 8% de agua, 13.7% de proteínas, 7% de grasas, 66% de carbohidratos, 23.7% de fibra, 4.9% de ceniza, 803 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de calcio, 114 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de fósforo, 15 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de hierro, 8300 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de caroteno, 0.10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de tiamina, 0.65 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de riboflavina, 2.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de niacina (Duke & Atchley, 1986). La especie *L. glaucescens* reporta un 10.4% de proteína cruda, 46.1% de fibra, 39.2 % de digestibilidad y 4.2 Mcal/Kg de energía (Jiménez *et al.*, 2007).

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

Contraindicaciones: No prescribir el aceite esencial durante el embarazo, ni en pacientes con gastritis, colitis y úlcera péptica (Cáceres, 2009).

Precauciones y reacciones adversas: El aceite puede producir dermatitis de contacto y fenómenos de fotosensibilización, en altas dosis puede ser tóxico al Sistema Nervioso Central (Cáceres, 2009).

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

Para su uso tópico se recomienda la decocción en el tratamiento de estomatitis, faringitis y sinusitis, también puede ser usada como colutorio, gargarismo o compresa; en alcoholato o pomada se usa como antirreumático, pediculicida y parasiticida (Cáceres, 1996).

I.2.2 **Justificación del trabajo de investigación**

La región Mesoamericana se caracteriza por una alta diversidad biológica y cultural, sobresaliendo el uso tradicional de especies vegetales muchas veces endémicas, algunas especies cuentan con información sobre composición química y acción farmacológica, pero la gran mayoría de especies no cuenta con estudios de fraccionamiento para la elucidación estructural, potencial toxicológico, estudios clínicos y raramente se llega a la propuesta de formulación de nuevos productos a base de extractos bioactivos que puedan ser comercializados a nivel industrial.

El uso y la comercialización de productos naturales con fines medicinales y/o aromáticos muestran un crecimiento acelerado en los últimos años, a nivel global lo que se traduce en el aumento significativo en la demanda mundial por este tipo de productos. En ese contexto resulta preocupante el hecho que en la mayoría de los casos estos productos no cuentan con los estándares mínimos de calidad, lo que representa un riesgo para la salud de sus consumidores, ya que muchas de las especies utilizadas especialmente en Mesoamérica, no cuentan con estudios de fraccionamiento, formulación y estabilidad. Por lo que es necesario promover e incentivar el estudio multidisciplinario de los productos naturales para garantizar su calidad, seguridad y eficacia. Además del potencial inexplorado de los aceites esenciales de las especies aromáticas como es el caso de las especies del género *Litsea* (Laurel aromático).

Los productos naturales están implicados en el desarrollo de 52% de todos los medicamentos nuevos lo que constituye un factor real de desarrollo para la agroindustria farmacéutica de la región.

Es por ello que se justifica la necesidad de darle continuidad a los estudios para controlar el proceso de producción desde su inicio, es decir desde el momento de la recolección de la droga, durante el cultivo y manejo poscosecha hasta el proceso de transformación y fabricación de los productos naturales.

Así mismo a nivel alimenticio y cosmético, la contaminación microbiológica y oxidación de los productos constituyen la principal limitante de la producción, por lo cual se hace imprescindible el estudio de nuevas vías para su control, siendo una de ellas el uso de extractos vegetales y aceites volátiles que actúan como biocontroladores, debido a la presencia de metabolitos secundarios, los cuales se incluyen en el desarrollo de agrosistemas sostenibles, basados en un manejo integrado sin alterar el equilibrio del sistema y apariencia de los productos.

Los aditivos naturales a partir de extractos vegetales constituyen una interesante alternativa, por lo que las perspectivas futuras en investigación son aún mayores ya que ofrecen seguridad para el ambiente, salud humana y son una eficiente opción agronómica.

I.3 OBJETIVOS E HIPOTESIS

I.3.1 Objetivos

I.3.1.1 General

Evaluar el potencial antioxidante y preservante de extractos y aceite esencial de laurel (*L. guatemalensis*) para el diseño de un producto natural utilizado en alimentos y cosméticos.

I.3.1.2 Específicos

I.3.1.2.1 Fraccionar extractos activos de laurel (*L. guatemalensis*) mediante partición líquido-líquido, cromatografía en columna y evaluar su actividad antioxidante y antimicrobiana.

I.3.1.2.2 Evaluar el potencial antioxidante y preservante del aceite esencial de laurel en alimentos y cosméticos.

I.3.1.2.3 Caracterizar el aceite esencial de laurel mediante pruebas piloto para el escalamiento industrial y estudio de factibilidad para su comercialización como una alternativa de los preservantes químicos.

I.3.1.2.4 Proponer, diseñar y evaluar un producto natural a base de extractos o aceite esencial de laurel como un preservante y antioxidante natural para la industria de alimentos y cosméticos

I.3.1.2.5 Divulgar a las autoridades, actores sociales e institucionales en el campo de su competencia la información obtenida.

I.3.2 Hipótesis

Los extractos y aceite esencial de *L. guatemalensis* muestran una buena actividad antioxidante comparados con los antioxidantes sintéticos.

El aceite esencial de *L. guatemalensis* muestra actividad antimicrobiana interesante contra algún microorganismo que ocasiona contaminación en alimentos y cosméticos.

I.4 METODOLOGIA

I.4.1 Localización

El estudio se realizó en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

I.4.2 Las Variables

I.4.2.1 Variables dependientes

Extractos de *Litsea guatemalensis*

I.4.2.2 Variables Independientes

Composición química

Actividad biológica.

I.4.3 Indicadores

Metabolitos secundarios

Productos de aplicación alimenticia utilizando infusión, droga vegetal de laurel (chorizo, queso), de aplicación cosmética empleando un extracto (gel antibacterial).

I.4.4 Estrategia Metodológica

I.4.3.1 Población y Muestra

Población: Especies de *L. guatemalensis*

Muestra: Extractos de *L. guatemalensis*

I.4.5 El Método

Fraccionamiento bioguiado y extracción de aceite esencial a nivel laboratorio y planta piloto

A partir de extractos etanólicos y diclorometánicos de diferentes procedencias obtenidos en el proyecto Fodecyt 51-09 se seleccionaron aquellos que presentaron la mayor actividad, se realizó una partición líquido líquido con diferentes disolventes (Hexano, acetato de etilo, butanol) a los cuales se evaluó la actividad, posteriormente se realizó una cromatografía en columna del extracto activo para separar algunas fracciones y evaluar nuevamente su actividad.

La extracción del aceite esencial se realizó de los individuos que reportaron mejor rendimiento en el estudio anterior, mediante la técnica de hidrodestilación utilizando un equipo Neoclevenger según la Farmacopea Europea (2001), realizando las repeticiones necesarias hasta obtener la cantidad de aceite necesaria para evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana (Solis *et al*, 2005; Vila & Reing, 2003).

Se realizaron extracciones de aceite esencial empleando mayores cantidades de material vegetal para reproducir los resultados a nivel laboratorio en planta piloto, se registraron los cambios que se presentaron y los problemas que aparecían en cada incremento para realizar los ajustes al proceso, aplicando los principios de similaridad y análisis dimensional para el escalamiento industrial.

6.8.2 Detección de marcadores de la especie mediante pruebas cualitativas y cuantitativas:

6.8.2.1 Investigación de flavonoides y antocianinas:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30 mL de metanol al 80 por ciento, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético.

Tubo 7: testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

Cromatografía en capa fina: Extraer 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la solución y aplicar sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µL). (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10)

Detección:

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

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm.

Solución 1: solución metanólica al 1 por ciento de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).

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

6.8.2.2 Análisis de Cuantitativo de Flavonoides por Espectrofotometría UV/VIS (método según Real Farmacopea Española 2002).

Disolución madre. En un matraz de fondo redondo de 100 ml colocar 0.8 g de droga pulverizada (500), 1 ml de una disolución de 5 g/l de hexametilentetramina, 20 ml de acetona y 7 ml de ácido clorhídrico. Calentar a ebullición la mezcla a reflujo durante 30 min. Filtrar el líquido a través de algodón hidrófilo a un matraz de 100 ml. Añadir el algodón hidrófilo al residuo en el matraz de fondo redondo y extraer dos veces con 20 ml, cada vez, de acetona, calentando a ebullición a reflujo cada una de las veces durante 10 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente, filtrar el líquido a través de algodón hidrófilo y después filtrar las disoluciones de acetona reunidas a través de un papel de filtro a un matraz aforado y diluir hasta 100 ml con acetona lavando el matraz y el filtro. Poner 20 ml de la disolución en una ampolla de decantación, añadir 20 ml de agua y extraer la mezcla una vez con 15 ml y luego tres veces con 10 ml, cada vez, de acetato de etilo. Reunir los extractos de acetato de etilo en una ampolla de decantación, lavar dos veces con 50 ml, cada vez, de agua, filtrar el extracto sobre 10 g de sulfato de sodio anhidro a un matraz aforado de 50 ml y diluir hasta 50 ml con acetato de etilo.

Disolución problema. A 10 ml de la disolución madre añadir 1 ml de reactivo de cloruro de aluminio y diluir hasta 25 ml con una disolución al 5 % V/V de ácido acético glacial en metanol.

Disolución de compensación. Diluir 10 ml de la disolución madre hasta 25 ml con una disolución al 5 % V/V de ácido acético glacial en metanol.

Medir la absorbancia de la disolución problema después de 30 min, por comparación con la disolución de compensación a 425 nm.

Calcular el contenido en porcentaje de flavonoides, calculado como hiperósido, a partir de la expresión:

tomando la absorbancia específica del hiperósido como 500 nm.

A = absorbancia a 425 nm,

m = masa de la sustancia a examinar en gramos.

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

6.8.3 Evaluación de la actividad antioxidante:

Método de TLC: Aplicar 10 μ L de muestra y 5 μ L del estándar antioxidante terc-butil-hidroquinona (TBHQ) en una placa cromatográfica de silica gel 60F₂₅₄. Colocar la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo:ácido acético:ácido fórmico:agua (100:11:11:26). Secar y asperjar con DPPH (1mg/mL en metanol). Resultados: Si los extractos presentan actividad antioxidante se observará la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

Método colorimétrico: DPPH es un radicales libres utilizado para evaluar la actividad atrapadora de radicales de un compuesto o extracto vegetal (Ravishankara *et al.*, 2002). Se prepara una serie de cuatro tubos de reacción por ensayo. Al primer tubo que es el blanco del control se le agrega 1 mL de una solución tampón de acetato y 2 mL de metanol. Al segundo tubo control, se le agrega 1 mL de tampón de acetato, 1.5 mL de metanol y 0.5 mL de solución metanólica de DPPH (0.0219 % p/v). Al tercer tubo, blanco del ensayo, se le agrega 1 mL de tampón de acetato, 1.4 mL de metanol, 0.1 mL de extracto de la muestra y 0.5 mL de solución de DPPH. Al cuarto tubo, ensayo, se le agrega 1 mL de tampón de acetato, 1.4 mL de metanol, 0.1 mL del extracto y 0.5 mL de solución de DPPH. Se agita en vortex por 30 seg e incuba a temperatura ambiente por 30 min. Se realiza la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (517 nm) contra el blanco respectivo. Se calcula el porcentaje de disminución de la abs causado por el extracto $(Abs\ b\ control - Abs\ e) / Abs\ control * 100 = \% \text{ dis Abs}$. Se grafica la concentración del extracto (eje x) vrs % dis Abs (eje y). Se interpola el valor de IC₅₀. La actividad antioxidante se expresa en términos de la concentración de inhibición al 50% (IC₅₀) que es la concentración del extracto requerida para disminuir un 50% la absorbancia de DPPH (Lima, 2003).

Autooxidación:

Pesar cuarenta gramos de muestra en un recipiente hermético colocarlo en horno a 62 ± 1 °C. Pesar el equivalente a cinco gramos de la muestra y determinar el índice de peróxido. Cerrar el recipiente hermético en donde se encuentra la muestra y colocarlo nuevamente en el horno. Cada siete días se determina el índice de peróxido por triplicado de cada muestra, hasta obtener valores de índice de peróxido mayores a 20 miliequivalentes, hasta un máximo de tres meses.

Determinación del índice de peróxido

Pesar exactamente 5 g de muestra en un matraz de 250 mL. Agregar 30 mL de una mezcla de ácido acético glacial y cloroformo (3:2), agitar hasta disolver y agregar 0.5 mL de solución de yoduro de potasio. Agitar durante 1 min y agregar 30 ml de agua. Valorar con tiosulfato de sodio 0.01 N, agregando lentamente con agitación continua, hasta que el color amarillo desaparezca casi por completo.

Agregar 5 mL de almidón y continuar la agitación hasta que se desaparezca el color azul. Realizar un blanco bajo las mismas condiciones.

Calcular el índice de peróxido mediante la siguiente fórmula.

$$IP = (A - A1) * N * 1000 / M$$

Donde:

A= Mililitros de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la muestra.

B= mililitros de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación del blanco.

N= normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

M= masa de muestra en gramos

6.8.4 Tamizaje antimicrobiano:

Se evalúa la actividad inhibitoria de un producto, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo y el espectro de inhibición. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad se hace por métodos de dilución, que sirve tanto para el tamizaje como para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir al microorganismo. La CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible en agar (placa), está basado en el descrito por Mitscher *et al.* (1972).

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

Tamizaje antifúngico:

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

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

Diseño de un producto natural:

A partir de extractos etanólicos estandarizados en base a flavonoides se desarrolló una propuesta de formulación buscando las mejores características organolépticas, fisicoquímicas, microbiológicas y de estabilidad.

Se seleccionaron las materias primas y excipientes para cada formulación, se determinaron las incompatibilidades y se establecieron los parámetros de calidad, diseño de etiqueta, selección de envase.

Las técnicas empleadas en el control de calidad de las drogas vegetales y derivados comprendió tres tipos de ensayos:

- Ensayo morfoanatómico y organoléptico, útil en el control de la identidad y pureza de la droga vegetal.
- Ensayo físico-químico, empleado en la identificación y pureza, tanto de drogas vegetales como de productos extractivos, así como en la valoración de principios activos o marcadores.
- Ensayo biológico, utilizado principalmente para el control microbiológico, pero que puede ser útil también, en algunos casos, para la valoración de principios activos (Cañigual, 1998; 2002; Bruneton, 2001).

La evaluación de la estabilidad se realizó en cámara de estabilidad a lo largo del tiempo con temperatura y humedad controlada de acuerdo a la normativa vigente.

I.4.6 La Técnica Estadística

Se realizó un estudio no probabilístico a conveniencia, en el caso de evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó estadística no paramétrica, es decir si se presentaba crecimiento el resultado de la actividad se consideraba negativa y si no la presentaba el resultado de la actividad se consideró positiva, se realizaron cuatro réplicas por especie y luego se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la actividad bactericida, cuatro réplicas para la concentración letal media (CL_{50}), de la actividad citotóxica y concentración letal (CL_{100}) para la actividad larvicida.

En cuanto a la determinación de los metabolitos secundarios se realizó la medición de R_f comparando con estándares, ensayos macro y semimicro y reacciones de coloración y precipitación.

En cuanto al análisis del aceite esencial se obtuvo el promedio y la desviación estándar de 3 extracciones del aceite, para determinar su rendimiento y la identificación química se realizó de acuerdo a los tiempos de retención y masas de los constituyentes comparados con una base de datos.

Para registrar las observaciones se utilizaron cuadernos foliados por páginas, en las cuales se llevó el registro cronológico de las actividades realizadas y los resultados obtenidos. Los resultados fueron organizados, resumidos y presentados mediante estadística descriptiva y analizados e interpretados de acuerdo a la técnica ensayada.

I.4.7 Los Instrumentos a utilizar

Se utilizaron cuadernos para el registro de las actividades realizadas diariamente y resultados obtenidos, además de la documentación registrada en la bitácora del laboratorio. Se elaboraron informes mensuales y trimestrales para indicar el avance de la investigación. Se utilizó el equipo, materiales e infraestructura del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Química y Farmacia, para los análisis fitoquímicos, fisicoquímicos, espectrofotométricos y evaluación de la actividad biológica.

PARTE II MARCO TEÓRICO

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma, apariencia y mayor comodidad (Karel, 1996). Es por esto el deseo de la sociedad moderna de consumir alimentos frescos por lo que ha incrementado la popularidad de los alimentos mínimamente o parcialmente procesados.

Tendencias de los consumidores que tienen impacto directo en la tecnología y conservación de alimentos (Welti, 1998).

Tendencias actuales	Características
Convenientes	Fáciles de almacenar con vida útil satisfactoria
De alta calidad	
De procesos menos severos	Calentamiento menos intenso y daño mínimo por congelación
Con menos aditivos artificiales	Uso de antimicrobianos naturales, timol, carvacrol, eugenol, etc.
Más frescos	Uso de congelación
Mas naturales y más saludables	Con menos grasas saturadas y menor cantidad de azúcares
Más seguros libres de contaminantes	

La mayoría de estas nuevas tendencias tienen implicaciones microbiológicas importantes dado que los cambios que tienen que realizarse conducen a que los factores de conservación sean aplicados de manera menos severa o en menor concentración. Por lo tanto la estabilidad y la seguridad de estos alimentos podrían verse disminuida en términos de vida útil de anaquel y en la producción de alimentos con mayor riesgo para la salud y cada vez más dependientes de una acertada formulación, procesamientos, distribución y almacenamiento (Gould, 1996).

La velocidad de deterioro microbiológico en alimentos no solo depende de microorganismos presentes, sino también de la composición química del producto y tipo de carga inicial. Los antimicrobianos en alimentos actúan principalmente inhibiendo o disminuyendo el crecimiento de los microorganismos aunque algunos pueden inactivarlos (Gould & Russell, 1991; Gould, 1996).

Efecto de la adición de antimicrobianos

Los antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre los microorganismos:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.

- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente bactericidas, mientras que otros pueden ser bacteriostáticos (Mossel, 1982).

Los conservadores son compuestos usados para retardar o prevenir el deterioro fisicoquímico o microbiológico de los alimentos, los cuales pueden deteriorarse a través de cambios adversos causados por la presencia de enzimas, oxígeno, luz, pérdida de humedad o la acción de microorganismos. Los conservadores usados para prevenir los cambios causados por oxígeno, luz y enzimas incluyen los agentes para prevenir la rancidez, los compuestos antioxidantes y los compuestos antioscurecimiento.

La categoría de conservadores utilizados para prevenir o retardar el deterioro microbiano de los alimentos son conocidos como antimicrobianos (Giese, 1994).

Selección de agentes antimicrobianos

El uso y selección de un antimicrobiano depende de una serie de factores que deben ser considerados y evaluados como:

- El antimicrobiano y las propiedades químicas del compuesto tales como solubilidad y constante de disociación.
- La seguridad del compuesto en los niveles sugeridos
- Las propiedades y composición del alimento como el pH, contenido de grasa, proteína y actividad de agua
- El tipo y los niveles iniciales de los microorganismos en el producto.
- El costo del antimicrobiano
- La seguridad de que el antimicrobiano no afectará la calidad del producto.

Con todos estos factores a considerar se puede necesitar más de un antimicrobiano (Branen, 1993; Banwart, 1993).

Clasificación de los antimicrobianos

Actualmente los conservadores se clasifican en tradicionales y naturales. Se consideran como conservadores tradicionales a aquellas sustancias químicas incluidas dentro de la normativa vigente. Y los conservadores naturales se definen como sustancias que se obtienen o se derivan de materiales o procesos biológicos y cuya inocuidad se atribuye a que cuando se ingieren son degradados por el organismo. Esta clasificación de los conservadores se atribuye a la percepción de los consumidores de lo natural como bueno/beneficioso y de lo químico como malo/riesgoso.

Conservadores químicos

La FDA (Food & Drug Administration) define a un conservador químico como cualquier compuesto químico que cuando se adiciona a un alimento tiende a prevenir o retardar su deterioro (Jay, 1991).

Davidson (1996) define a los antimicrobianos químicos o sintéticos como compuestos químicos añadidos o presentes en alimentos. Estos incluyen a varios ácidos orgánicos, parabenos, sulfitos y sorbatos. Éstos últimos son altamente utilizados en alimentos debido a sus características que los hacen aptos para su aplicación en alimentos. Los compuestos químicos son capaces de actuar como conservadores de alimentos, pero en los productos alimenticios solo está permitido su uso en concentraciones pequeñas.

Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente reconocidos como GRAS son:

- Ácido propiónico y propionatos (mohos)
- Ácido sórbico y sorbatos (mohos)
- Ácido benzoico y benzoatos (mohos y levaduras)
- Parabenos (mohos, levaduras y bacterias)
- Diacetato de sodio (mohos)
- Nisina (Bacterias ácido lácticas, Clostridia)
- Nitrato de sodio (Clostridia)
- Etil-formato (mohos y levaduras)

De los cuales los más empleados en la conservación de alimentos son:

Sorbato: El ácido sórbico y el sorbato de potasio son las formas más populares que se utilizan, se emplean concentraciones menores del 0.3% para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. La aplicación de los sorbatos es en quesos, bebidas, jarabes, jugos de frutas, vinos, ensaladas etc. (Velasco, 1995).

Ácidos: Son los mejores aditivos en bebidas carbonatadas, bebidas de frutas, dulces, quesos, etc. Estos actúan reduciendo el pH constituyendo de esta forma otro factor de stress. El ácido cítrico es usado en muchos productos y representa el 60% de todos los ácidos utilizados, el ácido fosfórico es el segundo más utilizado en alimentos y el único utilizado en bebidas carbonatadas. El ácido propiónico y sus sales son conservadores que se adicionan en pan, pasteles, algunos quesos y masa panificable para inhibir mohos (Velasco, 1995).

Sulfitos: Los sulfitos incluyen el bióxido de azufre, sales de sulfito, sales de bisulfito y sales de metabisulfitos. La adición de sulfitos es una práctica común en la industria alimentaria para controlar las reacciones de oscurecimiento, previene la pérdida de vitamina C. Su uso normal está limitado porque alrededor de 500 ppm su sabor es detectado (Roboach, 1980).

Antimicrobianos naturales

Un amplio rango de sistemas antimicrobianos naturales han sido desarrollado a partir de microorganismos, plantas y animales, muchos se han empleado para conservación de alimentos y otros están siendo investigados para ser usados en estos (Santiesteban, 2002).

Sistemas antimicrobianos naturales de uso en alimentos

Fuente	Sistema	Aplicaciones
Microbiana	Bacteriocinas	Inhibición <i>Listeria monocytogenes</i> y de patógenos de alimentos en general
	Ácidos orgánicos antibióticos	Inhibición de mohos y levaduras Diversos efectos dependiendo del tipo de antibiótico y tipo de microorganismo
Animal	Lisozima	Inhibición de bacterias en queso
	Lactoferrina	Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche
	Lactoperoxidasa	Preservación de leche bronca Preservación de queso cotagge. Inhibición de <i>Salmonella</i> en fórmulas lácticas infantiles Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> in vitro y en quesos frescos Inhibición de <i>Campylobacter</i> in vitro
Vegetal	Aceites esenciales	Estudios de actividad antimicrobiana
	Puré de plátano	Inhibición de bacterias formadoras de esporas
	Extracto de ajo	Inhibición de <i>Candida albicans</i> Inhibición de la germinación de esporas de <i>Bacillus cereus</i>

Board & Gould (1991).

La asociación Americana del Comercio de las Especies (American Spice Trade Association) define a las especies como cualquier producto de plantas seco y utilizado como condimento, se incluyen raíces, cortezas, capullos, semillas, frutos, flores y vegetales deshidratados, las cuales son utilizadas para condimentar a los alimentos (Mountney & Gould, 1988).

Wilkins & Borrad (1989) reportaron que aproximadamente más de 1,340 plantas son un recurso potencial de compuestos antimicrobianos. Dichos compuestos incluyen sustancias de bajo peso molecular como las fitoalexinas, entre las cuales los compuestos fenolitos son los más predominantes (ácido cafeico, cinámico, ferúlico y gálico, oleuperina, timol y eugenol).

Muchas hierbas y especies contienen aceites esenciales que son antimicrobianos, se mencionan que cerca de 80 productos de origen vegetal contienen altos niveles de antimicrobianos con uso potencial en alimentos, por ejemplo el clavo, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, orégano, mostaza y vainilla entre otros (López- Malo, 1995).

Lista de plantas usadas como saborizantes en alimentos y que presentan actividad antimicrobiana

Ajedrea, ajo, albahaca, anís, azafrán, canela, cardamomo, cebollinos, cilantro, clavo, comino, cúrcuma, eneldo, estragón, hinojo, jengibre, laurel, macis, mejorana, menta, mostaza, nuez moscada, perejil, perifollo, pimienta, pimienta de cayena, pimienta de Jamaica, pimentón, romero, salvia, semilla de apio, té de limón, tomillo, vainilla.

Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no solo depende de la estructura química de sus componentes sino también de la proporción y tipo de compuestos presentes, especialmente se reconocen que los alcoholes alifáticos y los fenoles exhiben acción inhibitoria para el crecimiento de los hongos (Farag et al., 1989). Otros compuestos fenólicos presentes naturalmente en plantas son los fenoles simples y ácidos fenólicos, los derivados del ácido hidroxicinámico y los flavonoides. En 1977, Bullerman establece que el aldehído cinámico y el eugenol, los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales de la canela y el clavo de olor son los compuestos activos responsables de la actividad inhibitoria de los extractos, pero no descartaron la posibilidad de que otros constituyentes minoritarios puedan también tener efectos inhibitorios.

Mahmoud (1994) reportó que 1000 ppm de los alcoholes alifáticos: geraniol, nerol, citronelol o del aldehído aromático, aldehído cinámico o de la cetona fenólica, timol, inhibieron completamente el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

Entre los aceites esenciales que también tienen actividad antimicrobiana, se encuentra el aceite esencial de orégano y clavo, los cuales fueron probados contra tres especies de *Aspergillus*, señalando que los mohos estudiados difieren en su sensibilidad a los extractos y encontraron que *A. flavus* fue el más sensible de los mohos estudiados al aceite esencial del orégano (Paster et al., 1990).

Definición queso fresco

El término “fresco” se utiliza para definir un queso que no se madura después de la fabricación, que se consume en estado fresco. Contienen un porcentaje de humedad relativamente elevado. El agua queda retenida en el queso por las técnicas de fabricación utilizadas: coagulación de la leche por acidificación y no por la acción del cuajo; obtención de una cuajada friable que no se puede prensar, escaso desuerado de la cuajada; adición de poca sal, etc., no deben madurar o fermentar después de su fabricación: si esto ocurre, el queso se altera, aparecen defectos y se estropea en menos tiempo. Por lo tanto, estos quesos deben conservarse en frío y consumirse en estado fresco. La duración de su conservación depende del contenido en agua, de la calidad de la materia prima, de las técnicas de fabricación y de las condiciones higiénicas durante la manipulación, el almacenamiento y la distribución. Los quesos frescos tienen distintos contenidos en materia grasa: la mayor parte son magros, aunque también hay algunos grasos. Las

variedades con un bajo contenido en materia grasa (MG) y en sal pueden considerarse como quesos dietéticos y de régimen (Amiot, 1991).

Composición del queso fresco

El queso es el resultado de la concentración selectiva de la leche. El agua se elimina en una proporción distinta en cada variedad, arrastrando con ella una parte de los elementos solubles y de las proteínas no coaguladas que contienen leche. El agua que queda retenida en el queso desempeña un papel muy importante: es esencial para el desarrollo de los microorganismos y determina la velocidad de las fermentaciones y de la maduración, el tiempo de conservación, la textura del queso y el rendimiento del proceso de elaboración. La materia grasa influye en la textura, el sabor, el rendimiento y en el color. La lactosa es sustrato para la formación de ácido y por lo tanto, interviene en la coagulación de la leche, el desuerado y la textura de la cuajada, y también en el crecimiento de los microorganismos. La caseína origina diversos compuestos aromáticos. Las proteínas del suero que quedan incluidas en la cuajada contribuyen al valor nutritivo del queso y tiene mucha importancia en el proceso de maduración. Los minerales participan en la coagulación de la leche e influyen sobre el desuerado y la textura del queso (Amiot, 1991).

Desde el punto de vista económico, es fundamental obtener un buen rendimiento en la fabricación de queso y para ello es imprescindible controlar todo el proceso y conocer los principales datos necesarios para su cálculo, que son: la cantidad de leche recogida y su contenido en materia grasa y caseína; el peso del queso cuando se pone en los moldes, al final del escurrido, a la salida de las prensas y en el momento de la expedición; el contenido en MG del lactosuero y también la humedad y materia grasa del queso (Amiot, 1991).

Características físico químicas que Impactan en la producción de queso

Las propiedades físico-químicas de la leche son consecuencia de su composición y estructura. Como existen variaciones en cuanto a la composición química entre las leches de vaca, oveja y cabra, también en sus propiedades físico-químicas se observan diferencias. En la tabla No. 1 se puede apreciar que los valores del índice de refracción, punto de congelación, acidez, y viscosidad son superiores en la leche de oveja. El pH es muy similar en las tres leches (Chamorro y Losada M, 2002).

Tabla No. 1 Propiedades físico-químicas de las diferentes leches

Propiedad	Leche de vaca	Leche de oveja	Leche de cabra
Densidad a 20°C (g/ml)	1,0270-1,0320	1,0340-1,0350	1,0260-1,0420
Viscosidad (mPa.s)	1,236	2,936	1,186
Tensión superficial (N/m)	50	49,9	52
Índice de refracción (No. ²⁰)	1,3440-1,3485	1,3490	1,3454-1,4548
Temperatura de congelación (°C)	-0,55	-0,583	-0,570
Ácidos (%ácido láctico)	0,15-0,18	0,18-0,22	0,16-0,18
pH	6,50-6,70	6,60-6,68	6,50-6,80

Fuente: (Chamorro y Losada M, 2002)

Las proteínas de la leche y su influencia en el proceso de fabricación del queso

Las proteínas son los elementos constitutivos esenciales de toda célula viviente y tienen una gran importancia en la leche y los productos lácteos. La caseína precipita a pH 4.6 y las otras proteínas que se denominan proteínas dellactosuero y que no precipitan con las caseínas a menos que previamente hayan sido desnaturalizadas por el calor u otros tratamientos (Amiot, 1991).

Las proteínas son sustancias compuestas por carbono, hidrógeno y nitrógeno, con la presencia de algún otro elemento como el fósforo, hierro y azufre. La palabra proteína viene del griego “protos”, que quiere decir primero ya que desde antiguo se conoce el importante papel jugado por estas sustancias como componentes esenciales de los organismos vivos. La caseína es la proteína más importante de la leche, representando aproximadamente del 77 al 82 % de sus proteínas totales. Por acción del cuajo o ácidos la caseína precipita, propiedad que se aprovecha para la producción de queso. En cuanto las proteínas séricas de la leche, las más importantes son la lactoalbúmina y lactoglobulina. Es importante notar que no toda la albúmina y globulina se van con el suero. Como sabemos, parte del suero es retenido en la estructura de los coágulos de caseína, y con el suero quedan partes de sus proteínas, que son una fuente de aminoácidos para los microorganismos que se desarrollan durante la maduración. Se puede observar en la tabla 2 la composición de proteínas en la leche (Madrid, 1990).

Tabla No. 2 Proteínas de la leche de vaca

Contenido total en proteínas	32-33 g/L
Contenido en caseína	25-30 g/L
Contenido en proteína sérica (albúmina y globulina)	5-6,5 g/L

Fuente: Madrid, 1990

Sustancias Nitrogenadas: Forman la parte más compleja de la leche y comprenden dos tipos

- Las proteínas (95% del nitrógeno total).
- Las sustancias no proteicas (5% del nitrógeno total).

Las proteínas se encuentran en dos fases diferentes:

- Fase micelar inestable, formada por partículas sólidas en suspensión (micelas de caseína).
- Fase soluble estable, constituida por diversos polímeros proteicos hidrófilos (proteínas solubles o proteínas del suero).

Las micelas de caseínas son complejos orgánicos formados por proteínas desnaturalizadas (caseínas: $\alpha, \beta, \kappa, \gamma$), de diferentes tamaños, con carga eléctrica negativa, debido a la mayor presencia de aminoácidos ácidos y grupos hidrófilos lo que determina que se repelan entre sí. Representan el 80% del nitrógeno total.

Las diferentes caseínas ($\alpha, \beta, \kappa, \gamma$) difieren en su contenido en fósforo y en su comportamiento frente al cuajo (enzima proteolítico). El mayor contenido de la leche en caseínas α y β , determina el rendimiento en queso. En la tabla 10 se observan los valores de las fracciones de caseína respecto a la caseína total en las distintas leches.

Las proteínas solubles son exclusivamente de naturaleza orgánica, no llevan minerales en su molécula, y presentan una estructura secundaria (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, proteosomas-peptonas, inmunoglobulinas, albúmina sérica) (Chamorro y Losada, 2002).

Las grasas de la leche y su influencia en el proceso de fabricación del queso

Las sustancias que pueden extraerse de la leche con solventes orgánicos no polares como el éter, benceno o cloroformo son las grasas de la leche (Amiot, 1991). La grasa de la leche esta compuesta sobre todo por grasas neutras (triglicéridos) con algunos lipoides (fosfolípidos, carotenoides, tocoferoles, aldehídos, etc.), que, aunque en pequeña proporción tiene una gran influencia en la elaboración del queso, ya que contribuyen a su aroma y color. La grasa se encuentra en la leche en una suspensión de pequeños glóbulos de dimensiones variables de 0.1 a más de 20 micras. Sudiámetro es de 3 a 4 micras. Se cree que es favorable la presencia de glóbulos de diámetro pequeño en la leche cuando se usa para fabricar queso, ya que los glóbulos grandes se rompen con facilidad, acabando su contenido en el aumento de grasa en el suero (ácidos grasos libres) o ácidos grasos libres entre los granos de cuajada, que le dan un aspecto aceitoso (Madrid, 1990).

El glóbulo de grasa consta en las siguientes partes:

- Membrana muy fina hecha de lipoproteínas.
- Triglicéridos (ésteres de la glicerina con ácidos grasos).
- Mono y diglicéridos.
- Ácidos grasos libres.
- Otros lipoides (carotenoides, tocoferoles, aldehídos, etc.).

Durante la maduración de los quesos, la materia grasa sufre profundas transformaciones, influyendo en las características físicas y organolépticas que determinan el tipo de queso. La materia grasa contribuye a aumentar el rendimiento quesero, mejora la consistencia y ayuda a la mejor distribución de la caseína en la masa del queso (Chamorro y Losada, 2002).

Los ácidos grasos son los componentes básicos de la materia grasa de la leche. Tienen gran importancia, puesto que influyen en el olor y gusto de la leche y por tanto del queso, principalmente los ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbonos, como se muestra en la tabla No.3

Es determinante el papel que ejerce la materia grasa en el desarrollo de la calidad organoléptica de los quesos. Por ella misma, influye sobre la textura de la pasta de los quesos:

- Actúa como disolvente de componentes del olor, modificando los umbrales de percepción.
- Interviene en los equilibrios entre las formas disociadas y no disociadas de los ácidos grasos (Chamorro y Losada, 2002).

Tabla No.3 Proporción de ácidos grasos de la grasa de la leche de diferentes especies

Ácido graso	Leche de vaca	Leche de oveja	Leche de cabra
Butírico (C4:0)	1,40	1,10	0,70
Caprónico (C6:0)	2,20	2,70	2,40
Caprílico (C8:0)	1,80	3,30	3,20
Cáprico (C10:0)	3,60	7,60	8,70
Láurico (C12:0)	4,00	3,50	4,70
Mirístico (C14:0)	13,00	14,10	10,70
Palmítico (C16:0)	30,20	28,10	28,50
Estearico (C18:0)	13,70	11,80	13,00
Oleico (C18:1)	21,10	22,70	25,20
Linoléico (C18:2)	3,00	3,10	2,90

Fuente: (Chamorro y Losada, 2002)

Las sales minerales de la leche y su influencia en el proceso de fabricación de queso

El contenido en sales de la leche no llega al 1% de su composición total, pero aun así es de gran importancia. Las sales en la leche se encuentran disueltas o formando compuestos con la caseína. Las más numerosas son calcio, potasio, sodio y magnesio, que se encuentran como fosfato cálcico, cloruro sódico, caseinato cálcico, etc. Otras sales

minerales, aunque no tan abundantes, también son importantes por ser necesarias para la formación de determinadas vitaminas y enzimas. En la leche de final de lactación o de vacas enfermas aumenta de forma anormal el contenido en cloruro sódico, con la siguiente reducción en otras sales como el calcio, fundamentalmente en el proceso de coagulación de la caseína, por ello se recomienda no utilizar leche de animales enfermos en la elaboración de quesos. El calcio se encuentra en dos formas en la leche. El 30% aproximadamente en solución y el 70% restante en forma coloidal. El fosfato cálcico forma parte del complejo caseínico producido en la coagulación de la leche, contribuyendo al aumento de tamaño de las micelas de caseína. Por ello, la adición de cloruro cálcico a la leche favorece la coagulación de la caseína que así forma micelas mayores (Madrid, 1990).

Vitaminas: En la leche hay vitaminas hidrosolubles (grupo B y C), que provienen de la biosíntesis que realizan las bacterias del rumen, y vitaminas liposolubles (A, E, D, K), asociadas a la grasa y sujetas a variaciones importantes, debido a la alimentación del animal y a las radiaciones solares. El contenido de vitaminas no ejerce ninguna influencia en la aptitud quesera de la leche (Chamorro y Losada, 2002).

Ácidos orgánicos: El ácido cítrico es un componente característico de la leche, sintetizado por las células mamarias a partir de la glucosa o sus derivados y forma quelatos con el calcio, lo que permite que la leche tenga mucho calcio disuelto en forma de citrato cálcico. Además de intervenir en el estado de equilibrio del calcio, es utilizado por ciertos microorganismos, siendo por ello un precursor del olor (diacetilo) de algunos quesos. Las concentraciones de ácido cítrico en la leche suelen estar entre 1,5 y 1,7 g/l. La leche contiene otros ácidos orgánicos en muy pequeñas cantidades (Chamorro y Losada, 2002).

Enzimas: Son sustancias orgánicas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores en las reacciones bioquímicas. La mayoría son componentes o productos de las células mamarias que, durante los procesos secretorios, llegan a la leche. A veces, es difícil determinar su origen, pues en ocasiones los microorganismos presentes en la leche pueden producirlas. Su concentración varía mucho con la especie y, dentro de la misma con el momento del período de lactación. Aunque presentes en pequeñas cantidades, pueden influir de forma importante en la estabilidad de los productos lácteos. Debido a las enzimas, la leche posee propiedades de un sistema reversible de óxido-reducción, lo que es esencial para el desarrollo de la fermentación láctica, imprescindible en la maduración del queso para que las proteínas a su vez se transformen adecuadamente. Las proteasas y lipasas son particularmente importantes debido a sus efectos sobre las proteínas y lípidos de los quesos, tanto para la textura como para su sabor y aroma. Las oxidoreductasas también pueden tener efectos sobre la estabilidad del aroma, debido a su influencia sobre el estado oxidativo, especialmente de la fracción lipídica. Las enzimas se desnaturalizan con el calor y por ello algunos sirven para controlar los tratamientos térmicos dados a la leche (Chamorro y Losada, 2002).

Etapas de procesamientos de quesos

Estandarización de la leche: A nivel artesanal se elaboran quesos a partir de la leche cruda, pero en la elaboración semi-industrial e industrial se somete la leche de quesería a un tratamiento de calor a temperaturas relativamente bajas. Este proceso

se llama termización. Si la leche no es de alta calidad, se le debe pasteurizar. Sin embargo, el tratamiento a más altas temperaturas disminuye la capacidad de coagulación. Por esto, después de la pasteurización se mejora esta capacidad por la adición de cloruro cálcico. La estandarización es el proceso por el cual se ajusta el contenido de grasa, proteína y sólidos propios de la leche, formula láctea y producto lácteo combinado, a nivel correspondiente de acuerdo su denominación (Meyer et al., 1999).

Coagulación de la leche: El primer paso en la fabricación tradicional del queso es la coagulación de la leche, también llamada cuajado. Este fenómeno se produce por la desestabilización de la solución coloidal de caseína que origina la aglomeración de las micelas libres y la formación de un gel en el que quedan atrapados el resto de los componentes de la leche. Para coagular la leche destinada a la elaboración de queso se utilizan dos métodos: la acidificación y la adición de cuajo, que dan lugar a dos tipos de cuajada, llamadas ácida y enzimática. Estas cuajadas tienen propiedades comportamientos muy distintos y las diferencias entre los dos tipos son la base de tecnología utilizada para fabricar las distintas variedades de queso y determinan las características individuales de cada una de ellas. La actividad proteolítica del cuajo se ejerce principalmente sobre la caseína y en menor grado sobre las otras proteínas y por lo tanto, realiza dos acciones fundamentales. La primera acción del cuajo es la de provocar la desestabilización de las micelas de caseína rompiendo la caseína K en un punto determinado de su molécula: el enlace peptídico entre el aminoácido fenilalanina y su vecino, que es una metionina (llamado enlace PHE-MET). El segundo papel del cuajo es el de hidrolizar estos enlaces siguiendo un orden específico que es característico de la enzima utilizada. Esta acción secundaria sobre las proteínas comienza lentamente después de la coagulación y continúa durante la maduración del queso. Esta acción, junto con la de las proteasas nativas de la leche, las proteasas de la flora original y las del fermento, contribuyen al desarrollo de algunas de las características de textura y sabor del queso (Amiot, 1991).

Troceado o corte: El extremo de un termómetro se introduce bajo inclinación en la masa cuajada. Retirándolo lentamente, la masa cuajada debe entrecortar inmediatamente formando una especie de ojal. La hendidura debe ser pronunciada y lisa. El suero que exude en este lugar no ha de contener partículas de caseína. El caso contrario indica una coagulación incompleta. La lira horizontal se introduce verticalmente en un rincón de la cuba paralela a la cabecera, cuidando de no romper la cuajada. Se sostiene la lira vertical y se mueve hacia el otro lado a lo largo de la tina raspando el fondo de la cuba. Al llegar al otro lado, se retira la lira y se introduce otra vez desplazándola sobre su anchura y traspasando una parte del trayecto ya cortado. Así se sigue cortando toda la cuajada en plano horizontal. El Corte de la cuajada en plano vertical se efectúa como se ha indicado anteriormente. Corte de la cuajada transversal a la dirección anterior. La mayor parte del suero se encuentra en los poros o cavidades de la cuajada. Otra parte se encuentra en los intersticios capilares entre las partículas de la caseína coagulada. En el desuerado se trata de eliminar el suero. Para favorecer esto, se somete la leche cuajada a varias operaciones (Meyer et al., 1999).

Desuerado de la cuajada: La concentración se consigue eliminando una cantidad mayor o menor de agua y elementos solubles. La pasta que queda está formada esencialmente por la caseína y la materia grasa adherida a ella físicamente. El lactosuero que se extrae contiene la mayor parte de la lactosa y de las sustancias nitrogenadas no coaguladas y una proporción variable de minerales. Fundamentalmente es la mayor o menor cantidad de suero que queda retenido en la cuajada lo que determina muchas de las características de las distintas variedades de queso: dureza, textura, velocidad e intensidad de la maduración, etc. Por esta razón la operación de desuerado tiene una gran importancia en el proceso de fabricación y además, controlando esta etapa se regula el extracto seco total exigido por la legislación para cada tipo de queso (Amiot, 1991).

Moldeado: Después de la eliminación de gran parte del suero, los granos de leche coagulada se colocan en moldes de diferentes tamaños y formas, que son los que dan la apariencia final al queso. Estos moldes pueden ser de madera, plástico o metal (Madrid, 1990).

Prensado: Esta etapa del proceso permite extraer el agua libre del queso y complementar así su desuerado. Evidentemente, no se aplica a todos los tipos de queso, sino sólo a los que tienen una estructura capaz de soportar una presión directa. Las condiciones del prensado como la intensidad, la progresión y el tiempo, deben ajustarse en función de la naturaleza de los quesos que se vayan a fabricar (Amiot, 1991).

Salado: Después del prensado se procede a salar los quesos, bien por inmersión directa en baños de salmuera o por sal sólida aplicada a la corteza o mezclada con la masa. También se puede efectuar el salado cuando los granos aún están en el contenedor, pero ello tiene el inconveniente de que también se incorpora sal al suero, con lo que limitamos sus posibles aprovechamientos. La adición de sal ayuda a una mejor conservación del queso, además de realzar sus aromas (Madrid, 1990).

Definición de embutido

Los embutidos son alimentos preparados a partir de grasa de cerdo y carnes picadas, condimentadas y embutidas en una porción de intestino delgado (tripa) del cerdo, la cual es obtenida después de su sacrificio. En el caso de los embutidos comerciales estos son curados con nitratos y nitritos, con el fin de fijar su coloración y conservación. El embutido también puede prepararse con otras carnes, como la de bovino, borrego, pollo y pavo las cuales deben ser mezcladas con grasa de cerdo lo más homogéneamente. Para incrementar sus olores y sabores se le agregan condimentos, especias y sazónadores. Estos se clasifican en embutidos crudos, escaldados y cocidos (Lesur, 1992).

Elección de las materias primas para elaboración de chorizo

Elección de la grasa, carne y tripas:

Las grasas recomendadas para esta labor son, la dorsal, de la lonja y papada, las cuales, son grasas resistentes al corte que facilitan su manufactura y se recomiendan para la

preparación de chorizos crudos. En caso de una mala elección de la grasa, se pueden presentar alteraciones que perjudicarían el sabor y olor del embutido, siendo éstas de un sabor a pescado, ácidas órancias, lo que repercutiría en la calidad (Paltrinieri y Meyer, 1994). En cerdos jóvenes o mal nutridos, sus carnes son demasiado claras, por lo tanto originan embutidos de color pálido y el resultado de su aceptación es deficiente. Así como, los que son sometidos a extremas condiciones de estrés, que se traduce en un pH alto, por consiguiente el embutido crudo se debe preparar con carne madura, con un pH de entre 5.4 a 5.8. La calidad de la carne no solo depende de la edad, sexo, alimentación y estado nutricional, sino también de la intensidad con que se desarrollen los cambios enzimáticos postmortem (Prince y Bernard, 1994). El canal utilizado para este embutido debe refrigerarse lo más rápido posible, después del sacrificio. Por lo que, es necesario refrigerarlas a temperaturas por debajo de los 3 ° C., las cuales requieren de entre 24 a 36 horas para enfriarse, además, se debe mantener la humedad relativa entre 80 y 90% (Lawrie, 1998).

El intestino más utilizado para procesar chorizo, es el intestino delgado ya que cuenta con una longitud de 15 a 20 metros y un diámetro de 2.5 cm, el cual se utiliza para chorizo y salami (Paltrinieri y Meyer, 1994). El ciego es un intestino corto, pero con mayor volumen de almacenaje, tiene una longitud de 30 a 50 cm, con un diámetro de 8 a 10 cm; generalmente éste se utiliza para chorizos voluminosos y para salami, el cual permite embutir de 1 a 1.5kg., de carne (Effenberger, 1980). El intestino grueso, cuenta con una longitud de 1 a 1.5 m., y un diámetro de 5 a 10 cm., y se usa para chorizo crudo. Un metro, permite embutir una masa de carne de 2 Kg., pero en este caso la higienización y desinfección debe ser rigurosa (Ockerman, 1990). Existen fundas para embutidos (tripas artificiales) higiénicas con un diámetro uniforme, sin olores, ni orificios. Son a base de celulosa y pueden usarse para toda clase de embutidos, también las hay de pergamino, de fibra membranosa para todos los cocidos y de tejido sedoso para los crudos (Effenberger, 1980).

Espicias sazonadoras:

Dentro de estas tenemos el clavo que posee un aroma fuerte y rico, al probarlo es picante, ácido, amargo y deja una última sensación de frío en la boca, al cocinarlo su efecto se suaviza; es una especia muy aromática por lo que se debe usar con cuidado. Otro condimento es el ajo, el cual contiene una enzima llamada alinaza que produce los disulfuros típicos del olor que se perciben en él; El comino tiene un sabor amargo y un olor fuerte y dulzón, gracias a su alto contenido en aceites; el cilantro posee la propiedad de reducir la flatulencia, es mejor utilizarlo fresco porque es muy sensible al calor y pierde mucho aroma, sus hojas son buenas para destruir bacterias; el orégano de color amarillo limón, compuesto por un esteropteno y dos tipos de fenoles, como el carvacrol y en menor proporción el timol, que le dan su olor característico; el laurel es utilizado por sus hojas, las cuales se pueden aplicar enteras o molidas para dar sabor a los alimentos, además tienen propiedades antibacterianas; la pimienta blanca y la pimienta negra, son semillas que le dan el sabor picante a los alimentos y también son antibacterianas; la nuez moscada es otra semilla que le da un sabor dulce y aroma a los alimentos y tiene efecto fungicida (www.botanical-online.com).

Colorantes naturales utilizados para embutidos:

Para dar color a un embutido se utiliza el achiote y el pimentón o paprika; se usan por ser inocuos. El achiote es de color rojizo amarillento, derivado de sus semillas y conocido como Annatto, así como también tiene la propiedad de ser antimicrobiano. El pimentón o paprika también se usa como colorante y tienen diferentes sabores, tales como dulce, agridulce y picante. Su color puede variar de rojo anaranjado a rojo sangre, pero cuanto más oscuro es más apreciado por los chacineros y tiene propiedades antimicrobianas (Cubero et al., 2002)

Sales curantes:

Las más utilizadas para el procesamiento de chorizos son el cloruro de sodio -sal común-, nitratos, nitritos, fosfatos, ácido ascórbico (vitamina C) y glutamato. El cloruro de sodio actúa como sazonzador y le da un mejor sabor a la carne, debido a los cambios en los procesos físico-químicos de ésta, además evita la proliferación microbiana durante su maduración, desempeñando un importante papel en la consistencia de la masa embutida (Hughes, 1994). Los nitratos y nitritos favorecen el enrojecimiento y la conservación de la carne y tienen un efecto bactericida, forman parte de las llamadas sales curantes, normalmente se mezclan 2.4 partes de nitrato por cada 100 partes de cloruro de sodio. El nitrato es reducido a óxido nitroso que se presenta en estado gaseoso, este gas reacciona con el pigmento rojo del músculo de la carne, formando una sustancia estable de color rojo claro, al someter la carne al calor durante el ahumado o la cocción, este color rojo se vuelve más intenso. Por otro lado, estas sales están permitidas utilizarlas en una concentración de 15 g., por cada 100 Kg., de carne (Werner, 1983).

Los fosfatos, ácido ascórbico -vitamina C- y Glutamato, se utilizan en la industria de la carne. El más común es el ácido fosfórico, debido a que favorece la absorción del agua, emulsifican las grasas, disminuye las pérdidas de proteínas durante la cocción y reduce la contracción de la carne, además es una sustancia coadyuvante durante el curado del chorizo. En algunos países no se permite el empleo de fosfatos, porque su utilización puede enmascarar defectos de elaboración de los embutidos, normalmente se permite en proporción de 0.4% en las carnes procesadas (Coretti, 1971).

Se utiliza también para mejorar el enrojecimiento de la carne, el ácido ascórbico -vitamina C- y su sal sódica -ascorbato sódico-, ambos son agentes intensamente reductores. Estas propiedades reductoras de oxido-reducción -potencial redox- propician el enrojecimiento en los embutidos. Otra sustancia coadyuvante que puede usarse, es el glutamato sódico y el ácido glutámico, por que mejoran el sabor y aroma (Werner, 1983).

Sustancias curantes:

Se emplean las siguientes: el vinagre, azúcar en polvo, jarabe y glutamato monosódico. El vinagre se utiliza para favorecer la conservación, así como también mejorar el aroma y el sabor de los productos encurtidos, además de ser bacteriostático. El azúcar en polvo y el jarabe se utilizan para facilitar la penetración de la sal, suavizar el fuerte sabor de los nitratos y como sustrato de las lacto bacterias utilizadas durante la maduración. El glutamato monosódico mejora el sabor típico de la carne y de las proteínas vegetales texturizadas, además aumenta su rendimiento y valor proteínico (Ulrich, 1980).

Defectos de los chorizos:

Los embutidos crudos pueden presentar defectos de color, aroma, sabor y apariencia. El enrojecimiento imperfecto de la carne se debe al uso de colorantes poco estables, lo que ocasiona una maduración deficiente. Durante la maduración de los embutidos crudos, se lleva a cabo un complejo proceso bioquímico y microbiano de los componentes propios de la carne -proteínas, grasas e hidratos de carbono- y las agregadas a la pasta -nitrito potásico, sal curante de nitrito, azúcares, entre otras-, las cuales son transformadas y desdobladas fermentativamente, adquiriendo el chorizo su aroma y el sabor ligeramente ácido. La apariencia puede cambiar por el desprendimiento de su envoltura, la desecación y por fundas -tripas- defectuosas. En el caso de una mala maduración, ésta puede ser ocasionada por una mezcla deficiente de la carne o por utilizar demasiada humedad, lo que ocasionan fermentaciones inadecuadas y huecos en la masa del embutido (Coretti, 1971).

Microorganismos deteriorantes

Los microorganismos deteriorantes son aquellos que causan deterioro en el color, sabor, aroma y textura de los alimentos, no suelen producir enfermedades (Pascual, 1999). Los recuentos bacterianos bajos están asociados con alimentos seguros. La mayoría de los alimentos industrializados (excepto, por ejemplo, los productos fermentados) deben ser considerados como inadecuados para el consumo, cuando contienen un gran número de microorganismos, aun cuando estos microorganismos no sean conocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento. (Madigan, 2003)

Algunos microbiólogos han estimado el recuento bacteriano como uno de los mejores indicadores del grado de alteración de los alimentos así como también pueden establecer la calidad del mismo. (Signorini, 2008)

Por esta razón es importante conocer el significado que tienen los microorganismos deteriorantes en los alimentos, estableciendo los siguientes parámetros:

- La cantidad del microorganismo
- Tipos o clases de microorganismos
- Tipo de alimento
- Tratamientos a los que ha sido expuesto el alimento
- Proceso o almacenamiento del alimento
- Consumo del alimento
- Consumidores (Díaz, 1999).

Funciones de los microorganismos deteriorantes en los alimentos

- a) Útiles: producen cambios deseables (por ejemplo: fermentaciones para la producción de yogurt o cerveza).
- b) Causan deterioro: producen cambios indeseables en olor, color, sabor, textura o apariencia del alimento o producto.
- c) Causan peligro: intoxicaciones alimenticias (fiebre, malestares gastrointestinales, diarrea, entre otros.)
- d) Inertes: no producen ningún cambio en el alimento (Lennette, 1992).

Clasificación de Microorganismos deteriorantes:

Los microorganismos deteriorantes producen un cambio en las propiedades organolépticas de los alimentos por acción sobre distintos compuestos, de acuerdo a su afinidad por ciertos ambientes y resistencia para crecer en ellos se clasifican en (Pascual, 1999):

Microorganismos Halófilos: toleran bien altas concentraciones de sales sin sufrir de plasmólisis (Negroni, 2009). Usualmente provienen de aguas saladas y contaminan mariscos, pescado y otros alimentos que se encuentran en medio salinizado (Tórtora, 2007), como *Halobacterium* que crece en alimentos con altas concentraciones de sal (Signorini, 2008).

Microorganismos psicrófilos: son microorganismos que exigen temperaturas bajas y tienen su óptimo crecimiento a 0°C o sus proximidades. Entre estos se encuentran bacterias del género *Achromobacter* (Pascual, 1999), que produce viscosidad en alimentos, deteriora carnes rojas, blancas y mariscos a bajas temperaturas (Signorini, 2008).

Microorganismos osmofílicos: Son microorganismos que se desarrollan en ambientes con una alta concentración de azúcar debido a que no son tan sensibles a la presión osmótica elevada. Son principalmente mohos (Yabar, 2005).

Microorganismos termodúricos: microorganismos capaces de sobrevivir a los tratamientos térmicos comúnmente utilizados por la industria de alimentos, y en algunos procesos pueden constituirse en los principales contaminantes del producto. Forman esporas que soportan los tratamientos térmicos como *Bacillus* y *Clostridium* (Pascual, 1999).

Microorganismos Proteolíticos: las bacterias proteolíticas pueden descomponer los alimentos por degradación de las proteínas y liberación de productos indeseables. Estos pueden contarse sembrando las muestras por vaciado en placa, en medio conteniendo leche descremada, el cual contiene la proteína de la caseína. Los organismos capaces de usar la caseína son reconocidos como proteolíticos (Alarcón, 2001)

Microorganismos lipolíticos: son organismos que degradan los lípidos, liberando ácidos grasos. En alimentos como la mantequilla, la acumulación de ácidos grasos contribuye a su enranciamiento (Alarcón, 2001), como *Flavobacterium* que causa decoloración de la superficie de las carnes. Deteriora la carne de aves, huevos, mantequilla, pescado entre otros (Signorini, 2008).

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* se ha incluido tradicionalmente en la familia *Micrococaceae* junto a los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*. Actualmente, incluye 42 especies diferentes, algunas de ellas forman parte de la flora microbiana normal de la piel y mucosas en humanos y otras se encuentran sólo entre la flora de animales mamíferos y aves. Las bacterias de este género son cocos, grampositivas, de 0.5 a 1.5µm de diámetro, que se agrupan de forma irregular (Gutiérrez, 2003).

El nombre del género procede del griego *staphylé*, que significa “en racimo de uvas”. Son bacterias inmóviles, no forman esporas, generalmente no poseen cápsula, en raras excepciones son anaerobias facultativas, no requieren medios enriquecidos para crecer, la mayoría de especies producen catalasa (esta característica se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y

Enterococcus que no producen esta enzima. En medios de cultivo no selectivos, la mayoría de las especies crecen después de 18-24 horas de incubación formando colonias de 1 a 3 mm de diámetro. Tras 24 horas de incubación, crece formando colonias lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros. Típicamente, presentan una consistencia cremosa, con una coloración amarillenta o dorada, debida a la producción de un pigmento carotenoide, casi todas las cepas tienen un halo de β -hemólisis cuando crecen en medios de cultivo con sangre. La principal característica que diferencia a *S. aureus* de las demás especies de estafilococos es la producción de la enzima coagulasa, que permite a la bacteria coagular el plasma, son resistentes al calor y a la desecación y pueden crecer en medios con elevada salinidad. La mayoría de las cepas de *S. aureus*, están recubiertas uniformemente por una proteína, denominada proteína A, la cual se utiliza para una prueba específica de aglutinación con anticuerpos monoclonales en la identificación de ésta (Koneman, 2008).

Crece bien en medios de cultivo no selectivos, como agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro-corazón. El medio selectivo para aislar esta bacteria en el laboratorio clínico es el medio Agar Manitol Sal (medio de Chapman), que por su elevado contenido en sal inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias gramnegativas.

Además este medio permite realizar una identificación presuntiva basándose en la coloración amarilla característica que adquieren las colonias. *S. aureus* fermenta manitol con producción de ácido, produciendo un cambio de color del medio que vira de rosa pálido a amarillo, mientras que los estafilococos coagulasa negativos no fermentan manitol y crecen en el medio formando colonias de color blanco-rosado. Otra característica específica de *S. aureus* es la producción de una ADNsa termoestable que se puede identificar fácilmente mediante cultivo en medios que contienen ADN, por ejemplo, el medio ADN verde-malaquita. Otras pruebas que ayudan en la identificación, aunque no son específicas de esta especie, son la fermentación del manitol y la producción de fosfatasa alcalina (Pahissa, 2009).

***Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA)**

Es un patógeno importante que causa infecciones tanto nosocomiales como de la comunidad. El mecanismo responsable de meticilino-resistencia en *S. aureus* está basado en la producción de una proteína ligadora de penicilina adicional de baja afinidad (PLP 2a), la cual es codificada por el gen *mecA*. Dentro de las técnicas fenotípicas para determinar meticilino-resistencia se puede mencionar el screening de oxacilina en agar Mueller Hinton, el método de difusión por discos, CIM por dilución, E-test, tarjetas de Vitek GPS-SA. El screening de oxacilina constituye el método fenotípico de referencia para determinar resistencia a meticilina en cepas de *S. aureus* (Soloaga, 2004).

El agar Baird Parker es un medio de cultivo utilizado usualmente en microbiología de alimentos, cuando se busca la detección de *Staphylococcus* coagulasa positivos, principalmente, *S. aureus*. El medio consiste en un medio base con glicina, piruvato de sodio, cloruro de litio, y un suplemento que contiene telurito de potasio y yema de huevo. El cloruro de litio y el telurito potásico suprimen el crecimiento de organismos no deseados, el piruvato de sodio y la glicina favorecen la recuperación de las células dañadas y potencian el crecimiento de los estafilococos coagulasa positivos, la yema de huevo se

usa para evidenciar la acción bacteriana sobre la lecitina y sobre la lipovitulina (lipoproteína) y es responsable de la opacidad del medio. Las colonias de *S. aureus* luego de 30 horas de incubación se observan negras y brillantes, rodeadas de una zona clara distinguible del resto del medio opaco y generalmente con un borde delgado opaco alrededor de las colonias. El color negro se debe a la reducción del telurito a telurio metálico (Rodríguez, s. f.).

Shigella

Shigella es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, bacilo Gram negativo, mide de 1-3µm por 0.6µm de diámetro. Esta bacteria se presenta solo en parejas, es inmóvil, no es esporformador ni encapsulado. Son bacterias fermentadoras de la glucosa sin producción de gas ni ácido sulfhídrico. No desdoblan la urea, reducen nitratos a nitritos. Son aerobios o anaerobios facultativos con temperatura óptima de 37°C y un pH de 7.6 a 7.8. El género *Shigella* tiene cuatro especies: *dysenteriae*, *flexneri*, *boydii* y *soneii*. Cada especie tiene varios serotipos, cada uno está determinado por los lipopolisacáridos de la pared celular, conocidos como antígenos O (Romero, 2007).

El nombre de esta bacteria se debe al científico que la descubrió, el cual era de apellido Shiga. La bacteria puede causar una enfermedad infecciosa llamada shigelosis, la mayoría de personas que padecen esta afección desarrollan diarrea, fiebre, calambres abdominales. En ocasiones puede causar disentería (diarrea sanguinolenta). La enfermedad generalmente resuelve de 5 a 7 días y no requiere hospitalización. Infecciones severas con fiebre alta pueden estar asociadas a convulsiones en niños menores de dos años. Algunas personas infectadas pueden no desarrollar síntomas pero aun así pueden transmitirla a otros (CDC, 2013).

La transmisión de la enfermedad se produce generalmente por la vía fecal-oral, pero también por consumo de agua y alimentos contaminados. Las moscas también pueden servir de vehículo en la transmisión. Una vez ingerida la bacteria esta actúa de forma invasiva y después de haber pasado el estómago alcanzan el intestino grueso y se multiplican, luego penetran el epitelio del colon y causan úlceras en la mucosa. La dosis infectiva es de 10-100 bacterias. Este microorganismo se puede encontrar en el ambiente: agua de ríos, estanques, suelos y cualquier material contaminado con heces. Puede sobrevivir a temperatura ambiente en heces, vegetales y frutas contaminadas. Además pueden sobrevivir en queso por varias semanas (Pascual, et.al. 2000).

Cualquier alimento no sometido a calentamiento antes de su ingestión conlleva a un riesgo de contaminación si ha sido mal manipulado por un portador que descuida su higiene personal y las normas de manipulación de alimentos. Se consideran de alto riesgo las verduras que han crecido en suelos contaminados regados con aguas residuales, las frutas y vegetales crudos y mal lavados (Pascual, 2005).

Salmonella

Salmonella es la enterobacteria más estudiada entre los patógenos aislados de alimentos debido a la alta incidencia del padecimiento que origina. Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es de forma bacilar, no produce esporas, habitualmente

móvil mediante flagelos peritricos, anaerobio facultativo, no produce ureasa, no utiliza el malonato de sodio, no licúa la gelatina, no se desarrolla en presencia de cianuro de potasio; no fermenta la sacarosa, la salicina, la rafinosa ni la lactosa. Descarboxila la arginina, la ornitina y la lisina. Existen múltiples excepciones, pero presenta dos cualidades especiales: la presencia de una estructura antigénica base para la identificación entre sus miembros y la patogenicidad que exhibe hacia los humanos y animales (Olivas & Alarcón, 2004).

La transmisión de *Salmonella* es fundamentalmente por contaminación fecal de alimentos. Las fuentes más importantes de *Salmonella* son los alimentos proteicos de origen animal, aunque también es posible la contaminación a partir de agua, vegetales crudos, coco, aditivos y otros productos. Para que se desarrolle enfermedad con sintomatología clínica se requiere la ingesta de un gran inóculo (10⁸-10¹⁰ células). Cualquiera que sea la fuente, los alimentos causantes de brotes de salmonelosis han estado en contacto con heces, directa o indirectamente, conteniendo una cantidad suficiente de bacterias para poder desencadenar la enfermedad. Otras veces, aunque el número de bacterias es escaso, si el alimento reúne las condiciones óptimas para su desarrollo, puede conseguirse la dosis infectante adecuada (Gómez, 2002).

Esta bacteria puede subsistir en el intestino del hombre y de los animales sin que ésta represente daño alguno, produciendo malestar corporal como vómitos, diarreas y fiebre o causando en menor ocasión daños irreparables (la muerte). Puede evitarse el contagio de *Salmonella* si se calientan los alimentos a una temperatura aproximada a 80 C, si se mantienen los alimentos bien refrigerados, y manteniendo una buena limpieza de las manos y de los alimentos (Metz & Gil, 2008).

Aislamiento biodirigido e identificación de principios activos

Significa someter los extractos a sistemas de separación para obtener fracciones más simples, ensayar esas fracciones y continuar las separaciones con las fracciones activas hasta obtener los compuestos activos purificados, para seguidamente elucidar su estructura. Nuevamente, en esta etapa es necesario disponer de un ensayo biológico-farmacológico, preferentemente *in vitro*, que sea pertinente, precise poca cantidad de muestra y permita procesar el número de muestras generalmente grande que se generan en el fraccionamiento.

Para los procesos de fraccionamiento y purificación se utilizan, principalmente, técnicas cromatográficas preparativas. Entre ellas, se encuentran la cromatografía en capa fina centrífuga, diversos sistemas de cromatografía en columna (clásica, flash, y a baja, media o alta presión) y las técnicas a contra-corriente, entre otras.

Para la identificación de la moléculas aisladas, se utilizan principalmente técnicas espectroscópicas, entre las que destacan la espectroscopia ultravioleta-visible y la infrarroja (IR), la resonancia magnética nuclear (RMN, especialmente de protón y de carbono-13, mono y bidimensional), la espectroscopia de masas (EM), el dicroísmo circular y la difracción de rayos X. Finalmente, cabe señalar que el acoplamiento directo de técnicas cromatográficas a técnicas espectroscópicas ha abierto numerosas posibilidades analíticas que se incrementan día a día.

Los estudios etnofarmacológicos pueden contribuir a la innovación de los agentes terapéuticos por cuatro vías principalmente:

- Mediante la validación de remedios tradicionales que permiten un uso más racional de los mismos.
- Mediante el desarrollo de medicamentos fitoterápicos a base de drogas vegetales o sus productos extractivos, correctamente estandarizados y estudiados desde un punto de vista farmacológico, toxicológico y clínico.
- Mediante el descubrimiento de moléculas bioactivas que pueden ser utilizadas como fármacos sin modificar para el desarrollo de medicamentos.
- Mediante el descubrimiento de moléculas bioactivas que pueden ser empleadas como cabezas de serie para el desarrollo de análogos. Pueden ser cabezas de serie químicas, por su particular estructura, o farmacológicas por poseer, por ejemplo, un mecanismo de acción innovador.

La búsqueda de fármacos a partir de fuentes naturales es mucho más eficiente que la síntesis, como lo demuestra el hecho de que se conocen más de 10 millones de compuestos sintéticos y sólo unas 110.000 moléculas naturales, lo cual dista mucho de la relación entre fármacos de origen sintético y de origen natural. A parte de su gran diversidad estructural, hay que tener en cuenta que en algunos aspectos las moléculas naturales son complementarias de las sintéticas, especialmente en lo que se refiere al tipo de farmacóforos que presentan.

Según Cragg *et al.* (1997), de los 520 fármacos aprobados por la FDA y agencias similares de otros países en el período 1983-1994, el 44,4% tienen, directa o indirectamente, su origen en un producto natural. Los grupos en los que éstos tienen una mayor incidencia son los antibacterianos y los anticancerígenos, en los que, respectivamente, un 78% y un 61% de los nuevos fármacos son moléculas naturales o derivadas de las mismas.

Si pensamos en los medicamentos de origen vegetal, una de las cuestiones que se plantean al iniciar la investigación es el criterio a utilizar para seleccionar las especies vegetales para iniciar la búsqueda de nuevos fármacos.

Existen básicamente dos tipos de selección:

La **selección al azar**, que consiste en investigar especies vegetales sin emplear un criterio específico para su selección.

La **selección dirigida**, en la que las especies a investigar se seleccionan siguiendo un criterio específico.

Se han utilizado principalmente dos tipos de criterios el quimiotaxonómico, basado en el hecho de que las plantas botánicamente cercanas suelen presentar componentes con estructuras químicas relacionadas. Se trata de un criterio útil para hallar nuevas fuentes para determinados tipos de estructuras, pero poco innovador y el criterio etnofarmacológico, basado en seleccionar plantas empleadas como medicinales tradicionalmente por el hombre. La selección con un criterio etnofarmacológico ha resultado mucho más eficiente que la selección al azar.

Los estudios etnofarmacológicos pueden contribuir a la innovación de los agentes terapéuticos por cuatro vías principalmente:

Mediante la validación de remedios tradicionales que permiten un uso más racional de los mismos, el desarrollo de medicamentos fitoterápicos a base de drogas vegetales o sus productos extractivos, correctamente estandarizados y estudiados desde un punto de vista farmacológico, toxicológico y clínico, descubrimiento de moléculas bioactivas que pueden ser utilizadas como fármacos sin modificar para el desarrollo de medicamentos, descubrimiento de moléculas bioactivas que pueden ser empleadas como cabezas de serie para el desarrollo de análogos. Pueden ser cabezas de serie químicas, por su particular estructura, o farmacológicas por poseer, por ejemplo, un mecanismo de acción innovador.

En los últimos tiempos los compuestos naturales cobran importancia y en la actualidad son motivo de investigación por su amplia aplicabilidad en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, la misma que busca mejorar las técnicas de separación para obtener extractos naturales de gran pureza, que garanticen la calidad e inocuidad de los extractos obtenidos y que no provoquen riesgos para la salud (Esquivel & Vargas, 2007)

La extracción con solventes es uno de los métodos más antiguos de separación utilizados en la industria agroalimentaria ya que su implementación es relativamente fácil, sin embargo presenta muchas limitaciones. Comúnmente la extracción no es selectiva, es decir, muchos compuestos indeseables están presentes en el extracto. En ocasiones es necesario trabajar con tratamientos térmicos lo que sumado al solvente orgánico ocasiona una degeneración de los principios activos de interés. Además el uso de solventes orgánicos representan un grave riesgo de contaminación en los residuos extraídos y al medio ambiente (Reverchon, 2008).

Comercialización de los productos naturales

Históricamente los productos de origen vegetal han pasado de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico occidental a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las últimas décadas, una presencia cada vez mayor.

En Alemania, por ejemplo, el porcentaje de la población que utiliza medicamentos fitoterápicos ha experimentado un aumento, entre 1970 y 1997, de entre un 4% y un 92% dependiendo de las patologías. Un 66% de los alemanes utilizan preparados de la Fitoterapia para combatir el resfriado. En Francia, en cambio, el mercado está liderado por los productos para el tratamiento de trastornos circulatorios (44%), seguido por los digestivos, antitusígenos y productos para el tratamiento del resfriado.

En EE.UU. de Norteamérica, según Eisenberg *et al.*, las terapias alternativas – entendiéndose por tales las que nos se enseñan en las facultades de medicina - reciben una atención creciente tanto por parte del público y los medios de comunicación como de la comunidad médica y las agencias gubernamentales. El porcentaje de la población americana que utiliza algún tipo de terapia alternativa ha aumentado del 39% al 42% entre 1990 y 1997. De todas las terapias incluidas en la encuesta de Eisenberg *et al.*, la Fitoterapia es la que ha reunido un mayor crecimiento absoluto, pasando del 2.5% (1990) al 12.1% (1997). Las alergias, el insomnio, los problemas respiratorios y los digestivos constituyen las situaciones en las que más se recurre a la Fitoterapia.

Según otros autores, en Norteamérica más de un tercio de la población consume plantas medicinales. Este fenómeno llegó a provocar que las empresas de aseguraciones médicas comiencen a ofrecer programas y prestaciones en este campo, y las facultades de medicina ofrecen cursos de medicina basadas en estas terapias.

Específicamente en EE.UU. de Norteamérica las 4 plantas más usadas en los últimos dos años fueron ginkgo, equinácea, ajo y ginseng. Este retorno progresivo hacia el uso de los productos de origen natural en terapéutica ha sido estimulado, en parte, por el regreso a lo natural que se ha producido en forma genérica en la sociedad. Sin embargo, existen otros factores que también han jugado un papel importante:

- el descubrimiento de efectos adversos en fármacos de síntesis,
- el mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus derivados,
- el desarrollo de nuevos métodos analíticos puestos a disposición del control de calidad y
- el desarrollo de nuevas formas de preparación y administración. Así por ejemplo, en el mercado francés, las cápsulas de droga pulverizada y de extractos (44%) han superado ampliamente los preparados tradicionales en base a infusiones y tisanas (27%), que se han situado en segundo lugar, seguidas por las formas líquidas (17%).

Por otra parte, los medicamentos de la Fitoterapia o fitofármacos, salvo escasas excepciones, no son apropiados para situaciones agudas o de emergencia. Se prescriben principalmente por médicos naturistas o clínicos o son utilizados en régimen de automedicación, con frecuencia como consecuencia del consejo de profesionales sanitarios no médicos.

En el mercado mundial, el 50% de las plantas son usadas en alimentación humana, 25% en cosmética, 20% en la industria farmacéutica y un 5% en otros rubros. La producción proviene principalmente de países en desarrollo (América, África y Asia: India y China), y se dirige a los países desarrollados: UE, EE.UU. de NA y Japón. Se estima que en el mundo se utilizan unas 10.000 especies vegetales como medicinales, en su mayor parte en sistemas de medicina tradicional. De estas especies, sólo un número relativamente reducido se emplea con un volumen significativo. A título de ejemplo, la medicina tradicional china utiliza unos 9.900 materiales de origen vegetal, pero sólo unos 500 son empleados en forma habitual (Kuipers, 1995). De cualquier forma, se estima que en China un 40% del total de los medicamentos corresponde a preparados de la medicina tradicional (Horeau & Da Silva, 1999). Un estudio del International Trade Center del año 1982 estimaba que se utilizaban unas 400 especies vegetales en Europa (Kuipers, 1995), pero un análisis más reciente del Traffic International considera que unos 2.000 taxa de plantas medicinales y aromáticas son objeto de algún tipo de comercio en Europa.

De éstos, 1.200 a 1.300 son especies nativas europeas, un 90% de las cuales provienen de la recolección del material silvestre, lo que representa una cantidad estimada de entre 20.000 a 30.000 t anuales.

El mercado mundial de plantas medicinales está estimado en más de US\$ 12.000 millones/ año (2001), lo que representa el 5% del mercado farmacéutico. Se calcula que, a nivel mundial, el valor de las importaciones de plantas medicinales aumentó un 55% entre

1976 y 1980, pasando de US\$ 355 millones a US\$ 551 millones (Principe, 1989). Según otras fuentes, en 1994 este valor habría superado los US\$ 824 millones.

La importación de plantas medicinales y aromáticas en Europa entre 1992 y 1996 (Lange, 1998) alcanzó una media anual de unas 120.000 t, valoradas en unos US\$ 335 millones, con un crecimiento del 21% desde 109.000 t en 1992 a 132.000 t en 1996. El valor de las importaciones tuvo variaciones, pero globalmente tuvo un incremento del 15%. Un 60% de las importaciones provienen de países no europeos y el 40% restante de países europeos. Aproximadamente el 90% de las importaciones van destinadas a países de la Unión Europea. El principal país importador es Alemania, siguiéndole Francia, Italia, Reino Unido y España).

En lo que se refiere a las exportaciones de plantas medicinales y aromáticas desde países europeos, el volumen medio anual en el período 1992-1996 estuvo alrededor de las 70.000 t. El total de las exportaciones europeas aumentó un 21% pasando de 54.000 t en 1992 a 71.000 t en 1996 (Lange, 1998).

Otro dato en el sentido del crecimiento en la utilización de plantas para la producción de medicamentos, se encuentra en la División de Estadística de la Naciones Unidas, donde se indica que el volumen de las importaciones de alcaloides y heterósidos de origen vegetal y sus derivados, se ha multiplicado por 6 y 9 respectivamente, entre 1996 y 1999 (Kuipers, 1995).

Evolución del mercado de los preparados fitoterápicos

Si se pasa de la materia prima al producto terminado, se observa que también la utilización de los preparados de Fitoterapia sigue una línea ascendente en todo el mundo occidental. No debe olvidarse que su relevancia en otras culturas, como la china, india o africana, abarcadoras de más de la mitad de la población mundial, es milenaria y a la vez totalmente actual. Sin embargo, la expansión en Occidente representa mucho más que una simple moda y no está relacionada solamente con el interés creciente por los “tratamientos naturales” de los problemas de salud, sino también con la evidencia creciente acerca de su seguridad y eficacia (Busse, 2000; Dechamp, 1999).

Se estima que el valor global del mercado de los preparados basados en plantas medicinales alcanzó los US\$ 19.580 millones en 1999, con una proyección para el 2002 de US\$ 24.180 millones. Europa presenta en los dos períodos las cifras más altas, siguiéndole Asia, EE.UU. de Norteamérica y Japón. No existe unanimidad en el tratamiento que los diferentes países europeos dan a este tipo de productos. Mientras que en unos son considerados principalmente como medicamentos, en otros su comercialización se efectúa preferentemente como suplementos alimentarios o dietéticos. Este hecho condiciona los canales de comercialización (farmacias, herbolarios y tiendas de dietética, supermercados),

cuya significación varía de un país a otro. Esta situación se debe fundamentalmente a la falta de armonización entre las regulaciones, situación que en Europa se canaliza a través de la Agencia Europea del Medicamento (EMEA) mediante su grupo de trabajo sobre medicamentos basados en plantas (HMPWG) (Biffignandi & Carletto, 2000; Grünwald, 1998; Cañigüeral, 2002).

En EE.UU. de Norteamérica aproximadamente el 45% de la población utiliza fitomedicinas y productos naturales así como productos de herboristería.

En Canadá, el mercado correspondiente a medicamentos provenientes de plantas medicinales está evaluado en US\$ 200 millones, comparado con el de 9.000 millones de medicinas sintéticas (Centre Québécois de Valorisation des Biomasses et des Biotechnologies, CVBQ).

El Nutritional Business Journal (Brown, 1998) estimó que el mercado norteamericano de plantas medicinales había alcanzado un valor de alrededor de 5.000 millones de dólares. Por otra parte, el Natural Marketing Institute's ha estimado que solamente el rubro de suplementos vegetales, un sector del mercado norteamericano de plantas medicinales, alcanzó en 2001 unos 4.000 millones de US\$ (Molyneaux, 2002). Lo que indica que el mercado de productos naturales está creciendo rápidamente y ganando en popularidad.

En América del Sur, las necesidades de medicamentos son crecientes y su evolución es directamente proporcional al agravamiento de los indicadores de salud, los que a su vez son determinados fundamentalmente por los indicadores socio-económicos, sin embargo, la situación presenta particularidades de acuerdo al país que se considere.

PARTE III

III. RESULTADOS

3.1 Colecta y secado del material

Para la adquisición del material vegetal se compraron 5 libras de *Litsea guatemalensis* (laurel) de la distribuidora Juanitas, ya que en la primera fase del proyecto Fodecyt 51-09, dicha muestra presentó resultados interesantes respecto a su actividad biológica y composición química. Además se realizaron colectas de laurel en Sololá, Cerro Alux y San Miguel Dueñas Sacatepéquez, la especie recolectada fue *L. guatemalensis* en todos los casos; dichos puntos de colecta fueron muestreados durante la primera fase del estudio, por lo que ya se contaba con datos sobre la actividad biológica de dichas muestras.

En el cuadro 1 se presenta el porcentaje de humedad en las muestras colectadas.

Cuadro 1. Secado de material vegetal recolectado de *L. guatemalensis*

Procedencia	Peso droga vegetal (Kg)	Humedad inicial (%)	Humedad final (%)
Juanitas	2.5	18.0	6.0
Cerro Alux	2.0	36.0	8.0
San Miguel Dueñas, Sacatepéquez	5.0	15.0	7.0
Sololá	3.0	13.0	5.0

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

3.2 Fraccionamiento mediante partición líquido-líquido

Para realizar el fraccionamiento mediante partición líquido-líquido se inició con un extracto etanólico, obtenido de la Fase I del proyecto Fodecyt 51-09, del cual se tomaron los extractos que habían presentado la mejor actividad. Se utilizaron tres diferentes disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y butanol).

Debido al bajo rendimiento de las particiones más apolares, se tuvo la necesidad de procesar material vegetal para la elaboración de extracto etanólico. Según los rendimientos de las particiones se puede observar que los mejores rendimientos se obtuvieron en las muestras de acetato de etilo (38-59%) y las más bajas fueron las particiones hexánicas (1-3%).

Cuadro 2. Porcentaje de rendimiento de extractos etanólicos y de extracción líquido-líquido a partir de extracto etanólico al 95%

Muestra	Disolvente	Materia vegetal (g)	Peso del extracto etanólico (g)	Particiones obtenidas (g)	Porcentaje de Rendimiento
Muestra 4E	Etanol				
	Hexano		20.0	0.4	2.0
	Acetato de Etilo		20.0	11.0	55.0
San Miguel Dueñas	1-Butanol		20.0	0.9	4.5
Muestra 5E	Etanol	100.0	17.3	-----	17.3
	Hexano		17.0	0.6	3.5
	Acetato de Etilo		17.0	7.2	42.3
San Miguel Dueñas	1-Butanol		17.0	0.9	5.3
Muestra 17E	Etanol	200.0	4048	-----	20.24
	Hexano		14.9	0.4	2.7
	Acetato de Etilo		14.9	8.9	59.7
Cerro Alux	1-Butanol		14.9	2.1	14.1
Muestra 20E	Etanol	200.0	34.0	-----	17.0
	Hexano		12.8	0.08	0.6
	Acetato de Etilo		12.8	5.9	46.1
Sololá	Butanol		20.0	2.6	13.0
Muestra 22E	Etanol	100.0	30.2	-----	30.2
	Hexano		20.0	0.2	1.0
	Acetato de Etilo		20.0	7.6	38.0
marca comercial Juanitas	1-Butanol		20.0	4.8	24.0

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

3.3 Comparación del porcentaje de rendimiento de la extracción de aceite esencial en escala de laboratorio y escala planta piloto.

En el cuadro 3 se presentan los porcentajes de rendimiento de extracción de aceite esencial a escala laboratorio y escala piloto observándose importantes diferencias en los rendimientos.

Cuadro 3. Porcentaje de rendimiento de extracción de aceite esencial en escala de laboratorio y escala piloto.

Procedencia	Rendimiento Escala Piloto (%)	Rendimiento Escala Laboratorio (%)
Laboratorio Quinfica	0.12	0.42±0.26
Distribuidora Juanitas	0.034	1.1±0.18
Droguería Liza	0.1703	1.19±0.16
Terminal	0.0181	1.09±0.14

Fuente: Datos Experimental FODECYT 07-2012

Identificación de cumarinas por técnica macrométrica y cromatografía en capa fina de extractos de laurel.

Como se observa en el cuadro 4 se presenta la identificación de cumarinas por dos métodos el macrométrico, empleando papel filtro y por la cromatografía en capa fina. Se observa una concordancia en los resultados, ya que los que no presentaron cumarinas en papel no presentaron bandas en la cromatografía en capa fina.

Cuadro 4. Identificación de Cumarinas por medio del método macrométrico y Cromatografía en Capa Fina

Muestra	Disolvente	Técnica Macrométrica	Cromatografía de Capa Fina		
		Papel filtro	No. Banda	Color de banda	Rf
Muestra 4E San Miguel Dueñas	Hexano	-	--	---	---
	Acetato de Etilo	-	--	---	---
	1-Butanol	++	1	Azul	0.50
Muestra 5E San Miguel Dueñas	Hexano	+	1	Azul	0.50
	Acetato de Etilo	+++	1	Azul	0.50
	1-Butanol	++	1 2	Azul Azul	0.50 0.60
Muestra 17E Cerro Alux	Hexano	-	--	---	---
	Acetato de Etilo	-	--	---	---
	1-Butanol	++	1	Azul	0.50
Muestra 20E Sololá	Hexano	+++	1	Azul	0.62
	Acetato de Etilo	++	1 2	Azul Azul	0.50 0.65

		Técnica Macrométrica		Cromatografía de Capa Fina		
Muestra	Disolvente	Papel filtro	No. Banda	Color de banda	Rf	
Muestra 22E marca comercial Juanitas	Hexano	+	1	Azul	0.50	
	Acetato de Etilo	+++	1	Azul	0.52	
			2	Azul	0.66	
	1-Butanol	++	1	Azul	0.50	
Cumarinas	Estándar	++	1	Azul	0.8	
Ácido <i>p</i> - cumarínico	Estándar	++	1	Azul	0.65	
Escopoletina	Estándar	++	1	Azul	0.50	

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-201

Identificación de aceites esenciales en extractos de laurel por cromatografía en capa fina.

En el cuadro 5 se muestran la detección de aceites volátiles en las particiones de las diferentes procedencias, presentándose bandas principalmente en las particiones apolares (hexánicas), lo cual demuestra la afinidad de dichos compuestos con el disolvente utilizado.

Cuadro 5. Identificación de aceites por cromatografía en capa fina

Muestra	Disolvente	Banda	Color de banda	Rf
Muestra 4E San Miguel Dueñas	Hexano	1	Verde	0.18
		2	Verde	0.42
	Acetato de Etilo	--	--	--
		1-Butanol	--	--
Muestra 5E San Miguel Dueñas	Hexano	1	Amarillo	0.14
		2	Verde	0.42
		3	Amarillo	0.50
	Acetato de Etilo	--	--	--
		1-Butanol	--	--
Muestra 17E Cerro Alux	Hexano	1	Amarillo	0.10
		2	Verde	0.18
		3	Café	0.65
	Acetato de Etilo	--	--	0.28
		1	Amarillo	

Muestra	Disolvente	Banda	Color de banda	Rf
Muestra 20E Sololá	Hexano	1	Amarillo	0.36
		2	Verde	0.42
	Acetato de Etilo	--	--	--
Muestra 22E marca comercial Juanitas	Hexano	1	Verde	0.22
		2	Amarillo	0.29
		3	Rojo	0.58
	Acetato de Etilo	--	--	--
	1-Butanol	--	--	--
Mentol	Estándares	1	Café	0.65
Timol		1	Rojo	0.58
Anisaldehído		1	Rojo	0.58
1,8-cineol		1	Amarillo	0.54

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos para la identificación de alcaloides observándose pocas bandas detectadas en las diferentes particiones analizadas, por lo que no se consideran metabolitos de mucha abundancia en las particiones.

Cuadro 6. Identificación de alcaloides por cromatografía en capa fina

Muestra	Disolvente	Banda	Color de banda	Rf
Muestra 4E San Miguel Dueñas	Hexano	---	---	---
		Acetato de Etilo	---	---
		1-Butanol	1	Café
Muestra 5E San Miguel Dueñas	Hexano	---	---	---
		Acetato de Etilo	---	---
		1-Butanol	1	Café
		2	Naranja	0.76
Muestra 17 E Cerro Alux	Hexano	---	---	---
		Acetato de Etilo	---	---
		1-Butanol	1	
		2	Café	0.56
Muestra 20E Sololá	Hexano	---	---	---
		Acetato de Etilo	1	Café

Muestra	Disolvente	Banda	Color	Rf
Muestra 22E marca comercial Juanitas	Hexano	1	Café	0.51
	Acetato de Etilo	2	Café	0.56
	1-Butanol	---	---	---
Atropina	Estándar	1	Naranja	0.03
Papaverina	Estándar	1	Naranja	0.82

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

En el cuadro 7 se muestran los resultados de sesquiterpenlactonas en la cual se evidencia en los extractos polares mayor presencia de dichos metabolitos.

Cuadro 7. Identificación de sesquiterpenlactonas por cromatografía en capa fina

Muestra	Disolvente	Banda	Color de banda	Rf
Muestra 4E San Miguel Dueñas	Hexano	1	Amarillo	0.07
		2	Verde	0.14
		3	Amarillo	0.43
	Acetato de Etilo	--	--	---
	1-Butanol	---	---	---
Muestra 5E San Miguel Dueñas	Hexano	1	Amarillo	0.24
	Acetato de Etilo	--	--	--
	1-Butanol	--	--	--
Muestra 17E Cerro Alux	Hexano	1	Amarillo	0.14
		2	Verde	0.21
		3	Amarillo	0.27
	Acetato de Etilo	--	--	--
	Muestra 20E Sololá	Hexano	1	Amarillo
Hexano		2	Amarillo	0.24
Acetato de Etilo		--	--	--
Muestra 22E marca comercial Juanitas	Hexano	1	Verde	0.07
		2	Amarillo	0.08
		3	Amarillo	0.14
	Acetato de Etilo	--	--	--
	1-Butanol	--	--	--
Artemisinina	Estándar	1	Amarillo	0.53

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Identificación de flavonoides en extractos de laurel por cromatografía en capa fina.

En el Cuadro 8 se muestran los resultados de Flavonoides para las fracciones en el cual, se observa la presencia en casi todas las particiones, especialmente en las fracciones polares por la estructura de dichos metabolitos, los cuales presentan mayor afinidad por los disolventes con características hidrofílicas.

Cuadro 8. Identificación de Flavonoides por cromatografía en capa fina

Muestra	Disolvente	Banda	Color de banda	Rf
Muestra 4E San Miguel Dueñas	Hexano	---	---	-
	Acetato de Etilo	1	Azul	0.44
		2	Amarillo	0.85
	1-Butanol	1	Amarillo	0.71
		2	Amarillo	0.76
Muestra 5E San Miguel Dueñas	Hexano	1	Azul	0.44
	Acetato de Etilo	1	Azul	0.44
		2	Verde	0.46
		3	Amarillo	0.72
	1-Butanol	1	Amarillo	0.72
		2	Amarillo	0.81
Muestra 17E Cerro Alux	Hexano	---	---	---
	Acetato de Etilo	1	Azul	0.44
		2	Verde	0.46
		3	Amarillo	0.72
		4	Amarillo	0.80
Muestra 20E Sololá	Hexano	1	Azul	0.44
	Acetato de Etilo	1	Azul	0.44
		2	Verde	0.46
Muestra 22E marca comercial Juanitas	Hexano	---	---	---
	Acetato de Etilo	1	Azul	0.44
		2	Verde	0.46
		3	Amarillo	0.72
	1-Butanol	1	Amarillo	

Muestra	Disolvente	Banda	Color de banda	Rf
Rutina	Estándares	1	Amarillo	0.43
Ácido Clorogénico		1	Azul	0.54
Quercetina		1	Amarillo	0.84
Ácido Cafeico		1	Azul	0.96

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuantificación de flavonoides en base a quercetina, en cada una de las particiones de extracto.

En el Cuadro 9 se muestran los Flavonoides expresados en base a quercetina y se confirma que las fracciones más polares presentan los porcentajes más altos siendo la partición butanólica procedente de San Miguel Dueñas la que llega hasta un 21%, considerándose una muestra muy promisoría por la riqueza de Flavonoides presentados.

Cuadro 9. Cuantificación de flavonoides totales en base a quercetina

Muestra	Disolvente	Flavonoides totales en base a quercetina (%)
Muestra 4E San Miguel Dueñas	Acetato de Etilo	4.98±0.29
	1-Butanol	1.24±0.23
Muestra 5E San Miguel Dueñas	Acetato de Etilo	2.92±0.13
	1-Butanol	21.00±0.35
Muestra 17E Cerro Alux	Acetato de Etilo	1.59±0.05
	1-Butanol	11.5±0.30
Muestra 20E Sololá	Acetato de Etilo	6.94±0.25
Muestra 22E marca comercial Juanitas	Acetato de Etilo	1.84±0.01
	1-Butanol	1.34±0.01

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cromatografía en capa fina para la determinación de actividad antioxidante con revelador de DPPH

Fraccionar extractos de laurel (*L. guatemalensis*) mediante partición líquido-líquido y cromatografía en columna y evaluar su actividad antioxidante y antimicrobiana.

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante por la técnica cromatográfica por la captación del radical libre difenil-picril-hidracilo (DPPH). En el Cuadro 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos del análisis por cromatografía en capa fina para extractos y aceites respectivamente observándose importante actividad.

Cuadro 10. Evaluación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina con revelador de DPPH

Muestra	Disolvente	Código	Actividad Antioxidante
San Miguel Dueñas	Etanol	4E	*++
	Hexano	4EH	+
	Acetato de etilo	4EA	++
	1-butanol	4EB	++
San Miguel Dueñas	Etanol	5E	++
	Hexano	5EH	+++
	Acetato de etilo	5EA	+++
	1-butanol	5EB	++
Cerro Alux	Etanol	17E	++
	Hexano	17EH	++
	Acetato de etilo	17EA	+++
	1-butanol	17EB	+++
Sololá	Etanol	20E	++
	Hexano	20EH	++
	Acetato de etilo	20EA	+++
	Butanol	20EB	+++
Marca comercial Juanitas	Etanol	22E	++
	Hexano	22EH	++
	Acetato de etilo	22EA	+++
	1-butanol	22EB	+
ESTÁNDARES	Quercetina	Q	+++
	Rutina	R	+++
	Ácido clorogénico	AC	++
	TBHQ	T	+++
	Pinocembrina	P	++
	Scopoletina	S	++

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012 * +++ Fuerte, ++ Medio, + Leve

Cuadro 11. Evaluación de la actividad antioxidante de aceite esencial de laurel por cromatografía en capa fina con revelador de DPPH

Código	Muestra	Resultado
4	San Miguel Dueñas	++*
5	San Miguel Dueñas	++
17	Cerro Alux	++
20	Sololá	++
22	Marca Comercial	++
Estándares	Mentol	++
	TBHQ	+++
	Limoneno	++
	Quercetina	+++

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012 *+++ Fuerte, ++ Medio, + Leve

Cuantificación de actividad antioxidante por técnica micrométrica de DPPH.

En el cuadro 12 se muestran los resultados cuantitativos de los extractos y particiones mediante la técnica micrométrica por DPPH, observándose los mejor rendimientos en las particiones polares lo cual muestra concordancia con la presencia de Flavonoides que podría explicar dicha actividad.

Cuadro 12. Actividad antioxidante de extractos etanólicos y particiones líquido-líquido de muestras de laurel, mediante la técnica micrométrica de DPPH

Código	Muestra	Extracto/partición	CI ₅₀ (mg/mL)
4E	San Miguel Dueñas I	Etanol al 95%	0.387±0.003
		Hexano	0.494±0.3
		Acetato de etilo	0.97±0.01
		Butanol	0.23±0.01
5E	San Miguel Dueñas II	Etanol al 95%	0.44±0.02
		Hexano	1.04±0.02
		Acetato de etilo	0.18±0.001
		Butanol	0.21±0.01
17E	Cerro Alux	Etanol al 95%	0.49±0.04
		Hexano	1.42±0.01
		Acetato de etilo	0.50±0.01
		Butanol	0.22±0.02
20E	Sololá	Etanol al 95%	0.49±0.03
		Hexano	1.58±0.05
		Acetato de etilo	0.24±0.01
		Butanol	0.34±0.02

Código	Muestra	Extracto/partición	CI ₅₀ (mg/mL)
22E	Distribuidora Juanitas	Etanol al 95%	0.32±0.02
		Hexano	0.245±0.01
		Acetato de etilo	0.49±0.01
		Butanol	0.196±0.002
Vitamina C			0.10±0.01
Quercetina			0.06±0.01
Rutina		Estándares	0.18±0.02
TBHQ			0.10±0.02
Trolox			0.15±0.01

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de cuantificación de fenoles expresados en base al ácido gálico, presentando la mayor cantidad igualmente los extractos polares principalmente butanólicos.

Cuadro 13. Cuantificación de fenoles totales en base a ácido gálico

Código	Muestra	Extracto/partición	mg equivalente de ácido gálico/mg de extracto
4E	San Miguel Dueñas I	Etanol al 95%	2.45±0.12
		Acetato de etilo	0.98±0.05
		Butanol	55.00±1.51
5E	San Miguel Dueñas II	Etanol al 95%	9.93±0.35
		Hexano	6.68±0.17
		Acetato de etilo	9.32±0.94
		Butanol	16.90±0.67
17E	Cerro Alux	Etanol al 95%	8.57±0.36
		Hexano	6.01±0.16
		Acetato de etilo	6.10±0.45
		Butanol	15.09±0.59
20E	Sololá	Etanol al 95%	10.67±0.34
		Hexano	7.22±0.23
		Acetato de etilo	7.16±0.33
		Butanol	3.52±0.13
22E	Distribuidora Juanitas	Etanol al 95%	4.46±0.12
		Acetato de etilo	2.58±0.08
		Butanol	4.32±0.20
Vitamina C			3.51±0.35
Quercetina			19.60±1.82
Rutina		Estándares	5.00±0.45
TBHQ			5.76±0.55
Trolox			3.56±0.41

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Determinación del índice de peróxido.

En el Cuadro 14 al 23, se presentan los índices de peróxidos presentados a lo largo del tiempo para evaluar la capacidad de auto oxidación de los extractos y aceites en las diferentes procedencias.

Cuadro 14. Determinación del índice de peróxidos en Lanolina con y sin extracto de etanol de Laurel procedente de San Miguel Dueñas (4E)

Día	meqprom O₂/Kg Lanolina sin extracto	meqprom O₂/Kg Lanolina con extracto (0.1g/g)
0	10.0	2.0 ± 0.01
14	14.0	2.0 ± 0.01
21	14.0	2.0 ± 0.01
41	12.0	10.7 ± 2.8
50	27.6	16.7 ± 0.3
56	28.3	17.2 ± 0.7
62	29.3	17.4 ± 0.8
69	29.3	33.4 ± 6.2
77	29.3	21.9 ± 4.5

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 15. Determinación de índice de peróxido en Lanolina con y sin extracto de etanol de Laurel procedente de San Miguel Dueñas II (5E)

Día	meqprom O₂/Kg Lanolina sin extracto	meqprom O₂/Kg Lanolina con extracto (0.1g/g)
0	32.3 ± 1.1	0
5	46.8 ± 1.6	50.8 ± 0.5
12	46.7 ± 1.5	50.5 ± 0.8
19	49.3 ± 1.3	51.2 ± 1.3
26	50.1 ± 0.1	51.5 ± 2.0
33	50.4 ± 4.6	51.1 ± 8.6
42	51.5 ± 2.13	52.0 ± 1.1

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 16. Determinación de índice de peróxido en Lanolina con y sin extracto de etanol de Laurel procedente de Sasson (17E)

Día	meqprom O₂/Kg Lanolina sin extracto	meqprom O₂/Kg Lanolina con extracto (0.1g/g)
0	32.3 ± 1.1	0
5	46.8 ± 1.6	52.0 ± 1.4
12	46.7 ± 1.5	53.0 ± 1.9
19	49.3 ± 1.3	48.7 ± 1.5
26	50.1 ± 0.1	51.0 ± 3.1
33	50.4 ± 4.6	52.0 ± 4.2
42	51.5 ± 2.1	51.5 ± 1.3

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 17. Determinación de índice de peróxido en Lanolina con y sin extracto de etanol de Laurel procedente Sololá (20E)

Día	meqprom O₂/Kg Lanolina sin extracto	meqprom O₂/Kg Lanolina con extracto (0.1g/g)
0	32.3 ± 1.1	0
5	46.8 ± 1.6	47.0 ± 1.1
12	46.7 ± 1.5	47.5 ± 1.9
19	49.3 ± 1.3	48.0 ± 2.4
26	50.1 ± 0.1	52.5 ± 1.2
33	50.4 ± 4.6	54.2 ± 2.5
42	51.5 ± 2.1	54.0 ± 0.5

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 18. Determinación de índice de peróxido en Lanolina con y sin extracto de etanol de Laurel procedente de Distribuidora Juanitas (22E)

Día	meqprom O₂/Kg Lanolina sin extracto	meqprom O₂/Kg Lanolina con extracto (0.1g/g)
0	32.3 ± 1.1	0
5	46.8 ± 1,6	46.5 ± 1.9
12	46.7 ± 1.5	50.8 ± 1.5
19	49.3 ± 1.3	51.2 ± 1.3
26	50.1 ± 0.1	60.1 ± 2.9
33	50.4 ± 4.6	56.7 ± 5.0
42	51.5 ± 2.1	56.2 ± 1.1

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 19. Determinación de índice de peróxido en Lanolina con y sin extracto de acetato de etilo de Laurel procedente de San Miguel Dueñas (4AE)

Día	meqprom O₂/Kg Lanolina sin extracto	meqprom O₂/Kg Lanolina con extracto (0.1g/g)
0	35.0 ± 2.1	0
8	36.0 ± 2.1	34.2 ± 7.2
15	50.0 ± 4.6	46.3 ± 6.2
22	54.1 ± 1.6	52.0 ± 5.7

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 20. Determinación de índice de peróxido en Lanolina con y sin extracto de acetato de etilo de Laurel procedente de San Miguel Dueñas (5AE)

Día	meqprom O₂/Kg Lanolina sin extracto	meqprom O₂/Kg Lanolina con extracto (0.1g/g)
0	35.0 ± 2.1	0
8	36.0 ± 2.1	36.0 ± 5.6
15	50.0 ± 4.6	49.2 ± 5.3
22	54.1 ± 1.6	52.1 ± 4.6

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 21. Determinación del índice de peróxidos en aceite vegetal con y sin extracto de etanol de Laurel procedente de distribuidora Sasson (17E)

Día	meqprom O₂/Kg Aceite sin extracto	meqprom O₂/Kg Aceite con extracto (0.1g/ml)
0	6.0 ± 0.2	5.4 ± 1.2
8	14.0 ± 1.4	18.2 ± 0.2
20	16.9 ± 0.4	21.8 ± 1.1
25	14.7 ± 0.9	22.0 ± 0.6

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 22. Determinación del índice de peróxidos en aceite vegetal con y sin extracto de etanol Laurel procedente de distribuidora Sololá (20E)

Día	meqprom O₂/Kg Aceite sin extracto	meqprom O₂/Kg Aceite con extracto (0.1g/ml)
0	13.2 ± 1.0	8.9 ± 1.0
8	14.0 ± 1.5	17.4 ± 2.7
20	16.8 ± 0.4	26.9 ± 1.4
31	18.5 ± 0.9	19.6 ± 3.1

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 23. Determinación del índice de peróxidos en aceite vegetal con y sin extracto de etanol de Laurel procedente de distribuidora Juanitas (22E)

Día	meqprom O2/Kg Aceite sin extracto	meqprom O2/Kg Aceite con extracto (0.1g/ml)
0	5.1	4.7 ± 0.5
7	18.3	10.7 ± 1.1
14	16.1 ± 5.3	20.9 ± 6.3
31	19.8 ± 0.5	33.9 ± 4.6

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Determinación de la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de laurel sobre cepas alimenticias.

En el cuadro 24 se presentan los resultados del tamizaje antibacteriano del extracto contra diferentes cepas bacterianas patógenas y alimenticias, empleando la cumarina escopoletina y el flavonoide pinocembrina reportados en laurel para detectar la efectividad de dichos metabolitos y establecer relaciones de actividad según los metabolitos presentes en los extractos.

Cuadro 24. Tamizaje antibacteriano de extracto etanólico de laurel sobre cepas bacterianas contaminantes de alimentos

Muestra	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>P. aeruginosa</i> 9027	<i>E. coli</i> 8739	<i>B. subtilis</i>	<i>M. smegmatis</i>
4E	-*	-	-	-	+	+
5E	-	-	-	+	+	+
17E	-	-	-	+	+	+
20E	-	-	-	-	+	+
22E	-	-	-	-	-	-
Escopoletina	-	-	-	+	-	-
Pinocembrina	-	-	-	+	+	+
Ampicilina	+	+	+	+	+	+
Vancomicina	-	+	-	+	+	+

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012 * (+) = inhibición, (-) = No hay inhibición

En el Cuadro 25 se presenta la concentración inhibitoria mínima de los extractos contra las cepas que fueron susceptibles, observándose la mayor actividad contra *B. subtilis* (0.16 mg/mL).

Cuadro 25. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos de etanol de laurel

Muestra	<i>M. smegmatis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
4E	0.62mg/ml	0.62mg/ml	-----
5E	0.31mg/ml	0.31mg/ml	0.31mg/ml
17E	0.62mg/ml	0.16mg/ml	0.62mg/ml
20E	-----	0.31mg/ml	0.31mg/ml
Ampicilina sulbactan	0.16 mg/ml	0.02 mg/ml	-----

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

En el cuadro 26 se muestran los resultados obtenidos para las particiones contra cepas bacterianas contaminantes de alimentos se puede observar que algunas particiones presentaron actividad contra algunas bacterias principalmente contra *B. subtilis*.

Cuadro 26 Tamizaje antibacteriano de particiones de extracto de laurel sobre cepas bacterianas contaminantes de alimentos

Muestra	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>P. aeruginosa</i> 9027	<i>E. coli</i> 8739	<i>B. subtilis</i>	<i>M. smegmatis</i>
4H	-	-	+	+	+	-
4B	-	-	-	-	-	-
5H	-	-	-	-	+	-
5AE	-	-	-	-	-	-
5B	-	-	-	-	-	-
17AE	-	-	-	-	-	-
17B	-	+	+	+	+	+
20AE	-	-	+	-	+	-
20B	-	-	-	-	+	-
22H	-	+	+	+	+	+
22AE	-	-	-	-	-	-
22B	-	-	+	+	+	+

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012 * (+) = inhibición, (-) = No hay inhibición

En el cuadro 27 se presenta la CIM de los extractos que mostraron actividad en la fase de tamizaje, presentando la menor CIM contra *B. subtilis* a una concentración de 0.16 mg/ml.

Cuadro 27. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) mg/mL de las particiones de laurel

Muestra	<i>Salmonella</i>	<i>P. aeruginosa</i> 9027	<i>E. coli</i> 8739	<i>B. subtilis</i>	<i>M. smegmatis</i>
4H	-----	1	1	0.62	-----
5H	-----	-----	-----	1	-----
17AE	-----	-----	-----	0.31	-----
17B	1	1	1	0.16	0.62
20AE	-----	1	-----	0.62	-----
20B	-----	-----	-----	1	-----
22H	1	1	1	0.62	1
22B	-----	1	1	0.31	1

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

En el Cuadro 28 se muestran los resultados del tamizaje antibacteriano de aceite esencial igualmente mostrando la mayor actividad contra *M. smegmatis* y *B. subtilis*.

Cuadro 28 Tamizaje antibacteriano de aceite de laurel por medio de la técnica de disco de difusión.

Aceites	BACTERIAS					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Sololá	-	-	+	+	-	-
Juanitas	-	-	+	+	-	-
Eritromicina 15mcg/disc	+	-	+	+	-	+
Vancomicina 30mcg/disc	-	-	+	+	-	-

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012 * (+) = inhibición, (-) = No hay inhibición

En el cuadro 29 se muestran los resultados de la CIM de los aceites por medio de la técnica de disco de difusión, determinándose una CIM de 7.5 µL.

Cuadro 29. Concentración Inhibitoria Mínima de actividad antibacteriana de aceite de laurel

Aceites	Bacterias	
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Sololá	7.5µL	7.5µL
Juanitas	7.5µL	7.5µL

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Determinación de la actividad antimicótica de extractos etanólicos de laurel.

En el cuadro 30 se muestran los resultados de la actividad antimicóticas contra 5 cepas de hongos, los cuales no mostraron ninguna efectividad.

Cuadro 30. Determinación de la actividad antimicótica de extractos etanólicos de laurel

Mx	<i>M. canis</i>	<i>M. gypsum</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A niger</i>
4E	-*	-	-	-	-
5E	-	-	-	-	-
17E	-	-	-	-	-
20E	-	-	-	-	-
22E	-	-	-	-	-

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012 * (+) = inhibición, (-) = No hay inhibición

Aislamiento de moléculas con fraccionamiento en columna.

El proceso para el aislamiento de moléculas inició con la desclorofilación del extracto disuelto en metanol. Ya desclorofilado se realizó el fraccionamiento líquido-líquido con hexano y diclorometano. De este proceso se obtuvieron tres fracciones una metanólica, una hexánica y una diclorometánica.

A las tres fracciones se les realizó una cromatografía en capa fina para identificar si presentaban moléculas de interés, pinocembrina y escopoletina, metabolitos secundarios reportados en las especies de laurel. La CCF se corrió con una fase móvil de hexano-acetato de etilo (3:2) y se observó en longitud de onda de 254nm.

Cuadro 31. Cromatografía en capa fina del aislamiento de moléculas de extracto etanólico de laurel de procedencia de Sololá

Muestra	Fracción	Marca	Rf
4E	Metanol	1	0.2
	Diclorometano	1	0.19
	Hexano	---	----
5E	Metanol	1	0.21
	Diclorometano	1	0.21
	Hexano	---	----
17E	Metanol	---	----
	Diclorometano	---	----
	Hexano	---	----
20E	Metanol	----	-----
		1	0.81
	Hexano	2	0.88

	Fracción	Marca	Rf
	Diclorometano	1	0.32
		2	0.38
		3	0.47
		4	0.54
		5	0.60
		6	0.68
		7	0.82
		8	0.88
22E	Metanol	1	0.20
		2	0.26
	Hexano	1	0.38
		2	0.62
		3	0.82
		4	0.97
	Diclorometano	1	0.15
		2	0.28
		3	0.43
		4	0.53
		5	0.63
		6	0.76
		7	0.82
		Escopoletina	1
	Pinocembrina	1	0.82

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 32. Cromatografía en capa fina de fracciones de lavado en columna de partición de diclorometano de muestra 5E

Muestra	Hexano:		Rf
	Acetato de Etilo	Marca	
5E	90:10	---	---
	70:30	1	0.3
	50:50	1	0.19
		2	0.29
	30:70	1	0.21
	0:100	1	0.23
Escopoletina	Estándar	1	0.23

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Elaboración de quesos de forma artesanal incorporando aceite de laurel.

En el Cuadro 33 se muestran los rendimientos de queso obtenidos a partir de 2000 ml de leche, elaborado de manera artesanal.

Cuadro 33. Porcentaje de rendimiento de queso

Tratamiento	ml de suero obtenido	Peso de sólidos obtenido (Queso)	Porcentaje de rendimiento (%)
1	1200	351.1	17.6
2	1300	322.4	16.1
3	1300	350.7	17.5

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Determinación de las características organolépticas.

En el cuadro 34 y 35, se describen las características organolépticas a los quesos preparado en tres tratamientos diferentes; el queso del tratamiento 1 se le incorporó aceite 30 minutos antes de realizar el proceso de cuajado; el queso del tratamiento 2 se le incorporó el aceite segundo antes del proceso de cuajado y el queso del tratamiento 3 no se le incorporo aceite. Todo este procedimiento se realizó con el fin de determinar la fase más adecuada para la incorporación del aceite y si el mismo no afectaba el sabor del mismo.

Para cada uno de los tres tratamientos de queso se prepararon unos sin sal y otros con sal; esto debido a que es un procedimiento de rutina la incorporación de sal al queso para darle sabor, se hizo esta diferenciación para determinar el comportamiento de los quesos con sal y sin sal y evaluar mejor las características organolépticas.

Cuadro 34. Características organolépticas en quesos sin sal

Tratamiento	Color	Olor	Sabor	Apariencia
Tx. 1	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 2	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 3	Blanco hueso	Lácteo	Normal/ Lácteo	Buena consistencia
Tx. 1	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 2	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 3	Blanco hueso	Lácteo	Normal/ lácteo	Buena consistencia
Tx. 1	Blanco amarillento	Lácteo ácido	Ácido/ desabrido	Buena consistencia
Tx. 2	Blanco amarillento	Lácteo ácido	Ácido/ no muy bueno	Buena consistencia
Tx. 3	Blanco amarillento	Lácteo ácido	Ácido/ desagradable	Buena consistencia

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Cuadro 35. Características organolépticas en quesos con sal

Tratamiento	Color	Olor	Sabor	Apariencia
Tx. 1	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 2	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 3	Blanco hueso	Lácteo	Normal/ lácteo	Buena consistencia
Tx. 1	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 2	Blanco hueso	Lácteo/ Laurel	Agradable/ Laurel	Buena consistencia
Tx. 3	Blanco hueso	Lácteo	Normal/ lácteo	Buena consistencia
Tx. 1	Blanco amarillento	Lácteo	Ácido/Laurel	Buena consistencia
Tx. 2	Blanco amarillento	Lácteo	Ácido/Laurel	Buena consistencia
Tx. 3	Blanco amarillento	Lácteo	Ácido/no muy agradable	Buena consistencia

Fuente: Datos Experimentales FODECYT 07-2012

Conteo microbiológico aeróbico en placa de los quesos elaborados con aceite e infusión de laurel.

En el Cuadro 36 al 38 se muestra los resultados del conteo microbiológico aeróbico de los quesos elaborados artesanalmente con los distintos tratamientos.

Cuadro 36. Conteo microbiológico aeróbico en placa

Muestra	Número de Lotes	Número de muestras	UFC/g o mL de muestra	Dilución contada
Leche	2	2	9±3	1000
Quesos con aceite	7	14	16±7	1000
Quesos sin aceite	7	14	43±10	1000
Quesos con infusión	7	14	36±9	1000
Quesos sin infusión	7	14	62±10	1000

Fuente: Datos Experimentales FODECY 07-2012

Cuadro 37. Conteo microbiológico aeróbico en placa de quesos elaborados con y sin aceite e infusión de laurel a los siete días de producción

Muestra	Número de Lotes	Número muestras	UFC/g o mL de muestra	Dilución contada
Quesos con aceite	7	14	MNPC*	1000
Quesos sin aceite	7	14	MNPC	1000
Quesos con infusión	7	14	MNPC	1000
Quesos sin infusión	7	14	MNPC	1000

Fuente: Datos Experimentales FODECY 07-2012 * Muy Numeroso Para Contar

Cuadro 38. Evaluación de parámetros microbiológicos de los quesos elaborados según Reglamento Técnico Centroamericano (RTC)

Tipo de muestra	Análisis microbiológico	Resultado	Valor de referencia	Dictamen
Queso con aceite de laurel	Grupo coliforme	100 UFC	<1000 UFC	Apto
	<i>E. coli</i>	<10 UFC	<20 UFC	
	<i>S. aureus</i>	50 UFC	≤10000 UFC/ g o mL	
	Mohos y levaduras	-----	≤10000 UFC/ g o mL	
	Gérmenes del Ambiente	-----	≤10000 UFC/ g o mL	
	<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia en 25g	
Queso con infusión de hojas de laurel	Grupo coliforme	120 UFC	<1000 UFC	Apto
	<i>E. coli</i>	<10 UFC	<20 UFC	
	<i>S. aureus</i>	<1000 UFC	≤10000 UFC/ g o mL	
	Mohos y levaduras	-----	≤10000 UFC/ g o mL	
	Gérmenes del Ambiente	-----	≤10000 UFC/ g o mL	
	<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia en 25g	

Datos: Laboratorio de Control Microbiológico de Alimentos Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Conteo microbiológico aeróbico en placa de los chorizos precocidos con hojas de laurel.

En el cuadro 39 y 40, se muestran los resultados del conteo microbiológico aeróbico de los chorizos precocidos elaborados artesanalmente en el laboratorio de alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Cuadro 39. Conteo microbiológico aeróbico en placa chorizo precocido elaborado con hojas de laurel, durante varias semanas

Muestra	Tiempo	UFC/g o mL de muestra	Dilución contada
Chorizo blanco	0	0	10
Chorizo blanco	7	0	10
Chorizo blanco	14	0	10
Chorizo blanco	21	15	10
Chorizo con laurel	0	0	10
Chorizo con laurel	7	0	10
Chorizo con laurel	14	0	10
Chorizo con laurel	21	0	10

Fuente: Datos Experimentales FODECY 07-2012 * Muy Numeroso Para Contar

Cuadro 40. Evaluación microbiológica de chorizo con hojas de laurel elaborados según Reglamento Técnico Centroamericano (RTC)

Tipo de muestra	Análisis microbiológico	Resultado	Valor de referencia	Dictamen
Chorizo día 0	Grupo coliforme	110 UFC/g	<1000 UFC	Apto
	Coliformes fecales	10 UFC/g	<100 UFC	
	<i>E. coli</i>	< 10 UFC/g	<20 UFC	
	<i>S. aureus</i>	<1000 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Mohos y levaduras	<10 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Gérmenes del Ambiente	8400 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	<i>Salmonella spp</i>	Ausencia/25g	Ausencia en 25g	

Tipo de muestra	Análisis microbiológico	Resultado	Valor de referencia	Dictamen
Chorizo día 7	Grupo coliforme	< 10 UFC/g	<1000 UFC	Apto
	Coliformes fecales	< 10 UFC/g	<100 UFC	
	<i>Escherichia coli</i>	< 10 UFC/g	<20 UFC	
	<i>S. aureus</i>	<1000 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Mohos y levaduras	< 10 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Gérmenes del Ambiente	340 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	<i>Salmonella spp</i>	Ausencia/25g	Ausencia en 25g	
Chorizo día 14	Grupo coliforme	50 UFC/g	<1000 UFC	Apto
	Coliformes fecales	< 10 UFC/g	<100 UFC	
	<i>E. coli</i>	< 10 UFC/g	<20 UFC	
	<i>S. aureus</i>	<1000 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Mohos y levaduras	< 10 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Gérmenes del Ambiente	440 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	<i>Salmonella spp</i>	Ausencia/25g	Ausencia en 25g	
Chorizo día 21	Grupo coliforme	< 10 UFC/g	<1000 UFC	Apto
	Coliformes fecales	< 10 UFC/g	<100 UFC	
	<i>E. coli</i>	< 10 UFC/g	<20 UFC	
	<i>S. aureus</i>	< 1000UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Mohos y levaduras	< 10 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	Gérmenes del Ambiente	120 UFC/g	≤10000UFC/g o mL	
	<i>Salmonella spp</i>	Ausencia/25g	Ausencia en 25g	

Datos: Laboratorio de Control Microbiológico de Alimentos Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Evaluación de la capacidad germicida del gel desinfectante en base a extracto de laurel.

Se realizó un gel antibacteriano y se evaluó su capacidad germicida en manos sucias y desinfectadas con dicho gel, medidas en diferentes tiempos 5, 30 y 60 minutos.

Cuadro 41. Evaluación del gel de laurel antibacteriano según unidades formadoras de colonias (UFC) en manos sucias y desinfectadas con el gel.

Muestra	Manos Sucias	Tiempo 5 minutos	Tiempo 30 minutos	Tiempo 60 minutos
1	MNPC*	35 UFC	25 UFC	20 UFC
2	MNPC	50 UFC	30 UFC	20 UFC
3	MNPC	30 UFC	15 UFC	7 UFC
4	50 UFC**	30 UFC	20 UFC	10 UFC
5	100 UFC	60 UFC	40 UFC	30 UFC

Fuente: Datos Experimentales FODECY 07-2012 * Muy Numeroso Para Contar, ** Unidades Formadoras de Colonias

III.1 Discusión de Resultados

El material vegetal se colectó en Sololá, Cerro Alux y San Miguel Dueñas Sacatepéquez, además se adquirió de una distribuidora de especies, tomando como referencia los mejores materiales que presentaron actividad biológica en el proyecto Fodecyt 51-09.

Como se observa en el cuadro 1, se recolectaron por arriba de 2Kg en cada punto de colecta y los mismos se secaron en un horno de convección de aire forzada hasta alcanzar una humedad por debajo del 10%, para evitar el deterioro de la muestra, ya que como se observa el porcentaje de humedad en el momento de colecta estaba por arriba del 10% y esto puede afectar directamente la calidad del material vegetal; se prosiguió a la molienda y almacenamiento del material vegetal para tenerlo listo para las extracciones de aceites y elaboración de extractos.

Se pudo observar que los mayores porcentajes de rendimientos de las particiones realizadas se obtuvieron en el disolvente de acetato de etilo, siendo el de menor rendimiento la partición con hexano. Las particiones con mayor rendimiento la presentó la muestra procedente de Cerro Alux con un rendimiento hasta de un 60%.

Esto indica que la mayoría de los metabolitos presente en los extractos tienen mayores características polares y por ello fueron más afines al acetato de etilo y en el butanol, y que solo una pequeña parte de metabolitos presentan características apolares.

En la destilación del aceite esencial de la escala de laboratorio se obtuvieron porcentajes de rendimiento por arriba del 1% en cada una de las muestras analizadas, lo que indica un buen rendimiento del mismo, esto es muy útil para la evaluación de la actividad antioxidante, antimicrobiana y para evaluar su posible uso en la industria de alimentos y cosméticos.

Al realizar las extracciones en la planta piloto de la Facultad de Ingeniería de la USAC, con la colaboración de estudiantes del cuarto año de la carrera de Química Farmacéutica, se obtuvieron rendimientos por abajo del 0.1%. Esta diferencia presentada, se atribuye a la falta de molienda del material vegetal, tiempo en la extracción, el cual fue de una hora, lo cual no fue suficiente para extraer el todo el aceite esencial presente en la muestra. Por lo que es recomendable realizar nuevamente las pruebas en escala piloto controlando los aspectos anteriormente mencionados para obtener mejores rendimientos.

Se observó una gran variabilidad química dependiendo del lugar de procedencia, estado fenológico y ontológico de la muestra. El aceite esencial es parte del metabolismo de una planta, la composición química está permanentemente variando, modificándose las proporciones de sus constituyentes o transformándose unos constituyentes en otros, según el momento de su desarrollo, o el momento del día, por lo que debe tenerse en cuenta que dada su compleja composición, presenta una alta probabilidad de sufrir modificaciones fisicoquímicas por reacciones entre sus propios constituyentes o entre éstos y el medio (la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del reservorio donde se almacenan, la presencia de oxígeno, etc.). Es evidente que una esencia está en permanente cambio, no solamente mientras forma parte del metabolismo de la planta, también después de extraída lo que conlleva a una estabilidad reducida y un proceso de transformación continuo (Bandoni, 2003).

La actividad biológica mostrada en los diferentes extractos se encuentra relacionada con los metabolitos presentes. Por lo que realizó un tamizaje fitoquímico en los diferentes extractos para tener una idea de la distribución de los metabolitos según la polaridad de los disolventes. La mayor cantidad de cumarinas se encuentra en los extractos de acetato de etilo y butanol, lo que indica que las cumarinas presentes tienen una mayor afinidad polar.

La mayoría de los extractos presentaron Rf de 0.50 el cual coincide con el estándar de escopoletina, el cual es la cumarina reportada que se encuentra en las especies de laurel, lo cual coincide con la literatura.

Otro estándar que coincide con las bandas reportadas en los extractos es el ácido *p*-cumarínico, esto indica que si hay cumarinas presentes en los extractos y su distribución varía dependiendo el tipo de disolvente.

Los aceites esenciales son metabolitos que presenta características ampliamente apolares, por lo que el disolvente que los extrae son los apolares, como se puede observar en el cuadro de resultados solo los extractos de hexano fueron los que presentaron bandas correspondientes de aceites esenciales. Los disolventes de acetato de etilo y butanol presentan características más polares por lo que en ellos no se evidenció presencia de aceites esenciales.

Muchas de las bandas coinciden con los estándares de mentol, cineol y timol; observándose coincidencia en lo que respecta al color y Rf, con esto se puede determinar que en los extractos de hexano presentan aceites con estructuras similares a los estándares.

Los extractos mostraron una cantidad reducida de alcaloides, observándose una mayor cantidad en los extractos de butanol, lo que indica que los alcaloides presentes presenta una mayor afinidad polar.

Los alcaloides identificados son diferentes a los estándares empleados, ya que se identificaron colores de bandas y Rf distintos a los identificados en los estándares.

Las sesquiterpenlactonas son metabolitos que se encuentran relacionados con los terpenos por lo que presentan características similares a ellos como lo es su afinidad a los disolventes apolares como el hexano.

Como se puede observar en el cuadro de resultados se evidenció la presencia de dichos metabolitos en los extractos de hexano, no detectándose la presencia en los extractos de acetato de etilo y butanol, ya que estos presentan mayor afinidad apolar. Las marcas de los diferentes extractos no coinciden con el estándar empleado, artemisinina, lo que indica que las sesquiterpenlactonas presentes en la muestra son diferentes a dicho estándar.

La cromatografía en capa fina evidenció la presencia de diferentes flavonoides evidenciándose una mayor cantidad de flavonoides en los extractos de acetato de etilo y butanol; esto coincide con lo esperado ya que los flavonoides son metabolitos que tienen características más polares.

Los estándares que más coinciden con las bandas determinadas en las muestras son los de rutina y quercetina; además se observa que en las muestras hay otros flavonoides

que no coinciden con los estándares empleados, lo que demuestran la variedad de flavonoides presentes en la muestra.

La cuantificación de flavonoides es importante para tener un parámetro de comparación de la posible actividad antioxidante, ya que a dichos metabolitos se les atribuye esta actividad. La cuantificación de flavonoides se realizó en base a este estándar de quercetina, ya que la CCF de flavonoides se demostró la presencia de dicho metabolito en todas las muestras.

Como se puede observar en el cuadro 9, los resultados de la cuantificación de flavonoides en base a quercetina, se trabajó con el disolvente de mediana polaridad, acetato de etilo, presentándose la mayor cantidad de flavonoides en la muestra proveniente de Sololá con un porcentaje de 6.94 ± 0.25 , por otra parte el que menor porcentaje lo presentó la muestra proveniente del Cerro Alux con 1.59 ± 0.05 , ambas muestras son la misma especie, lo que indica que la región puede llegar a afectar a la cantidad de metabolitos que se presenten.

La cuantificación de flavonoides en los extractos de 1-butanol presentaron una mayor cantidad de flavonoides desde un 1.24 ± 0.23 a un 21 ± 0.35 ; en comparación con los otros extractos se observa una mayor cantidad de flavonoides, lo que indica que los flavonoides presentes en las muestras de laurel tiene una mayor afinidad polar y por lo mismo fueron extraídos de mejor manera por el disolvente más polar que se utilizó.

Se observa que los porcentajes varían según la procedencia y el tipo de extracto, para las particiones de hexano no fue posible realizar la determinación debido a los bajos rendimientos que se obtuvieron de esta partición líquido-líquido (ver cuadro de resultados 2), dando cantidad de muestra muy escasa para dicha determinación.

El estudio de las reacciones oxidativas se ha incrementado en los últimos años debido a que la oxidación de los componentes celulares por acción de radicales libres así como otros factores ha sido reconocida como la causa procesos como el envejecimiento celular y de numerosas enfermedades tales como cáncer, mal de Parkinson, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Ferreira, et al., 2006).

Además las reacciones de oxidación causan serios problemas en la industria alimentaria debido a que los lípidos presentes en los alimentos son oxidados durante la peroxidación, produciendo cambios totales o parciales en sus propiedades sensoriales y en su valor nutritivo puesto que se pierden vitaminas, ácidos grasos esenciales y proteínas. Por ello los antioxidantes naturales han recibido considerable atención por sus potenciales aplicaciones en la mejora de la calidad y seguridad de alimentos así como también en la prevención de numerosas enfermedades (Re, et al., 1999).

La actividad antirradicalaria se determinó utilizando las técnicas de decoloración de los radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•)

Como se puede observar en el cuadro 10, todos los extractos presentaron una actividad antioxidante interesante, observándose una mayor actividad cualitativa en los extractos de acetato de etilo y butanol (5EA, 5EB, 17EA, 17EB, 20EA y 22EA); por lo que sus metabolitos en su mayoría son de características polares, posiblemente grupos

fenólicos, a los cuales se les puede atribuir la actividad antioxidante que están presentando los extractos.

Por otra parte los extractos de hexano presenta una mediana actividad antioxidante, ello indica que los metabolitos de características apolares también presentan actividad antioxidante, pero en menor intensidad que los polares según la técnica cromatográfica de DPPH.

En comparación con los estándares los extractos polares presentan una actividad antioxidante muy significativa, observándose que dos estándares característicos del laurel (pinocembrina y escopoletina) también evidencian actividad antioxidante, ambos son compuestos con características polares los cuales pueden ser los que les den la actividad antioxidante a los extractos polares.

A los aceites esenciales se les evaluó la actividad antioxidantes por cromatografía en capa fina, se puede observar que los mismos presentan una acción intermedia, ya que se evidencio decoloración leve del revelador DPPH; se emplearon en la determinación dos estándares de aceites esenciales, timol y limoneno; y dos estándares de actividad antioxidante, TBHQ y quercetina; se evidencia que los estándares de aceites presentan una actividad muy similar a las muestras, la cual a su vez es inferior a la presentado por los estándares clásicos de actividad antioxidante. Con esto se evidencia que el aceite de laurel presenta una actividad antioxidante considerable y que la misma se puede tomar en cuenta en formulaciones en donde se empleo el aceite, ya que el mismo daría un aporte antioxidante a la formulación.

Se observa que las muestras de laurel presentan actividad antioxidante, determinándose una CI_{50} por debajo de 1, se puede observar que las particiones de acetato de etilo, presentan los valores más bajos; lo que indica que los metabolitos con características polares son los responsables de dicha actividad.

Las particiones de hexano son las que presentaron la menor actividad, ya que presentan una CI_{50} por arriba de 1, lo que indica que en comparación con las otras particiones, no presenta una actividad antioxidante muy marcada aun así si presenta una buena actividad antioxidante.

Se puede observar que los extractos de acetato de etilo y butanol presentan una actividad antioxidante importante, comparable con la que presentan los estándares como la rutina. Esto demuestra que el laurel en sus diferentes particiones presenta una actividad antioxidante muy interesante, la cual puede ser aprovechada en la industria de alimentos, cosméticos o medicamentos.

Los extractos etanólicos extraen metabolitos de naturaleza polar tales como compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos, los cuales han demostrado una marcada actividad antioxidante.

En estudios recientes se ha reportado la actividad antioxidante de otras especies del género como *Litsea cubeba* la cual mostró en los extractos metanólicos actividad antioxidante por tres diferentes pruebas (DPPH, peroxidasa/guaiacol y ABTS) comparable con la del α -tocoferol y del ácido ascórbico (Agrawal, et al., 2011).

Los fenoles son moléculas a las cuales se les atribuye diferentes actividades biológicas, entre las que se pueden mencionar actividad antioxidante, es por ello importante determinar cuantitativamente la presencia de dichos metabolitos presentes en los extractos.

Debido a la reducida cantidad de extracto que se obtuvo durante las particiones líquido-líquido, se determinó la cuantificación por el método micrométrico. Como se observa en el cuadro de resultados se observa una mayor cantidad de fenoles totales se encontraron en los extractos polares etanol, butanol y acetato de etilo; esto tiene relación con lo esperado ya que los fenoles son compuestos con características polares. El extracto de butanol de San Miguel Dueñas I es el que mayor cantidad de mg de equivalentes de ácido gálico presenta por mg de extracto; seguido de los extractos de etanol y acetato de etilo.

En todos los extractos el que menor cantidad se reporta de fenoles totales son los extractos de hexano. Esto tiene bastante relación con lo determinado en la actividad antioxidante en la cual los extractos de características polares fueron los que presentaron mejor actividad.

No fue posible realizar la determinación de fenoles totales en la partición de hexano de la muestra 4, ya que la cantidad de muestra que se obtuvo durante la extracción fue muy escasa que no permitió el realizar la cuantificación.

Se puede observar que de los estándares solo la quercetina presento mayor cantidad de fenoles totales en comparación con todos los extractos. Los otros estándares presentan mayor cantidad que los extractos de hexano y una cantidad muy similar a lo reportado en los extractos de etanol y acetato de etilo.

La presencia de fenoles totales demuestra la relación con la actividad antioxidante evidenciada en los extractos, sin embargo no se puede atribuir únicamente a dichos compuestos la actividad antioxidante, ya que se ha evidenciado que los monoterpenos, cetonas, aldehídos, hidrocarburos y éteres de algunos aceites esenciales contribuyen a la captura de radicales libres. Se ha evidenciado que especies que han presentado alto contenido de linalol y 1,8-cineol han mostrado actividad antioxidante en algunos casos igual al α -tocoferol (Miguel, et al., 2004).

Estudios han demostrado la presencia de compuestos fenólicos en el género *Litsea*, reportándose para los extractos metanólicos de la corteza de *L. monopetala*, los cuales se han relacionado con la actividad antioxidante mostrada (Agrawal, et al., 2011).

El índice de peróxido sirve para medir la autooxidación que pueden sufrir las sustancias oleosas como ceras, mantecas y aceites. Es por ello que se realizaron pruebas para determinar si los extractos de laurel podían retardar la autooxidación de la lanolina y aceite vegetal; esta prueba se hizo con el fin de determinar el potencial antioxidante de los extractos y su posible uso como preservante en formulaciones farmacéuticas de carácter oleoso. Durante la determinación la muestra se coloca en condiciones extremas que favorece al proceso oxidativo como lo es temperatura superior a los 40°C y humedad controlada.

Como se observa en el cuadro de resultados 13, se determinó el índice de peróxidos en dos muestras de lanolina; una sin extracto y otra con extracto de laurel de San Miguel Dueñas. Se puede observar que la muestra de lanolina con extracto en los primeros 50 días presentó valores de miliequivalentes de peróxido menores a los determinados en la muestra de lanolina sin extracto. Esto indica que el extracto está ejerciendo un efecto antioxidante ya que está retardando el proceso de autooxidación de la muestra. Pasados los 60 días se observa que hay miliequivalentes por arriba de 20 en las dos muestras, lo que indique la presencia de un proceso autooxidante ya presente. Se pudo observar que el extracto si retardo el proceso autooxidativo. En los cuadros de resultados 14 al 17 se pueden observar que los extractos de etanol disminuyo la oxidación de la lanolina, manteniendo los miliequivalentes de peróxido sin que aumentaran más de 20 miliequivalentes de la lectura inicial; dando una protección por arriba de 42 días. Por otra parte el cuadro 18 y 19 muestra los resultados de índice de peróxido en lanolina de los extractos de acetato de etilo; comparando los resultados obtenidos con el extracto de etanol los extractos de acetato de etilo no brinda mucha protección ya que se oxidaron por arriba de 20 miliequivalentes de peróxido en un tiempo de 22 días, siendo menor tiempo de protección que el proporcionado por los extractos de etanol.

Al probar el poder reductor de la autooxidación de los extractos de laurel en aceite vegetal (aceite de cocina comercial de origen vegetal), se puede observar los resultados en los cuadros 20, 21 y 22; se observa que el extracto no retardó tanto la autooxidación como lo hizo con la lanolina.

Se observa que en menos de un mes ya se había sobrepasado los 20 miliequivalentes, el cual es el punto de corte para suspender las mediciones. Presentándose en la mayoría de los casos una mayor autooxidación en las muestras con extracto de laurel versus las muestras que no contenían extracto. Esto indica que para muestras oleosas líquidas no presenta una protección contra la autooxidación. Es necesario realizar las pruebas de estos mismos extractos sobre la lanolina para tener una comparación directa en una fase líquida y una semi-sólida.

Los extractos etanólicos no presentaron una actividad importante contra las bacterias contaminantes de alimentos, únicamente se evidenció actividad contra *E.coli*, *B. subtilis* y *M. smegmatis*, por lo cual será necesario evaluar la actividad que puedan presentar los aceites esenciales y determinar si los mismos presentan actividad contra dichas bacterias, para su posible uso como preservante en alimentos.

En base a los resultados obtenidos según el tamizaje inicial se realizaron las pruebas para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos que presentaron actividad contra determinadas bacterias. Se puede observar que el extracto 5E fue el que mejor actividad presento contra *M. smegmatis*; el 17E presento la mejor actividad contra *B. subtilis*, así mismo 5E y 20E dieron la mejor actividad contra *E. coli*; si bien estos extractos inhibieron el crecimiento de dichas bacterias y presentaron CIM relativamente pequeñas, no superan el efecto bactericida del antibiótico empleado como control.

En base a los resultados obtenidos en los extractos etanólicos se evaluó la actividad antibacteriana de las diferentes particiones líquido-líquido que se prepararon a partir de los

extractos etanólicos. Como se puede observar las particiones inhibieron más que todo *B. subtilis* y *M. smegmatis*, dato que coincide con lo reportado para el extracto completo. Las partes más activas fueron las de hexano y butanol. Es indispensable determinar la CIM, con el fin de determinar si la potencial de las particiones el mayor que la del extracto completo.

La concentración mínima que se requiere para la inhibición del crecimiento bacteriano de las diferentes particiones, para las bacterias susceptibles, en la mayoría de los casos no fue inferior de 1mg/mL; los extractos de butanol y acetato de etilo fueron lo que mejores resultados presentaron. Esto indica que la actividad antibacteriana que presentan los extractos se debe a compuestos con características polares.

Los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de las hojas de laurel fueron evaluados en base a su posible potencial antibacteriano, por medio de la técnica de disco de difusión. Como se observa en el cuadro de resultados, los dos aceites analizados presentan una buena actividad contra *M. smegmatis* y *B. subtilis*; misma bacterias susceptibles con los extractos. En base a estos resultados es indispensable determinar la CIM que puedan presentar los aceites para determinar si los mismos son más potentes que el extracto.

Los aceites presentaron actividad más que todo sobre dos bacterias *M. smegmatis* y *Bacillus subtilis*, la cantidad de aceite que inhibe e crecimiento de las bacterias es de 7.5 μ L, lo que es una pequeña cantidad para inhibir el crecimiento de las bacterias. Es indispensable obtener cantidades adecuadas de aceite para poder realizar más pruebas, ya que la cantidad reducida de aceite que se obtiene limita el poder realizar diferentes pruebas.

Como se observa en el cuadro de resultados 18, los cinco extractos analizados no presentaron actividad contra ninguna de las cinco cepas de hongos estudiadas, debido a que en todos los medios analizados se observó el crecimiento de los diferentes hongos. Por lo que se determina que los extractos no presentan actividad antimicótica.

Los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con la actividad antibacteriana reportada previamente contra las bacterias *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/ml, *S. aureus* y *S. typhi* a 1 mg/ml mostrada en el extracto etanólico de *L. guatemalensis* (Cruz, et al., 2008), sin embargo las procedencias de San Miguel Dueñas, San Bartolomé Milpas Altas y Cerro Alux presentaron además actividad contra *E. coli*.

Los extractos metanólicos de *L. neesiana* y *L. glaucescens* presentaron una actividad antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Meckes et al., 1995). La tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra *C. albicans*, *E. floccosum* y *M. canis* (Cáceres, 2009). Las infusiones de hojas de *L. glaucescens* colectadas en Huitán, Quetzaltenango, se evaluaron contra dos bacterias patógenas orales a tres diferentes concentraciones (5, 10 y 20%), obteniendo como resultados que la infusión al 20% presentó un promedio de inhibición de 13.80% contra *Streptococcus mutans* y de 6.7% contra *Lactobacillus acidophilus* (Alvarez, 1999), mientras que la infusión al 10% presentó una inhibición de 13.40% contra *Streptococcus mutans*.

Se ha reportado que los extractos metanólicos de la corteza de *L. glutinosa* ha inhibido el crecimiento de bacterias Gram (+) y (-). Algunos alcaloides aislados (laurolitsina) de *L. gardneri* mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* (CIM 250 mg/ml).

La actividad antimicrobiana de los extractos se puede relacionar con la presencia de compuestos fenólicos lo cuales fueron característicos de las especies y según la literatura el mecanismo de acción antibacteriano parece estar relacionado con la inhibición enzimática por lo compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas. De igual manera se detectó la presencia de cumarinas mediante ensayos macro y semimicro, y se aisló una cumarina la escopoletina. Algunos autores reportan que las cumarinas presentan actividad antimicrobiana mediante interacción con el ADN eucariota, lo cual explica también una actividad antiviral (Domingo, 2003).

En el cuadro 31 se observan los resultados obtenidos del fraccionamiento de las 5 muestras analizadas; la fracción de metanol fue la que menos bandas presentó ninguna banda; pero a la vez la banda que se presento no presente correlación con los estándares de referencia.

Se empleó el estándar de escopoletina la cual dio una coloración celeste y un Rf de 0.32, las fracciones de diclorometano presentaron una banda al mismo nivel y con el mismo color de fluorescencia, lo que indica que en dicha fracción está presente dicha molécula. Por otra parte la pinocembrina presentó una banda con un Rf de 0.82, tanto la fracción de hexano como de diclorometano presentaron una banda al mismo nivel, lo que indica que posiblemente en una de estas fracciones se encuentre esta molécula.

En base a los resultados obtenidos en la CCF se prosiguió a realizar el fraccionamiento de cada partición por cromatografía en columna. La fracción de diclorometano de la muestra 5E fue la que presento la banda más similar a la escopoletina, así mismo no presentaba otros compuestos en la muestra por lo que se realizó el fraccionamiento en columna con silica gel, realizando diferentes lavadas con proporciones variadas de hexano: acetato de etilo.

Como se puede observar en el cuadro de resultados 32 la fracción 4 y 5 son las que más se parecen en Rf y color al estándar de escopoletina, por lo que se puede determinar que en dichas fracciones se puede encontrar la molécula aislada. El espectro infrarrojo de la fracción 4 y del estándar se pueden observar en los anexos, por lo que se puede determinar que se logro realizar el aislamiento de la molécula e iniciar la identificación de las misma en las especies estudiadas.

Respecto a la elaboración de queso de forma artesanal incorporando aceite esencial de laurel se observó en todos los casos un rendimiento por arriba del 15%, las diferencias en el rendimiento se puede deber a razones de operación técnica.

Entre estas operaciones técnicas se podría mencionar es el tiempo de formación del cuajo, la eliminación del suero, no haber empleado suficiente cuajo; cada uno de estos

factores pudo provocar diferencias en el rendimiento. Por lo que si se controlan estas variantes se pueden aumentar el porcentaje de rendimiento.

Se puede observar en el cuadro 34 las características organolépticas de los quesos en los tres tratamientos sin sal, como se observa en los primeros ocho días de elaboración se describe que los quesos con el tratamiento 1 y 2 tiene un olor a lácteo y laurel y el sabor es agradable con un pequeño toque de laurel; por su parte el tratamiento 3 lo describieron con olor y sabor lácteo normal.

En cada una de las semanas de análisis los quesos presentaron un color blanco hueso en las primeras dos semanas y en la tercera semana presento un color blanco más amarillento; y mantuvo durante todo el análisis buena consistencia. En la última semana de análisis se determinó que el sabor del queso del tratamiento 3 ya era desagradable, mientras que los otros dos tratamientos que tienen aceite de laurel ya presentaban un sabor ácido pero no tan desagradable como el sabor del queso tratamiento 3.

En el cuadro 35 se describen las características organolépticas de los quesos con sal. Se observa que durante todas las semanas los quesos de los tres tratamientos presentaron buena consistencia y el color pasó de un blanco hueso a un blanco amarillento; estas características son las mismas que presentaron los quesos sin sal.

En cuanto a las características de olor y sabor, se puede observar que este si presento modificaciones durante las semanas; los tratamientos que tenían laurel fueron más agradables al gusto durante las semanas.

Con esto se puede determinar que el sabor de los quesos que tenían laurel tenía mejor sabor durante las semanas y la incorporación de la sal ayudo también ya que presentaron mejor sabor en comparación con los quesos sin sal. Con esto se determina que la incorporación del aceite y la sal tienen un efecto directo sobre el sabor del producto.

En base a los estudios previos sobre la actividad antimicrobiana del aceite de laurel, y tomando los estudios organolépticos previamente realizado en quesos con aceite; se evaluó el uso del mismo como preservante antimicrobiano en los quesos.

Como se observa en el cuadro de resultados 36 el conteo aeróbico en placa de microorganismo se evidencio que los quesos con aceite, en el mismo día de producción, presentó un recuento microbiano aeróbico menor que el queso blanco el cual no tenía aceite. Esto evidencia que el aceite si presenta una actividad antimicrobiana perseverante.

Por otra parte la leche empelada en la producción presento un recuento todavía inferior que los quesos, esto se puede deber a que los quesos durante la producción se quedan a temperatura ambiente lo que favorece al crecimiento, evidenciándose con esto que el aceite y da un afecto de preservante antimicrobiano.

Se realizó el conteo microbiano aeróbico en placa a los siete días de producción, se evidencio que según la dilución más grande empleada 1/1000 se observó mucho crecimiento del placa, por lo que era muy complicado hacer el recuento, pero se observa

que la muestra con aceite de laurel presentó aún así menor cantidad de bacterias que el blanco, además sus colonias era más grandes lo que indica hay una menor carga bacteriana que permite a las mismas tener un mayor tamaño; en contraste las placas de la muestra blanco presentaron numerosas colonias pequeñas, esto indica que la carga bacteriana es muy elevada.

En base al parámetro de la turbidez de los medios y tamaño de las colonias se puede determinar que las muestras de queso con aceite de laurel a los siete días presentan una menor carga bacteriana que las muestras blanco.

Se elaboraron chorizos empleando hojas de laurel como preservantes antimicrobianos, la receta y procedimiento de la elaboración de los mismos se presenta en los anexos; durante las 3 semanas que se ha realizado el conteo aeróbico en placa tanto la muestra con laurel como la de sin laurel no ha presentado crecimiento, como se observa en la cuadro de resultado; ante esto se va a evaluar reducir la cantidad de vinagre empleada en la formulación, ya que este puede estar actuando como agentes antibacteriano.

El control de calidad microbiológico de los chorizos formulados con hoja de laurel se monitorearon lotes de producción durante un mes; analizándose los parámetros determinados por el reglamento técnico centroamericano (RTC) para embutidos precocidos de carne de res.

Se puede observar que durante las cuatro semanas de análisis cada una de las muestras cumplieron con los parámetros, los recuentos de coliformes, coliformes fecales, *Eschericia coli* y *Staphylococcus aureus*; durante todo el tiempo estuvieron dentro del valor de referencia, lo que indica que el procedimiento de producción de los chorizos y la incorporación de hojas de laurel ayudó a mantener la calidad microbiológica del producto elaborado.

Se evaluó la actividad del gel para desinfección de manos que se formuló con extracto de laurel, se realizó un monitoreo de las manos sucias y después se aplico una cantidad homogénea del gel para la limpieza de las manos de cada uno de los participantes. Después de la desinfección con el gel de laurel se realizaron tres monitoreas de manos a los 5, 30 y 60 minutos después de la aplicación; se puede observar conforme avanzaba el tiempo la carga bacteriana, reportada en base a unidades formadoras de colonias (UFC) fue disminuyendo.

Cada uno de los participantes durante el trascurso del monitoreo siguieron con sus actividades normales, realizando pruebas, tocando dinero, trabajando en la computadora, etc.; con la única condición de no lavarse las manos durante el tiempo del estudio. Como se observa en la cuadro de resultados, la carga bacteriana en las manos de los participantes fue disminuyendo conforme avanzaba el tiempo; esto demuestra que el gel elaborado con una concentración de 2% de extracto etanólico de hoja de laurel presenta una actividad antibacteriana, lo cual es una alternativa para la elaboración de productos cosméticos con fines de limpieza de manos, en donde se empleen una menor cantidad de alcohol, así como otras sustancias químicas con actividad germicida que también pueden presentar cierta toxicidad para el ser humano.

PARTE IV

IV.1 CONCLUSIONES

- 4.1.1 El mayor porcentaje de rendimiento obtenido de las particiones líquido-líquido, lo presentó la fracción de acetato de etilo (38-60%), lo que indica que los metabolitos secundarios presentan características polares y medianamente polares.
- 4.1.2 Los extractos de acetato de etilo y butanol presentaron cumarinas, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenlactonas; el extracto hexánico evidenció aceites esenciales.
- 4.1.3 Se presentó el mayor porcentaje de rendimiento de flavonoides totales en base a quercetina en la fracción butanólica (21%), evidenciándose una gran variabilidad dependiendo de la procedencia del material vegetal.
- 4.1.4 Se determinó que los extractos presentan una actividad antioxidante significativa equiparable con los estándares químicos, el mejor resultado lo presentó el extracto de acetato de etilo de la muestra de San Miguel Dueñas con un CI_{50} de 0.18 ± 0.001 mg/mL; el extracto con menor actividad antioxidante fue el de hexano procedente de Sololá con un CI_{50} de 1.58 ± 0.05 mg/mL.
- 4.1.5 El extracto butanólico procedente de San Miguel Dueñas presentó la mayor cantidad de fenoles totales equivalentes al ácido gálico (55 mg de ácido gálico/mg de extracto).
- 4.1.6 En la determinación del índice de peróxido se determina que los extractos no presentan buena capacidad de autooxidación, ya que en poco tiempo se determina índices de peróxidos por arriba de 20 meq/Kg.
- 4.1.7 Los extractos etanólicos presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *B. subtilis* y *M. smegmatis*, dando la mejor actividad contra *B. subtilis* con un valor de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0.16mg/mL.
- 4.1.8 La partición butanólica del extracto procedente de Cerro Alux fue el que presentó la mejor CIM de 0.16mg/mL contra la bacteria *B. subtilis*.
- 4.1.9 Los extractos no presentaron ninguna actividad antimicótica, ya que no se evidencio disminución del crecimiento de los hongos.

- 4.1.10 En el aislamiento de molécula de los extractos se pudo determinar la presencia de escopoletina en la fracción de diclorometano del extracto 20; ya que tanto la cromatografía evidencio una banda con el mismo Rf y color, así mismo la IR muestra semejanza entre la fracción aislada y el estándar.
- 4.1.11 El aceite esencial de laurel presentó diferencias de rendimientos de extracción a nivel planta piloto y escala laboratorio presentándose una gran diferencia (0.17% vs 1.25%) debido a variables en los tiempos de extracción y tamaño de partícula del material vegetal utilizado.
- 4.1.12 El producto alimenticio elaborado, queso fresco, con aceite de laurel; presento buena aceptabilidad con la población de estudio. Se observo que se conservo el buen sabor, textura, olor; en comparación con el queso control, únicamente con sal, durante las tres semanas de estudio.
- 4.1.13 Se determinó el aceite de laurel no evito el crecimiento aeróbico de microorganismos a los 7 días de haber realizado el producto. Pero el control microbiológico muestra que los productos no presentaron bacterias patógenas de tipo alimenticio y son aptos para consumo humano, por lo que el aceite tiene un efecto positivo para la preservación de los alimentos.
- 4.1.14 El chorizo elaborado con laurel presento un perfil microbiológico más estable en comparación con el chorizo blanco, el cual no contenía laurel.
- 4.1.15 El gel antibacteriano que se elabora a partir del extracto etanólico de laurel, evidencio una disminución de la carga bacteriana de la mano después de la aplicación; lo que muestra que el mismo puede ser una alternativa para la desinfección de las manos.

IV.2 RECOMENDACIONES

- 4.2.1 Realizar pruebas de estabilidad acelerada y en anaquel del gel antibacteriano a partir de extracto etanólico de laurel para garantizar su calidad, seguridad y eficacia.
- 4.2.2 Realizar pruebas de extracción de aceite esencial en escala piloto, agregando más variables (tamaño del material vegetal, tiempo de extracción) para establecer el mejor rendimiento.
- 4.2.3 Realizar pruebas antimicrobianas del gel elaborado contra bacterias características de la piel, para determinar el efecto de la misma para evitar la proliferación bacteriana.
- 4.2.4 Realizar capacitación en comunidades donde realicen chorizos de forma artesanal, con la finalidad de que incorporen laurel en la preparación tanto por su beneficio como especie, y además el beneficio desde el punto de vista de preservante alimenticio.
- 4.2.5 Realizar aislamiento molecular a las fracciones que mejor actividad biológica presentaron, para la identificación de las moléculas presentes y poder determinar cuál es la responsable de la actividad farmacológica que presenta el extracto.

IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón, L. (2001) *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de Alimentos*. México: UACJ.

Alonso, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Corpus. Rosario, Argentina. 1359 p.

Amiot J. 1991. Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp. 1, 2, 11, 10, 20, 43, 249-252,256, 257, 259,280-282.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, D. J., Arlorio, M., et al. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3530–3535.

Angulo, D. 2002. Inventario Florístico Estructural del Bosque de El Malcotal, El Salvador. Tesis de Ingeniería en Desarrollo Socioeconómico y Ambiente. Universidad Zamorano. Honduras. 56 p.

Argueta, A. *et al.*, 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Indigenista Tomo I, II, III. 1786 p.

Arques, J. L., Rodriguez, E., Nunez, M., & Medina, M. (2008). Inactivation of gramnegative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, 227(1), 77–82.

Bandoni, A. 2003. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latioamérica. La Plata, Ed. Univ. Nac. de la Plata, 410 p.

Barla A *et al.* 2007. Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chem* 104:1478-1484.

Berlín, B. (Coordinator). 1998. Drug discovery and biodiversity among the maya of Mexico. International Collaborative Biodiversity Group (ICBG-Maya). 269 p.

Brancato, FP. y Golding, NS. 1953. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* 45:848-864.

Brithish Herbal Pharmacopeia. 2002. London: Department of Health, Social Services and Public Safety.

Bruneton, J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2a. Ed. Zaragoza: Acribia.

Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala.

Cáceres, A. 2005. Vademécum Nacional de Plantas Medicinales. Editorial Universitaria. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 273 p.

Cañigüeral, S. Vila, R. Wichtl, M. (Eds.) 1998. Plantas Medicinales y Drogas Vegetales. Milano: OEMF Internacional.

Centers for Disease Control (2013) *Shigellosis*. USA: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Recuperado de: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/shigellosis/>

Chamorro C., Losada M. Tecnología de Alimentos. El análisis sensorial de los quesos. AMV Ediciones, Mundi Prensa. 1a Edición 2002. Madrid, España. Pp. 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 125, 126.

Coretti K. 1971. Embutidos: Elaboración y defectos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 9-30, 47-59.

Cosimi, S. *et al.* 2009. Bioactivity and quantitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against store-products pest. *J. Stored Prod. Res.* In press.

Cruz, S. *et al.* 2008. Caracterización química y evaluación de la actividad biológica de *Bourreria huanita* (Esquisuchil) y *Litsea guatemalensis* (laurel). Informe final DIGI. USAC.

Davidson, P. M., & Naidu, A. S. (2000). Phytophenols. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 265–295). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Díaz, R. (1999) Manual práctico de Microbiología. (2ª Edición). Barcelona, España: Masson, S.A.

Duke, JA. 1985. Handbook of Medicinal Herbs. CRC. New York pp. 378-383, 521, 563.

Duke, JA. 1986. Handbook proximate analysis tables of higher plants. Boca Raton. CRC Press pp. 99.

Edwards-Jones V, Buck R, Shawcross SB, Dawson MM, Dunn K. 2004. The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model. *Burns* 30: 772-777.

Effenberger G. 1980. Tripas artificiales. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 18-36.

European Pharmacopoeia. 2002. 4th Edition and supplements. Strasbourg: Conseil de L' Europe.

FAO. 1987. Informe sobre los Recursos Naturales para la Agricultura y la Alimentación en América Latina y el Caribe. 124 pp.

Ferreira A. *et al.* 2006. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 31–37

Fonegra, R. 2001. Ed. Simposio sobre Plantas Medicinales y Aromáticas, Curso Nacional para el Conocimiento de las Plantas Medicinales y Aromáticas. Documentos Ocasionales No. 2 Herbario Universidad de Antioquia. 349 p.

Fundación para la Innovación Agraria. 2002. Escenario actual del mercado de Plantas Medicinales y Aromáticas. Boletín de Plantas Medicinales y Aromáticas No. 3.

García Alvarado, JS. *et al.*, 2001. Tradicional Uses and Scientific knowledge of medicinal plants from Mexico and Central America. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 8:37-39

Gómez, E. (2002). Auxiliares Sanitarios de la Comunidad Autónoma de las Illes Balears. Madrid: MAD.

Gutiérrez, M. (2003). *Nuevas perspectivas en resistencia a quinolonas fluoradas en Staphylococcus aureus: mecanismos de flujo activos y otros mecanismos de resistencia a quinolonas de tercera generación*. 1a. edición. España: Universidad de Salamanca. Pág. 7

Hernández, I. 2007. Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio de hoja de *Solanum hartwegii* Benth. (Huiz), de hoja de *Litsea guatemalensis* Mez. (Laurel) y de hoja de *Piper jacquemontianum* Kunth. (Cordoncillo). Tesis de Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. 55 p.

Hernández, L. 2006. La importancia de los Estudios de Mercado en la Comercialización de Plantas Medicinales. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas.

Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273–292.

House, PR. *et al.*, 1995. Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Tegucigalpa. UNAH/CIMN-H/CID/CIIR/GTZ, 555 p.

Islebe, G. A. 1993. Will Guatemala's Juniperus-Pinus forests survive? *Environmental Conservation* 20: 167-168.

Islebe, G. A. y A. Velázquez. (En prensa). Affinity among mountain ranges in Megamexico: a phytogeographical scenario. *Vegetatio*.

Islebe, G. A. y M. Kappelle. 1994. A phytogeographical comparison between subalpine forests of Guatemala and Costa Rica. *Feddes Repertorium Specierum Novarum* 105: 73-87.

Islebe, G.A. Cleef, A.M. y Velasquez, A. 1994. Especies leñosas de la Sierra de los Cuchumatanes y de la Cadena Volcánica, Guatemala. *Acta Botánica Mexicana*. 29:83-92.

Joly, AB. 1977. *Botanica-Introducao á Taxonomia Vegetal*. Companhia Ed. Nacional. Sao Paulo, Brasil.

Kaileh M.*et al.* 2007. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity *Journal of Ethnopharmacology* 113: 510–516

Koneman, E. (2008). *Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color*. 6ª ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Pág. 617.

Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega. Barcelona. 515 p.

Lennette, E. (1992) *Manual de Microbiología Clínica*. (4ª Edición). Argentina: Panamericana.

Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. 2ª. Ed. Universidad Pontificia del Perú. Fondo Editorial. Perú. 300 p.

Madigan, M. (2003). *Diversidad de Microorganismos en alimentos*. (10ª Edición). Madrid: Pearson-Prentice Hall.

Madrid, V. A. 1990. Manual de Tecnología quesera. AMV Ediciones. Mundi-Prensa. Pp. 13, 27, 34-38, 41, 42.

Maruzzella JC, Balter JR. 1959. The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Dis Rept* 43: 1143-1147.

Mena, MG. 1996. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora Salvadoreña. San Salvador. Ed. Universitaria. 563 p.

Metz, R. & Gil, A. (2008). *Procesos de Cocina*. Gruiten: Akal.

Mitscher, LA. *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction rationale and methodology. *Lloydia* 35:157-166.

Muños, M. *et al.* 2009. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *LWT-Food Sci. Technol.* 42:220-227.

Negrón, M. *et al.* (2009) *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica* (2ª Edición). España: Editorial Médica Panamericana.

Olivas, E. & Alarcón, E. (2004). *Manual de Prácticas de Microbiología Básica y Microbiología de alimentos: Progra*

Ortiz, H. 2006. Actividad antifúngica de los extractos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecae pedrosoi*. Tesis de Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. 70 p.

Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. 1ª. Edición. España: Marge Médica Books. Pág. 22.

Pascual, M *et al.* (2000). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y bebidas*. (2da. Edición). España: Editorial Díaz-Santos

Pascual, M. (2005). *Enfermedades de origen alimentario: Su prevención*. España: Editorial Díaz-Santos.

Pérez J.F. Da Silva A. Lima M.C, Mérida M. 2006. Composição do óleo essencial de *Litsea guatemalensis* Mez. de uma população da Guatemala. Sociedade Brasileira de Química. 29ª. Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Periago, P. M., Conesa, R., Delgado, B., Fernández, P. S., & Palop, A. (2006). *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 17–23.

Proença Da Cunha, A. 2005. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 670 p.

Real Farmacopea Española (2002). 2ª. Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2801 p.

Rodríguez, E. (s. f). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. Pág. 136.

Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. (3ra Edición). México: Editorial Médica Panamericana.

Santa Cruz, L. Manual: Selección Fitoquímica. Guía Práctica par los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. 92 p.

Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2001). 1, 8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Digestive Diseases and Science*, 46(2), 331–337

Sharapin, N. 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247 p.

Signorini, M. et. al. (2008) *Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche*. *Revista Científica*, 18(2).

Silva, F. G., Oliveira, C. B. A., Pinto, J. E. B. P., Nascimento, V. E., Santos, S. C., Seraphin, J. C., et al. (2007). Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18, 990–997.

Simic, M. *et al.* 2003. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia* 74:613-616.

Smith, J. D. 1889-1907. *Enumeratio plantarum guatemalensium*. Oquawka, III. 8 vols.

Solis, PN. *et al.* 1993. A microwell citotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.* 59:250-252.

Soloaga, R. et.al. (2004). Detección de meticilino-resistencia en *Staphylococcus aureus*: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con mrsa-Screen latex. *Rev. argent. microbiol.* [online]. 36,1 [citado 2013-08-28], pp. 36-40. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032575412004000100008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1851-7617.

Standley, P. C. y J. A. Steyermark. 1945. The vegetation of Guatemala, a brief review. In: *Plants and plant sciences in Latin America*. Chronica Botanica Co. Waltham, Mass. pp. 275-278.

Standley, PC & Steyermark JA. 1946. Flora of Guatemala. Fiediana: Botany 24(4): 315.

Standley, PC & Steyermark JA. 1952. Flora of Guatemala. Fiediana: Botany 24(3): 275.

Stevens, WD *et al.* 2001. Flora de Nicaragua. USA. Missouri Botanical Garden. 3:2510.

Tórtora, G. et al. (2007) *Introducción a la microbiología* (9ª Edición). España: Editorial Médica Panamericana.

Trease & Evans. 1991. Farmacognosia. México. Interamericana McGraw Hill pp. 261-280.

Tucker, A. *et al.* 1992. *Litsea glaucescens* Humb., Bonpl. & Kunth var *glaucescens*. (Lauraceae). A Mexican Bay. Economic Botany 46 (1):21-24.

Ulrich G. 1980. Aditivos e Ingredientes. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 14-18

Vallverdú, C. *et al.* 2005. Composition of the essential oil from leaves of *Litsea guatemalensis*. Flavour and Fragrance Journal 20:415-418.

Vanaclocha B. & Cañigueral S. 2003. Fitoterapia Vademécum de Prescripción. 4ª. Ed. Masson S.A. Barcelona.1091 p.

Wagner, H. & Bladt, S. 1996. Plant Drug Análisis. Springer Verlag. Berlin. 320 p.

Werner F. 1983. Fabricación fiable de embutidos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 7-45.

WHO. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO.115 p.

WHO. 2003. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva: WHO.

Yabar, V. (2005) *Microbiología de Alimentos*. Perú: Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional de Perú.

IV.4 ANEXOS

1. Imagen recolecta del material vegetal



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

2. Imagen de tamizaje de material vegetal.



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



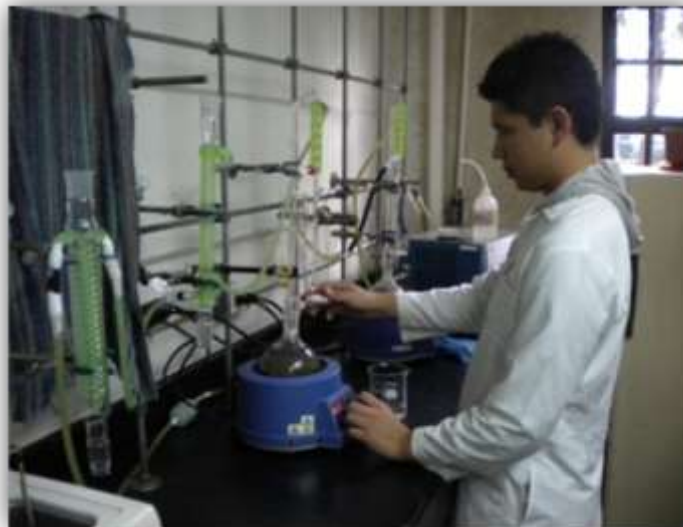
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

3. Imagen de extracción líquido-líquido



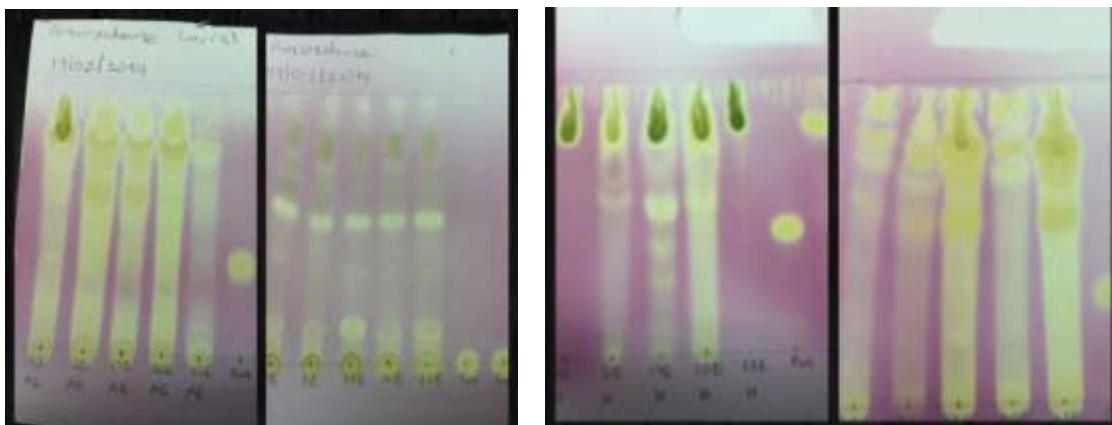
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

4. Imagen de extracción de aceite esenciales



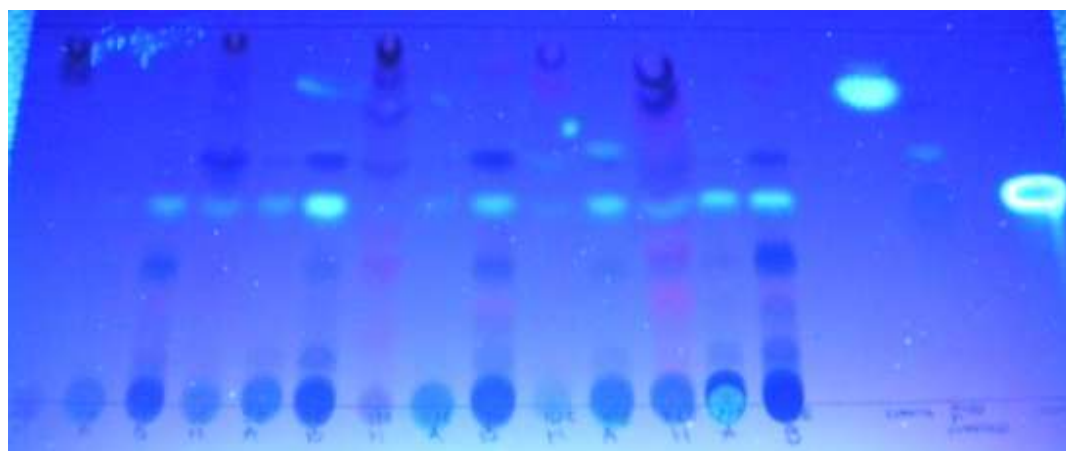
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

5. Imagen de cromatografía en capa fina de actividad antioxidante.



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

6. Imagen de cromatografía en capa fina de identificación de cumarinas



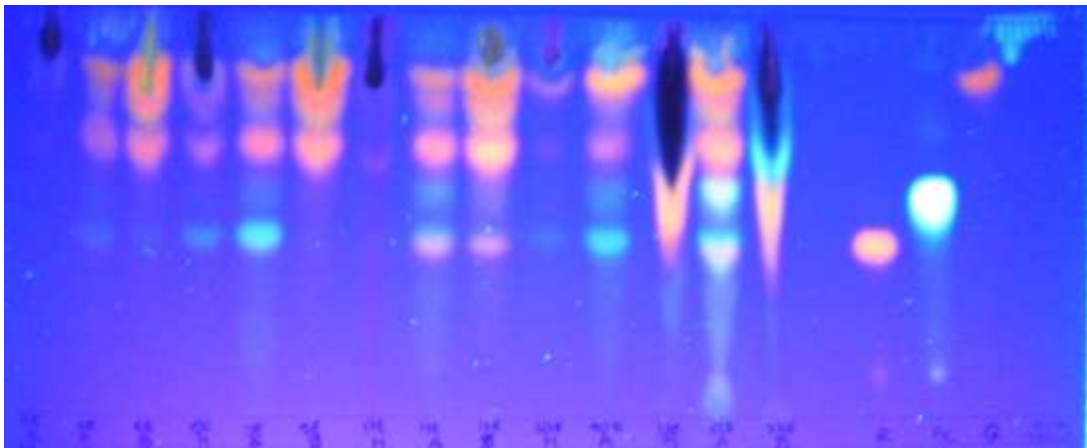
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

7. Imagen de determinación de cumarinas por técnica macométrica de papel



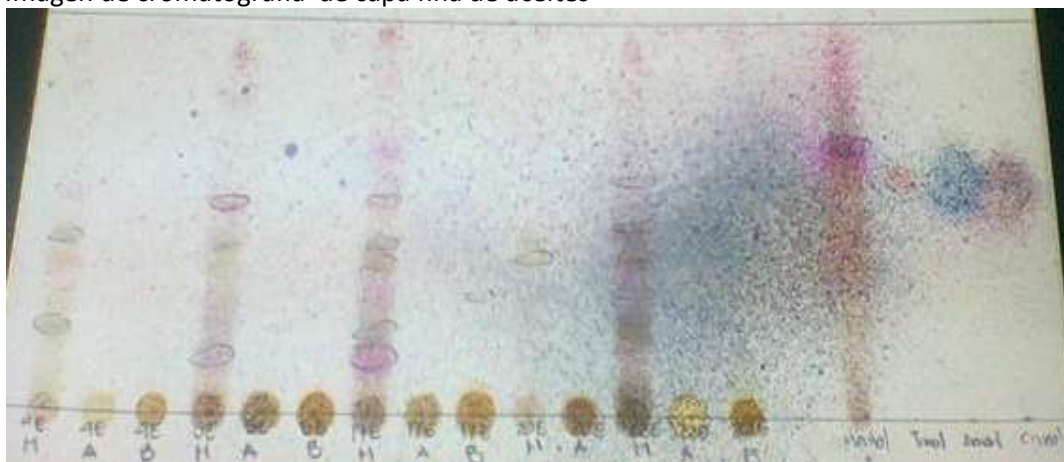
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

8. Imagen de cromatografía en capa fina de flavonoides



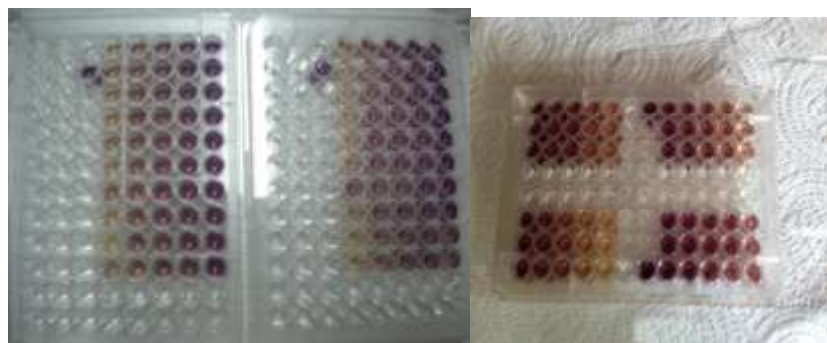
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

9. Imagen de cromatografía de capa fina de aceites



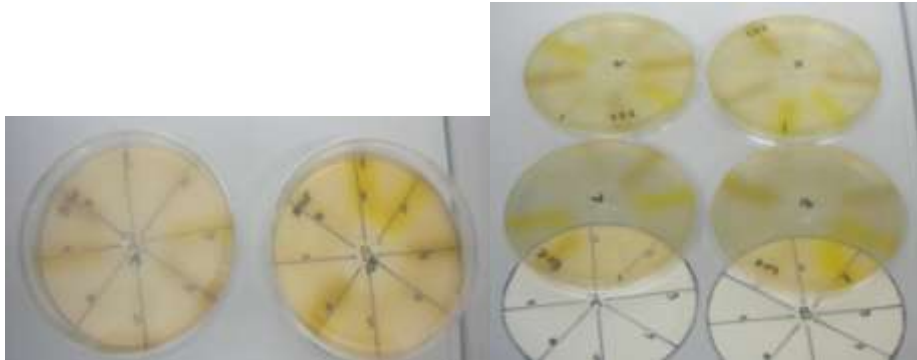
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

10. Imagen de cuantificación de actividad antioxidante por técnica micrométrica

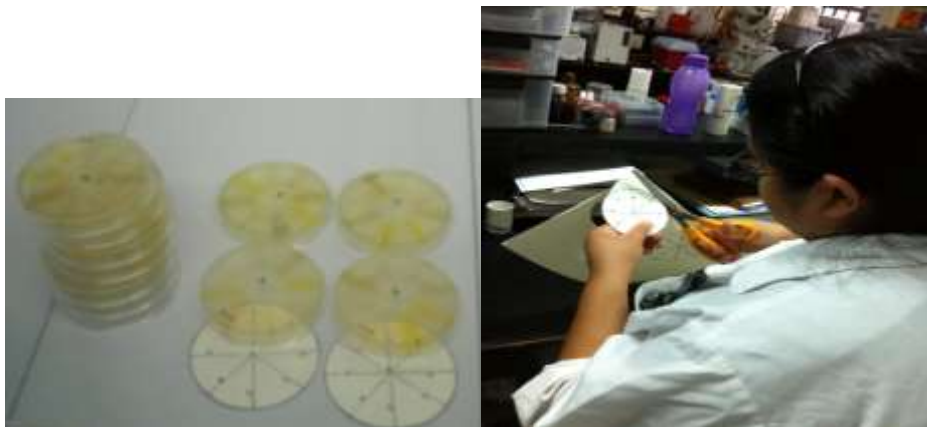


Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

11. Imagen de pruebas antibacterianas:



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

12. Imagen de pruebas antibacterianas de los aceites por realizarse



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

13. Imagen de pruebas de índice de peróxido, muestras en incubadora



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

14. Imagen de columnas empleadas para el aislamiento de moléculas



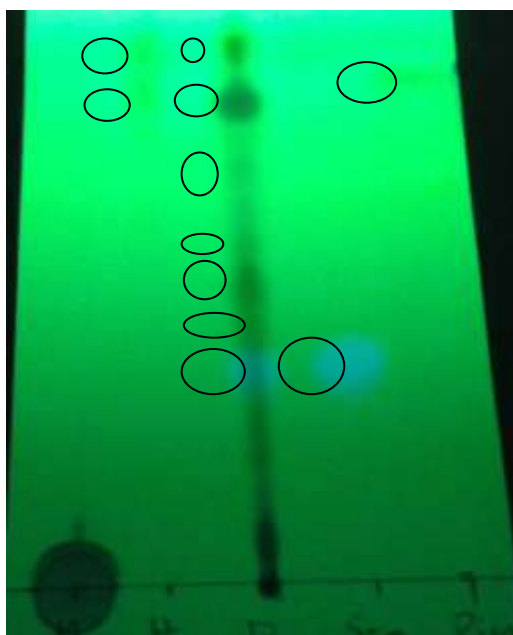
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

15. Imagen de proceso de decoloración de extractos para aislamiento de moléculas



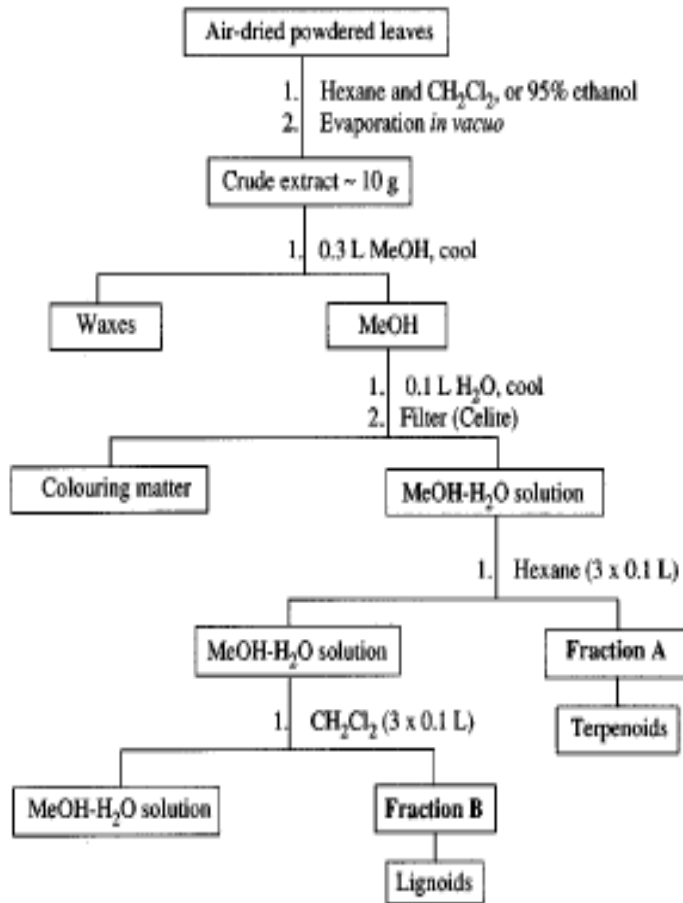
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

16. Imagen de cromatografía a de aislamiento de moléculas de laurel por fraccionamiento en columna



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

17. Diagrama del proceso de desclorofilación y fraccionamiento de particiones para aislamiento de moléculas



18. Descripción del proceso de elaboración de queso, se elaboraron tres tratamientos diferentes:
Tratamientos:

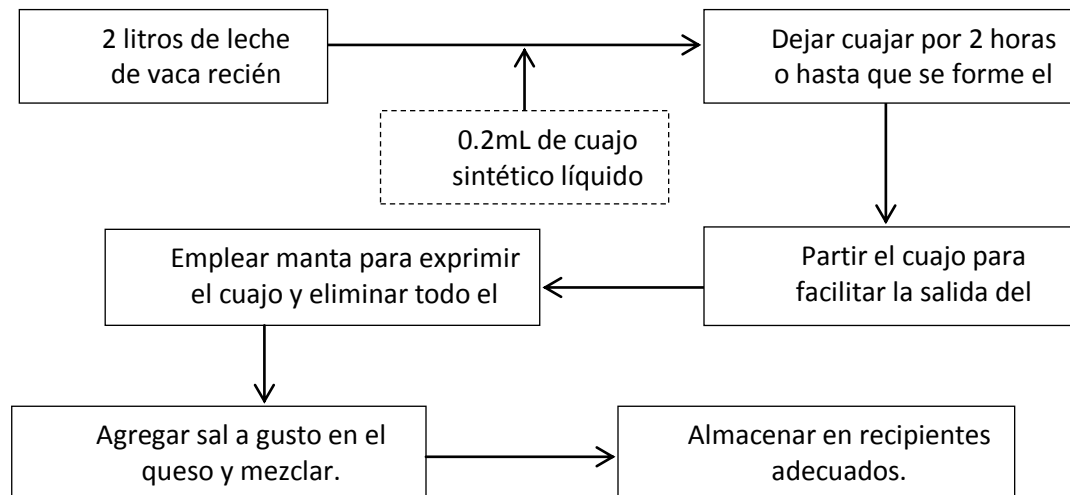
- Incorporación del aceite esencial de Laurel instantáneamente después de obtener la leche al momento de ordeñar y posteriormente se le agregó el cuajo sintético.
- Incorporación del aceite esencial de Laurel asumiendo que ha transcurrido cierto tiempo después de su obtención por ordenamiento, agregando el aceite y cuajo simultáneamente.
- Control: Leche al pié de la vaca sin incorporación de ningún aceite esencial.

Procedimiento de incorporación:

- Se agregó una gota de aceite esencial de Laurel procedente de Milpas Altas utilizando una pipeta Pasteur por cada litro de leche al pié de la vaca obtenida en la finca experimental de la Facultad de Veterinaria, USAC.
- Se mezcló durante 10 min. Con agitación constante utilizando una varilla de vidrio.

- Dependiendo el tratamiento, se agregó 250ul de cuajo sintético.
- Se dejó cuajar durante aproximadamente dos horas y media, posteriormente se procedió a la separación de sólidos del suero.

19. Diagrama de flujo de elaboración de queso de forma artesanal



20. Imagen del proceso de elaboración de queso



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

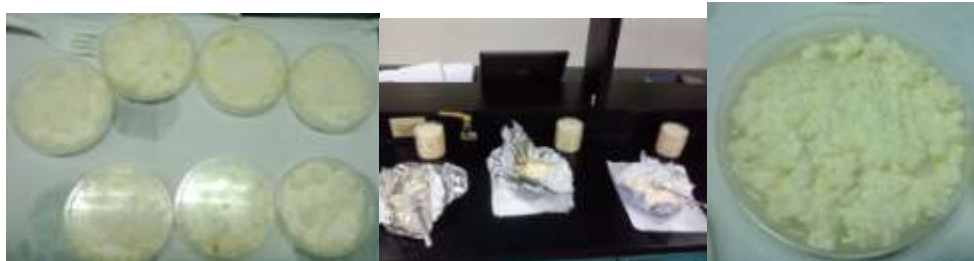


Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

21. Imagen de los quesos elaborados



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

22. Imagen de elaboración de requesón:

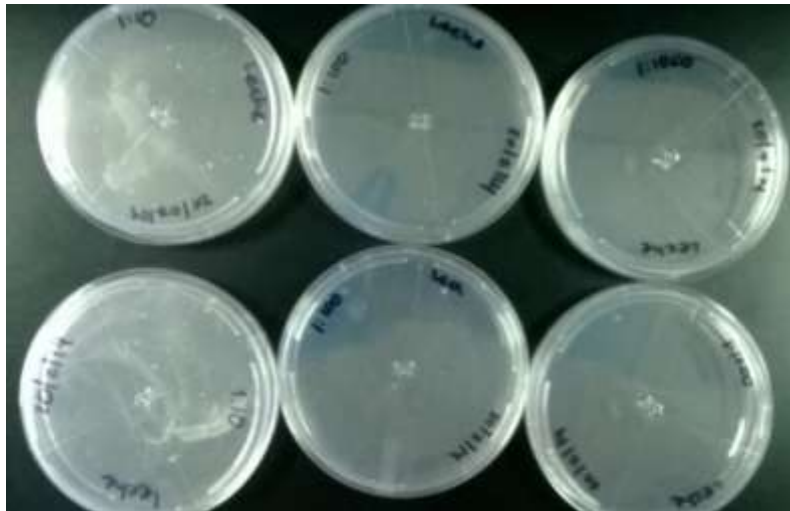


Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



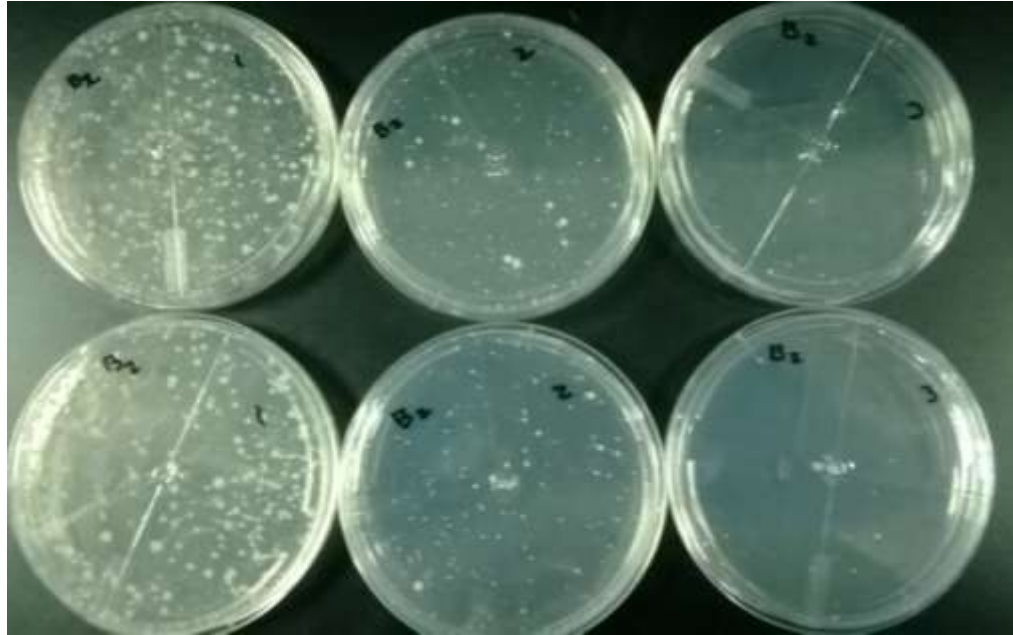
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

23. Imagen del control de calidad microbiológico de la leche empleada para la elaboración de quesos



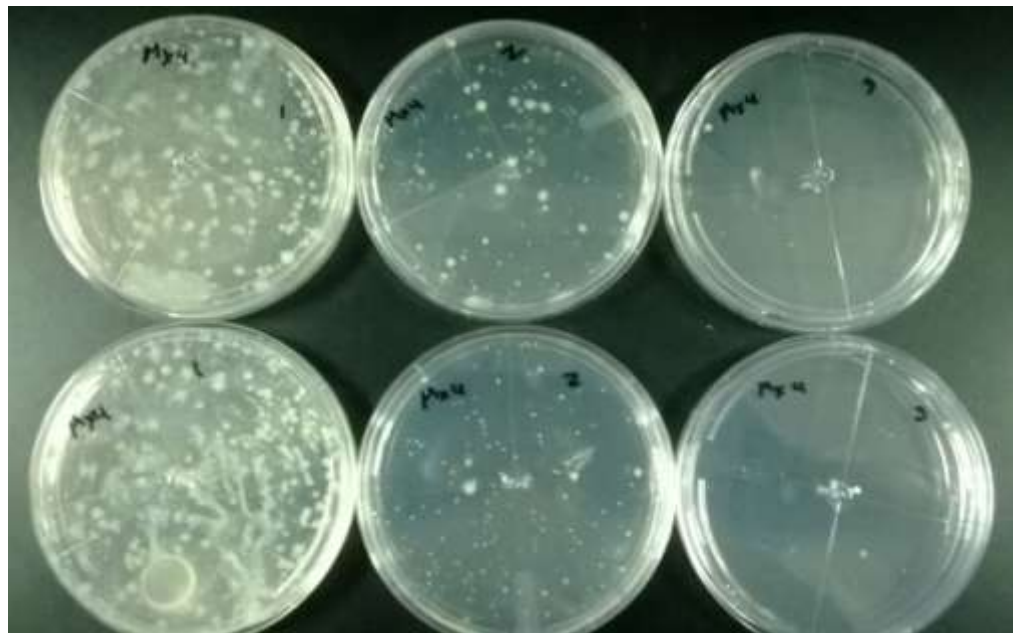
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

24. Imagen del control de calidad microbiológico de los quesos sin aceite de laurel en el primer día de elaboración.



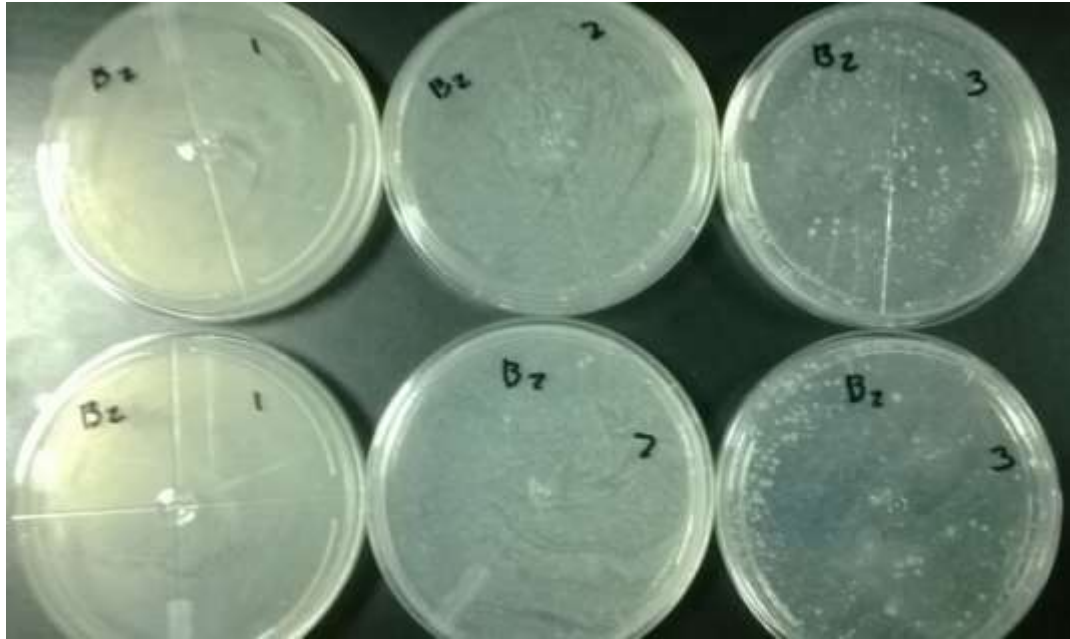
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

25. Imagen del control de calidad microbiológico de los quesos con aceite de laurel en el primer día de elaboración.



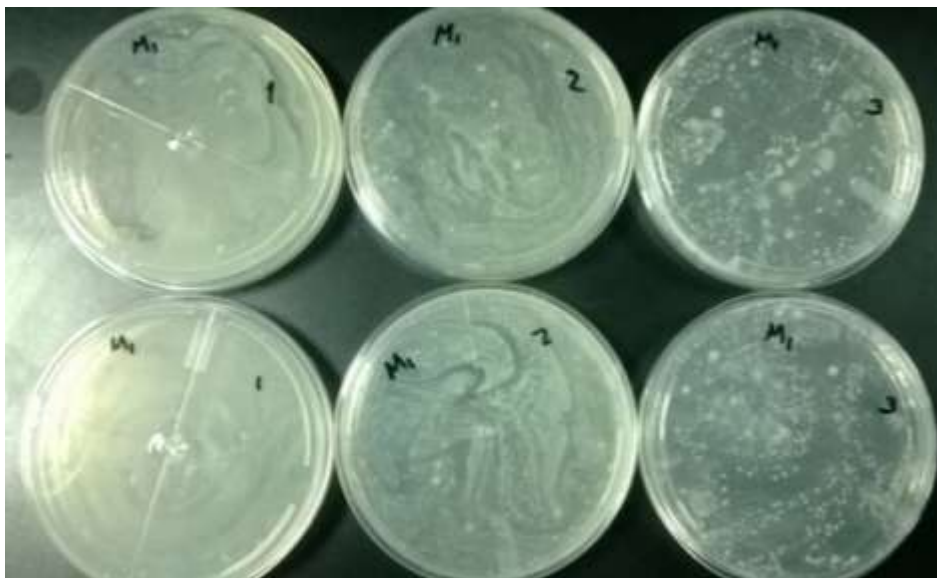
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

26. Imagen del control de calidad microbiológico de los quesos sin aceite de laurel en el séptimo día de elaboración.



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

27. Fotografía del control de calidad microbiológico de los quesos con aceite de laurel en el séptimo día de elaboración.

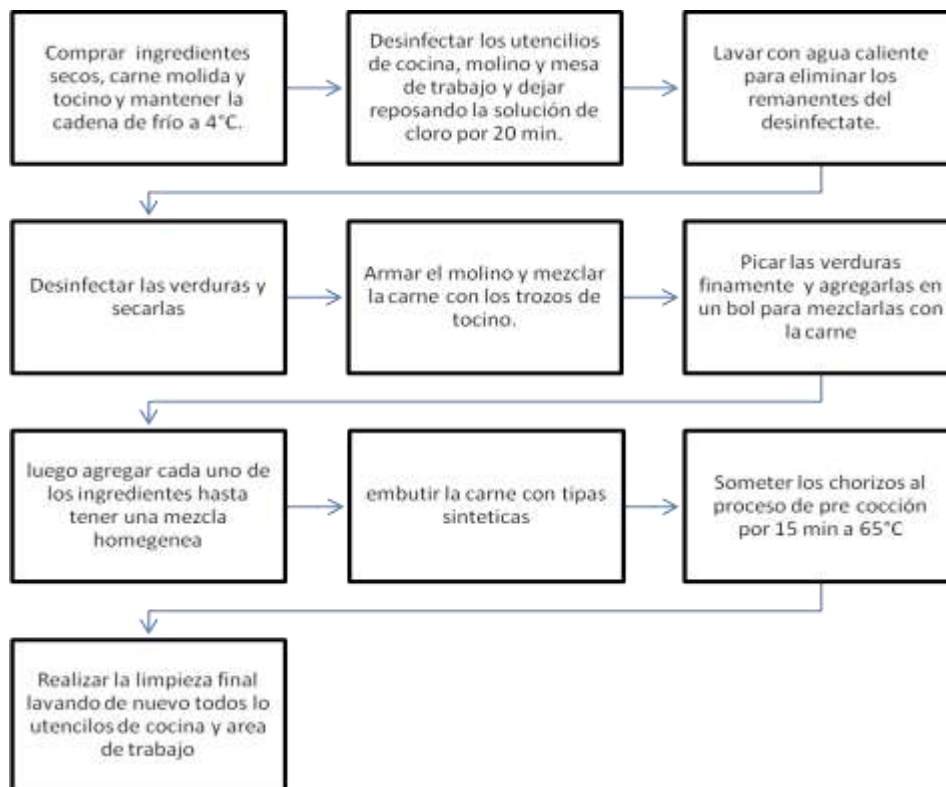


Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

28. Receta de elaboración de chorizo y diagrama de flujo

RECETA DE CHORIZOS CON HOJAS DE LAUREL MOLIDO

3 LBS. Carne de res molida con 5% de grasa
½ Lb de tocino
1 chile pimiento grande
2 cabezas de ajo
½ cucharita de pimienta
2 sobres de pimentón
6 gr. de laurel molido
Tripa de cerdo sintético



29. Imagen de la elaboración de chorizo



Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012



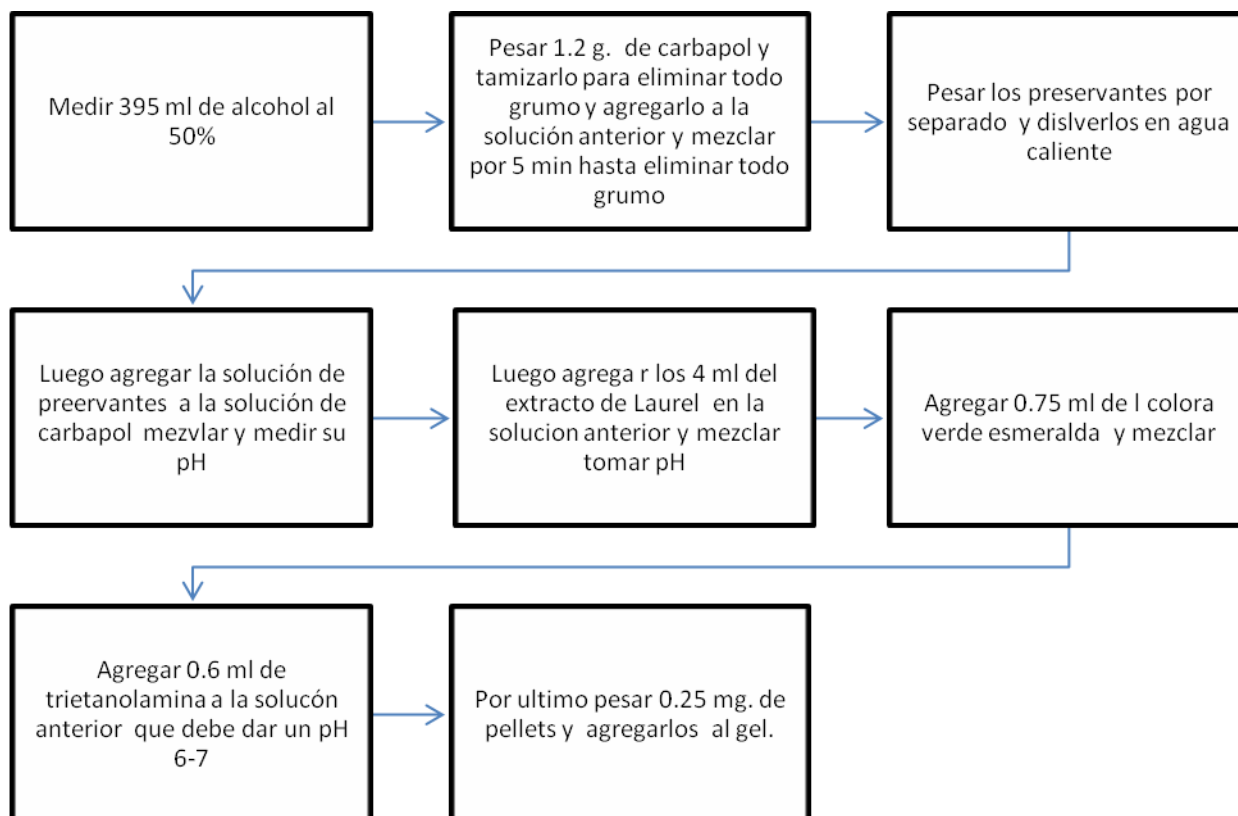
Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

30. Formula y diagrama de flujo de elaboración de gel antibacteriano en base a laurel.

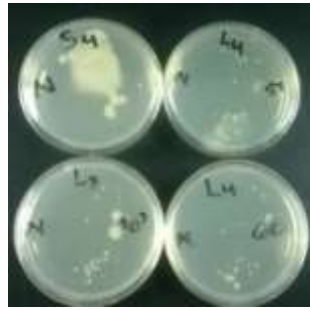
FORMULA TECNICA
GEL DE MANOS CON EXTRACTO DE LAUREL 1%

Carbapol.....	1.2 g
Alcohol 50%.....	395 ml
Extracto de Laurel disuelto en etanol al 50%.....	4 ml
Metilparabenos.....	720 mg
Propilparabenos.....	80 mg
Trietanolamina.....	0.6 ml
Colorante verde esmeralda.....	0.75 ml
Pellets.....	0.25 mg

FLUJOGRAMA DEL GEL PARA MANOS CON EXTRACTO DE LAUREL



31. Imagen de la evaluación del gel de laurel como desinfectante de mano

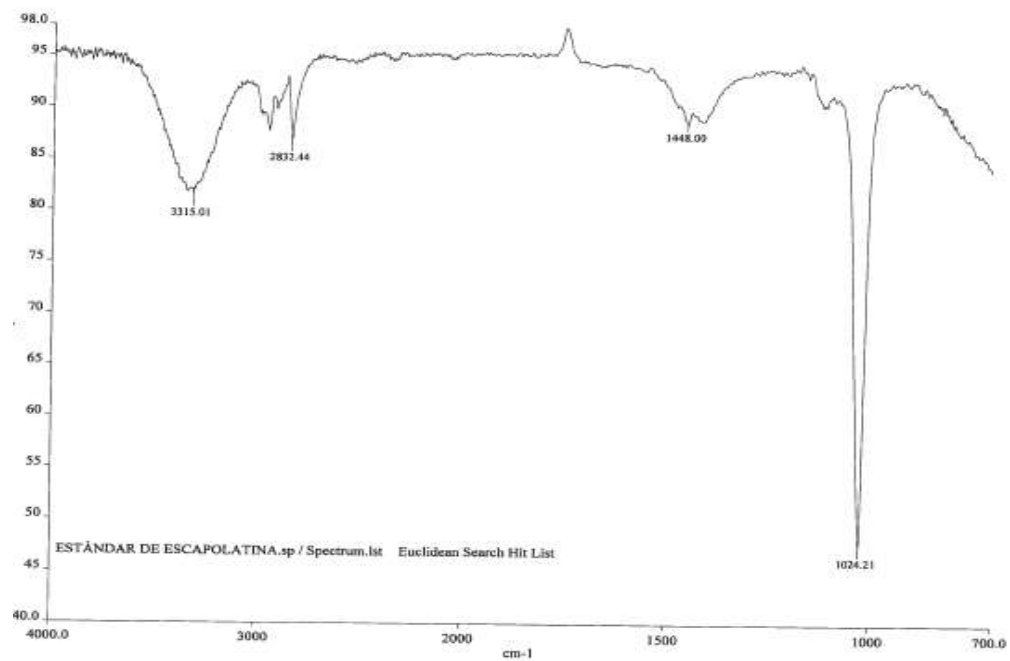


Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

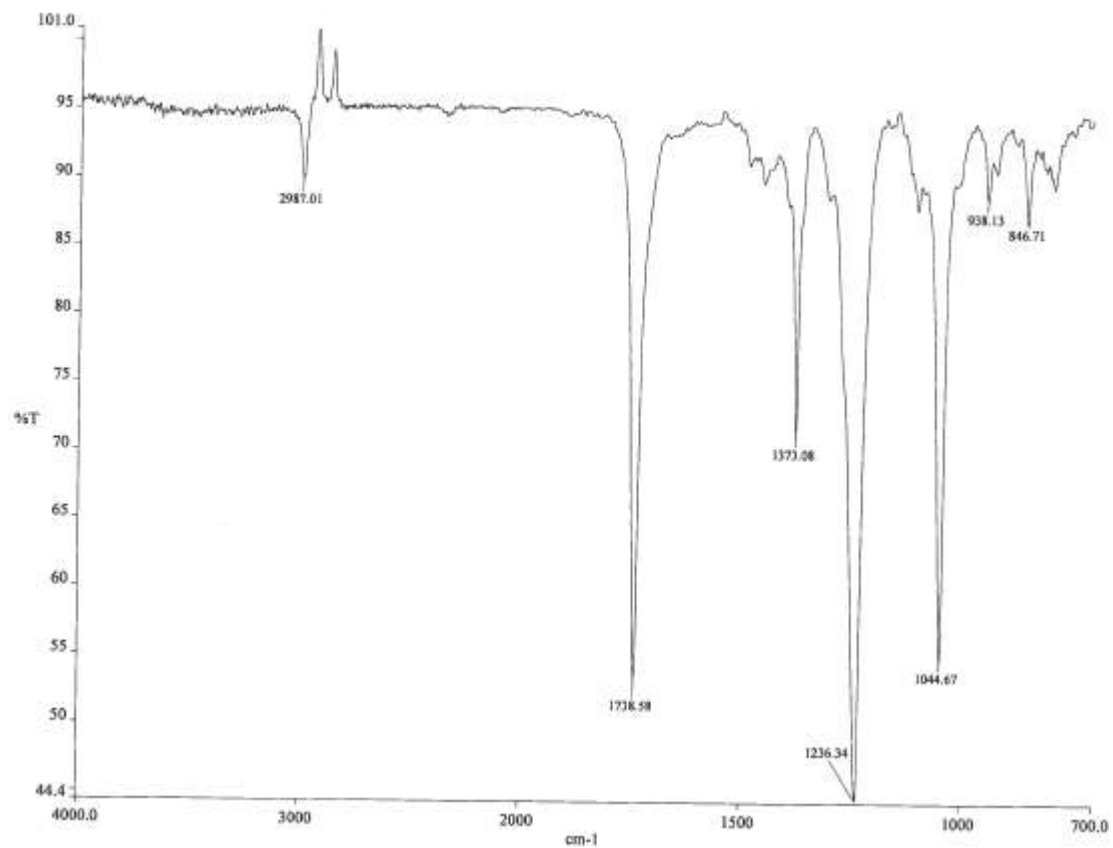


Fuente: Proyecto FODECYT 07-2012

32. Espectro infrarrojo de estándar de scopoletina



33. Espectro infrarrojo de fracción 4 de partición diclorometano de muestra 5E de extracto etanólico de laurel



F. _____
Dra.Sully Margot Cruz Velásquez
Investigadora Principal

Vo.Bo. _____
Dr. Rubén Velásquez
Decano
Fac. CCQQ y Farmacia, USAC

PARTE V INFORME FINANCIERO

AD-R-0013

FICHA DE EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA							
LINEA: FODECYT							
<i>Nombre del Proyecto:</i>		<i>"Evaluación del potencial antioxidante y antimicrobiano del aceite esencial y extractos de Laurel (Litsea</i>					
<i>Numero del Proyecto:</i>		<i>guatemalensis) como preservante en alimentos y cosméticos(Fase II)"</i>					
<i>Investigador Principal y/o Responsable del Proyecto:</i>		LICDA. SULLY MARGOT CRUZ VELÁSQUEZ					
<i>Monto Autorizado:</i>		Q348.050,00		<i>Orden de Inicio (y/o Fecha primer pago):</i>			
<i>Plazo en meses:</i>		24 meses:					
<i>Fecha de Inicio y Finalización:</i>		01/06/2012 al 31/05/2014		1a. PRORROGA AL 31/07/2014			
Grupo	Reglon	Nombre del Gasto	Asignación Presupuestaria	TRANSFERENCIA		Ejecutado	Pendiente de Ejecutar
				Menos (-)	Más (+)		
1		SERVICIOS NO PERSONALES					
	122	Impresión, encuadernación y reproducción	Q 1.500,00		Q 2.000,00		Q 3.500,00
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad	Q 144.550,00			Q 117.100,00	Q 27.450,00
	183	Servicios de capacitación			Q 10.000,00	Q 9.042,00	Q 958,00
	189	Otros estudios y/o servicios (Evaluación externa de impacto)	Q 8.000,00				Q 8.000,00
2		MATERIALES Y SUMINISTROS					
	243	Productos de papel o cartón	Q 500,00		Q 64,00	Q 564,00	Q -
	244	Productos de artes gráficas	Q 500,00		Q 200,99	Q 700,99	Q -
	261	Elementos y compuestos químicos	Q 30.000,00			Q 29.964,87	Q 35,13
	268	Productos plásticos, nylon, vinil y pvc	Q 1.500,00			Q 59,99	Q 1.440,01
	269	Otros productos químicos y cosméticos			Q 55,25	Q 55,25	Q -
	272	Productos de vidrio	Q 15.000,00	Q 2.497,49	Q 1.872,49	Q 14.375,00	Q -
	282	Productos metalúrgicos no ferrosos			Q 89,00	Q 89,00	Q -
	286	Herramientas menores			Q 88,25	Q 58,00	Q 30,25
	292	Útiles de limpieza y productos sanitarios	Q 1.500,00			Q 193,91	Q 1.306,09
	295	Útiles menores, médico-quirúrgicos y de laboratorio	Q 20.000,00	Q 1.872,49		Q 11.772,85	Q 6.354,66
3		PROPIEDAD, PLANTA, EQUIPO E INTANGIBLES					
	323	Equipo médico-sanitario y de laboratorio	Q 125.000,00	Q 10.000,00		Q 30.465,00	Q 84.535,00
			Q 348.050,00	Q 14.369,98	Q 14.369,98	Q 214.440,86	Q 133.609,14
MONTO AUTORIZADO			Q 348.050,00			Disponibilidad Q 326.609,14	
(-) EJECUTADO			Q 21.440,86				
SUBTOTAL			Q 326.609,14				
(-) CAJA CHICA							
TOTAL POR EJECUTAR			Q 326.609,14				