

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



Presentado por

Gerber Antonio Solorzano Campos

Para optar al título de
Químico Farmacéutico

Guatemala, agosto 2015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
Msc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A la Tricentenario Universidad de San Carlos de Guatemala:

Por permitirme el privilegio de egresar de sus aulas como un profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia:

Por brindarme todos los conocimientos que me permitirán desarrollarme en mi carrera como Químico Farmacéutico y por pertenecer a este plantel como Auxiliar de Catedra.

A mi Asesora:

Sully Cruz, Ph.D. Por su ejemplo de trabajo, enseñanza y valiosa amistad.

A mi revisora:

Licda. Julia García, por orientarme en la realización de este trabajo, enriqueciéndolo con sus consejos.

A la dirección de Escuela de Química Farmacéutica:

En especial a Doña Carmencita, Ingrid Ochoa y Vilma. Por su cariño, atención y paciencia.

Al laboratorio de alimentos de la Escuela de Nutrición:

En especial a la Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A. por prestarme las instalaciones de dicho laboratorio y por su orientación en el proceso de elaboración del queso fresco.

A la familia:

Regalado Girón, Córdova, Escobar Chupina. Por su hospitalidad, consejos y sus muestras de cariño.

DEDICATORIA

A Dios:

Por ser mí guía, fortaleza y enseñarme que todo en su tiempo es perfecto.

A mis Padres:

José Ramiro Solórzano (QEPD) y Blanca Rosa Campos. A usted mamá como recompensa de sus constantes esfuerzos e incondicional apoyo. Por haberme dado la oportunidad de gozar de todos los privilegios de su amor, protección guía y educación. Hoy puedo decir misión cumplida uno de muchos de nuestros sueños hoy se hace realidad. Gracias.

A mis Abuelitos:

Lorenzo Campos y María Gómez (QEPD) por sus sabios consejos y por su amor incondicional.

A mis Hermanos:

Dora por tenerme siempre en sus oraciones.

Flor de María, por ser uno de los pilares de mi vida que con su valor y determinación han hecho la persona que hoy en día soy.

Erick Roberto por su apoyo incondicional.

A mis hermanos que descansan en la presencia de DIOS, les recuerdo con mucho cariño en especial a José Estuardo por su alegría y por ser una persona con un corazón generoso.

A mis Sobrinos:

Con mucho cariño, por ser mis amigos y personas en las que puedo confiar.

A mis Tíos y Primos:

Por su ejemplo y apoyo incondicional que día tras día me han demostrado su cariño muy agradecido.

A mis Jefes:

Esturdo Serrano y Sully Cruz, por su confianza y brindarme tan anhelada primera oportunidad laboral y poderme desarrollar como investigador y docente.

A mis amigos:

A mis amigos, compañeros y conocidos. Por ser parte de esta odisea y compartir tantas vicisitudes únicas con personas únicas como ustedes.

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT:

Por ser mi segunda casa durante este tiempo donde me formaron con valores y principios éticos y morales. Gracias Licda. Carolina Valdez, Nereida Marroquín, Sofía Marroquín, y Lic. Max Mérida.

Departamento de Farmacia Industrial:

Por darme la oportunidad de trabajar día con día formando profesionales farmacéuticos. Gracias Lic. Julio Chinchilla, Licda. Mabel Rosado y Licda. Lucrecia de Haase por compartir cada uno de sus conocimientos.

A mis Catedrático:

Con mucho cariño y respeto. En especial Licda. Aylin Santizo y Julia García por cada uno de sus consejos y ponerle esa chispa de alegría y enseñarme que en medio de la tormenta se puede reír.

ÍNDICE

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	4
3.	Antecedentes.....	5
4.	Justificación.....	32
5.	Objetivos.....	33
6.	Hipótesis.....	34
7.	Materiales y Métodos.....	35
8.	Resultados.....	48
9.	Discusión de Resultados.....	58
10.	Conclusiones.....	63
11.	Recomendaciones.....	64
12.	Referencias Bibliográficas.....	65
13.	Anexo.....	69

1. RESUMEN

En Latinoamérica, se ha observado la tendencia a diversificar los productos y subproductos de origen lácteo, usando como preservantes químicos ácido benzoico, ácido sórbico, ácido propiónico entre otros; el uso de estas sustancias químicas a largo plazo pueden ocasionar daños en la salud. Debido a la apertura económica, la cual imprime competitividad a procesos comerciales. En Guatemala, nace la inquietud de elaborar subproductos que sean atractivos, novedosos y de alta calidad para la población con materiales 100% orgánicos.

Por lo antes expuesto se presenta la iniciativa de investigación, de evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de dos especies de laurel, *Litsea guatemalensis* y *Litsea neesiana* para ser utilizado como un posible preservante natural en queso fresco. Se tomó como referencia el laurel por ser una planta ampliamente utilizada como condimento en la cocina guatemalteca y ha demostrado interesantes propiedades tales como antioxidante y antibacteriano. Previamente se han realizado estudios en donde los extractos etanólicos y aceites esenciales de las dos especies de Guatemala, *L. guatemalensis* y *L. neesiana*, han demostrado estas actividades por lo que es necesario comprobar *in vitro* si se mantienen dichas actividades para ser utilizados como prototipos de preservantes naturales en el queso fresco.

En esta investigación primero se determinó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de ambas especies de laurel y el aceite esencial *L. guatemalensis* por medio del método cualitativo macrométrico en Cromatografía en Capa Fina (CCF) utilizando como revelador 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). La especie que presentó mayor actividad antioxidante por este método fue *L. neesiana*, tanto el aceite como el extracto etanólico de *L. guatemalensis* presentó una actividad media. Con el método cuantitativo los extractos etanólicos de las dos especies de laurel quien presentó mayor actividad antioxidante, fue la especie de *L. neesiana* con (CI₅₀ de 0.290 mg/mL) y *L. guatemalensis* (CI₅₀ de 0.675 mg/mL).

Luego se extrajo el aceite esencial de ambas especies, por medio del método de hidrodestilación por neoclevenger. El rendimiento de la especie *L. guatemalensis* es de 1.01%, y para la especie *L. neesiana* es de 0.01%. Por el bajo rendimiento de esta

especie impide que se realice la actividad antioxidante y antimicrobiana en aceite esencial. Es por esta razón que realizó una caracterización química de las dos especies de hojas de laurel por medio del método de microextracción en fase sólida (Fibra) por cromatografía de gases. Los compuestos obtenidos en ambas especies son: D-limoneno, Eucaliptol, O-Cimeno. Pero para la especie *L. neesiana* los compuestos se encuentran en baja concentración es por esta razón que esta especie es menos aromática comparada con la especie *L. guatemalensis*.

La infusión de las hojas de laurel de ambas especies y el aceite esencial *L. guatemalensis* no presentaron ninguna actividad antimicrobiana. En caso contrario; los extractos etanólicos presentaron mayor actividad, por lo antes mencionado se realizó una evaluación *in vitro* de los extractos etanólicos de ambas especies de laurel, para determinar la concentración inhibitoria mínima CIM para el extracto etanólico de la especie *L. neesiana* presentó frente a las siguientes bacterias un CIM: *S. aerus* (0.625mg/mL), *E. coli* (2.5mg/mL), y *Salmonella* (5mg/mL). El extracto etanólico de la especie *L. guatemalensis* presentó una concentración inhibitoria mínima CIM frente a las siguientes bacterias: *S. aerus* (1.25mg/mL), *E. coli* (1.25mg/mL), y *Salmonella* (5mg/mL).

Para evaluar la actividad preservante del queso fresco. Primero se pasteurizó la leche antes de la manufactura del queso fresco. Luego se le agregaron siete tratamientos el primero de ellos era el blanco que solo era queso fresco, segundo queso fresco con preservante químico (sorbato de potasio), tercer tratamiento queso fresco con aceite esencial de *L. guatemalensis*, cuarto queso fresco con infusión de *L. guatemalensis*, quinto queso fresco con extracto de *L. guatemalensis*, sexto queso fresco con extracto de *L. neesiana* y por último queso fresco con infusión de *L. neesiana*. Después se realizó un control microbiológico a cada uno de los tratamientos para evaluar el crecimiento bacteriano de cada uno de los quesos y evaluar los cambios de las características organolépticas de cada queso en 24 días. La mejor forma de preservar el queso fresco pasteurizado es con el extracto etanólico de laurel *L. neesiana* ya que no interfiere con las características organolépticas del queso fresco e inhibe el crecimiento bacteriano del mismo. El recuento bacteriano a los 31 días todavía era apto para el consumo humano.

Por último se realizó una prueba de aceptabilidad a 30 panelistas con un promedio de edad de 25 años. Las infusiones de ambas especies de laurel en el queso fresco presentaron un porcentaje de aceptabilidad del 100%, seguido el aceite esencial de *L. guatemalensis*. El extracto etanólico de *L. neesiana* con un 95% el extracto con *L. guatemalensis* presentó bajo puntaje debido al sabor potente de laurel el cual enmascaraba las características organolépticas del queso fresco.

2. INTRODUCCIÓN

La elaboración de queso fresco en Guatemala es una actividad muy diseminada en todo el país, es consumido por una cantidad numerosa de población, ya que es un alimento muy completo rico en calcio, proteínas, fósforo, grasa y vitaminas; pero también es un medio muy propicio para la reproducción de ciertas bacterias.

Es por esta razón que se han establecido normas específicas para cada tipo de queso, que deben ser cumplidas por las industrias de productos lácteos, donde se señalan los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos según la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). Uno de estos requisitos es usar preservantes químicos para inhibir el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras con el fin de prolongar la vida útil del queso fresco en la industria. Entre los preservantes más utilizados en queso fresco están: Ácido benzoico, ácido sórbico, ácido propiónico y sus sales de calcio, potasio y sodio, nisina, piramicina, entre otros; el uso de estas sustancias químicas a largo plazo pueden ocasionar daños en la salud.

El reino vegetal representa un reservorio enorme de moléculas valiosas que pueden tener una aplicación medicinal, cosmética, alimenticia y agroindustrial. Es por ello que la presente investigación pretenderá evaluar si el extracto y aceite esencial de dos especies de laurel, *L. guatemalensis* y *L. neesiana* funcionan como preservantes naturales en queso fresco, para ser utilizados como prototipos de preservantes naturales con el objetivo de disminuir los efectos tóxicos que presentan a largo plazo los preservantes químicos.

Para realizar esta investigación, los extractos etanólicos de ambas especies se obtuvieron por percolación y reconcentración por medio del rotavapor, el aceite esencial de las dos especies de laurel se obtuvo por hidrodestilación con neoclevenger. Luego se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* contra cepas contaminantes de alimentos; con las concentraciones y resultados positivos obtenidos en el método anterior se realizó en queso fresco para evaluar su actividad como preservante natural por último se evaluó las características organolépticas del queso fresco con extracto, infusión y aceite esencial por medio de pruebas hedónicas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Descripción de la familia *Lauracea*

Los árboles pertenecientes a la familia *Lauracea* son aromáticos, con hojas alternas, raramente opuestas, simples, pinnadamente venadas, usualmente enteras, deciduas con las zonas templadas, perennifolias en los trópicos; sin estipulas. Las inflorescencias son comúnmente axilares, panículas, espigas, racimos o umbelas. Las flores por lo general son bisexuales, en ocasiones unisexuales, actinomorfas. Poseen cáliz de seis sépalos, en dos series unidos en un tubo en la base. No poseen corola. El androceo tiene cuatro verticilos de tres estambres cada uno de ellos, o uno de ellos, o uno o más verticilos reducidos a estaminodios o ausentes, adnados al tubo del perianto. El gineceo es un pistilo simple con un carpelo, un lóculo, y un óvulo, placentación marginal, ovario súpero, un estilo, un estigma. Los frutos son bayas o drupas frecuentemente rodeadas en la base por una cúpula que se deriva del tubo del cáliz persistente. El embrión es recto y grande y no posee endospermo (Jones, 1987).

3.1.1 Descripción del género *Litsea*

El género *Litsea* posee más de 100 especies, unas 12 de América, y en Guatemala se han descrito tres especies nativas que se usan indistintamente como laurel (*Litsea glaucescens* HBK, *L. neesiana* (Schauer) Hemsl. y *L. guatemalensis* Mez.). Se ha mencionado en 1970 el nombre nahuatl Ecapátli o medicina del viento por Hernández y también se describen sus propiedades medicinales. Las hojas de las tres especies tienen olor muy parecido al del laurel europeo (*Laurus nobilis* L.), por lo que se le atribuyen propiedades similares. *L. nobilis* se cultiva y usa medicinalmente desde los griegos y romanos; sus hojas eran las guirnaldas que se daban a los ganadores de las Olimpiadas (Cáceres, 1996; 2003).

3.1.2 Descripción de la especies *Litsea guatemalensis* y *Litsea neesiana*

El laurel *L. guatemalensis* es un árbol de hasta 6 m. de alto con ramas delgadas y cafés. Las hojas son coriáceas, con peciolos de 1.5 cm. de largo, elíptico-lanceoladas, de 8 cm. de largo, agudas en la base, lustrosas y glabras.

Presenta flores axilares, con pedúnculo simple, solitarias, de 15 mm. de largo, 5-11 flores, brácteas de involucro deciduo, con filamentos glabros. Es endémico de Guatemala y crece en bosques de pino montarrales de 1,500-3,150 msnm. Se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (Cáceres, 1996; 2003).

El laurel *L. neesiana* es un árbol que mide hasta 6 m de alto, ramas jóvenes teretes, pubescentes, con tricomas ferrugíneos o cinéreos, corteza pardo-rojiza. Hojas alternas, pecíolos hasta 1.2 cm largo, tomentosos; láminas 5.0-7.0 cm largo, 2.0-3.0 cm ancho, ampliamente elípticas a oblongas, base aguda u obtusa, ápice gradualmente agudo, haz esparcidamente pubescente, con tricomas largos, ondulados y ascendentes, envés tomentoso. Inflorescencia (masculinas y femeninas) axilares, solitarias o agrupadas a lo largo de ramas cortas áfilas, varias flores por inflorescencia, brácteas tomentoso ferrugíneas. Frutos 1.3 cm diámetro, negros cuando maduros, discoide con tricomas largos, rectos y ascendentes. Esta especie se ha distribuido en (Lorea y Jiménez, 2010).

3.1.3 Usos medicinales de la especie

Al cocimiento de las hojas de laurel se le ha atribuido actividad antibacteriana, y se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de afecciones respiratorias (amigdalitis, males de la garganta, tos, tosferina), gastrointestinales (diarrea, cólico, úlcera) y carencia de leche en la madre e hinchazón. Por vía tópica se usa en lavados y baños para el cansancio y epilepsia. El cocimiento de la corteza se utiliza para tratar mordedura de culebras y de perros. Tópicamente se usa en lavados y baños para cansancio, úlceras, piernas hinchadas y epilepsia. En sehumeros se usa para parálisis (Cáceres, 1996). Estudios realizados han comprobado que la tintura de hojas de *L. guatemalensis* no tiene actividad contra enterobacterias, pero tiene moderada actividad contra los hongos y levaduras *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporium canis* (Cáceres, 1996; 2003).

3.1.4 Otros usos populares

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

3.1.5 Farmacognosia

La materia médica son las hojas secas, las que deben tener las siguientes características botánica, fisicoquímica y organoléptica que caracterizan a la especie oficial. El aceite esencial de *L. glaucescens* tiene el olor característico pero difiere en su composición química, contiene 10 compuestos más que *L. nobilis* y hay 17 compuestos comunes a ambos. La presencia de limoneno en el aceite esencial reduce la dismenorrea por inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas (Cáceres, 1996; 2003).

3.1.6 Composición Química

Se encuentra muy poca información sobre la composición química de las tres especies endémicas del país. Por su olor característico similar a *L. nobilis*, se asume que *L. guatemalensis* y *L. glaucescens* tienen un aceite esencial rico en derivados terpénicos y glicéridos de los ácidos láurico, oleico, palmítico y linoléico. El tamizaje fitoquímico de *L. guatemalensis* indica: alcaloides cuartenarios y no cuartenarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, quercitina, estibina y taraxon; el aceite esencial contienen limoneno y citral. (Cáceres, 1996; 2003).

a. Aceites esenciales

3.2.1 Definición y origen de los aceites esenciales

Se les da el nombre de aceites esenciales a los aceites volátiles o aceites etéreos. Son mezclas complejas de sustancias, de variadas funciones químicas. El término aceite esencial es utilizado en general para designar aquellas sustancias volátiles

obtenidas por destilación a base de vapor de las plantas, o por otros métodos (Guenther, 1996).

Por otra parte, las siguientes hipótesis solamente explican el origen de los aceites esenciales en las plantas:

- Teoría que explica que los terpenos están formados por la adición del beta-amino ácido butílico normal a la leucina con la eliminación de amoníaco y agua, o por la adición alfa-amino ácido isocaproico alanina para dar cimeno. Cimeno más leucina da ácido cinámico, uno de los principales constituyentes de la corteza de la canela. Ácido cinámico y cimeno se isomerizan produciendo terpenos.
- Existe también la opinión que los terpenos son originados de carbohidratos; la primera etapa es la formación del aldehído beta-metil-crotónico de acetona y acetaldehído. Dos moléculas de aldehído metil-crotónico se polimerizan para obtener geraniol, el cual se isomeriza muy fácilmente a terpenos.
- Otra hipótesis admite la formación de terpenos a partir de carbohidratos y proteínas (Guenther, 1996).

3.2.2 Composición química de los aceites esenciales naturales

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

- Ésteres: principalmente de ácido benzoico, acético, salicílico y cinámico.
- Alcoholes: linalol, geraniol, citronelol, terpinol, mentol, borneol.
- Aldehídos: citral, citronela, benzaldehído, cinamaldehído, aldehído cumínico, vainilla.
- Ácidos: benzoico, cinámico, mirístico, isovalérico todos en estado libre.

- Fenoles: eugenol, timol, carvacrol.
- Cetonas: carvona, mentona, pulegona, irona, fenchona, tujona, alcanfor, metilnonil cetona, metil heptenona.
- Ésteres: ciñelo, éter interno (eucaliptol), acetol, safrol.
- Lactonas: cumarina.
- Terpenos: cafeno, pineno, limoneno, felandreno, cedreno.

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 (Bandoni, 2003).

3.3 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 inhibitorio más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente bactericidas, mientras que otros pueden ser bacteriostáticos.

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).

3.3.1 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).

3.3.2 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 los químicos como malo y/o riesgoso.

3.3.3 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. Estos 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 Generally Recognized As Safe 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)
- Nicina (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:

- Sorbatos: 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).

Tabla No. 1 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>

Fuente: Santiesteban, 2002

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 fenólicos 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, 1995).

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 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* (Mahmoud, 1994).

Entre los aceites esenciales que también tienen actividad antimicótica, 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).

3.4 Estudio Sensorial de los Alimentos

En la apreciación de un alimento, los sentidos tienen una importancia distinta a la que reciben en otros aspectos de la vida. Así, los llamados sentidos "químicos" como el olfato y el gusto suelen ser determinantes en una valoración subjetiva del alimento, mientras que los "físicos", vista, oído y tacto, más importantes en la vida rutinaria, juegan un papel secundario. Posterior al aroma y sabor definirán la elección futura del consumidor. La aceptación intrínseca de un alimento es la consecuencia de la reacción del consumidor ante las propiedades físicas, químicas y texturales del mismo. De hecho, una de las múltiples definiciones de análisis sensorial obedece al examen de las propiedades organolépticas de un producto por los órganos de los sentidos, es decir, el conjunto de técnicas que permiten percibir, identificar y apreciar un cierto número de propiedades características de los alimentos.

La evaluación sensorial es el análisis de los alimentos u otros materiales por medio de los sentidos. La misma incluye distintas etapas como son la definición del problema, la preparación de las pruebas, la ejecución de las pruebas y la interpretación de los resultados (Parrilla, 2002).

3.4.1 Formas de realizarlo

El análisis sensorial de los alimentos puede realizarse a través de diferentes pruebas, según la finalidad para la que estén diseñados. A grandes rasgos, pueden definirse dos grupos:

- Pruebas objetivas que se subdividen en discriminativas y descriptivas
- Pruebas no objetivas también denominadas hedónicas.

3.4.1.1 Pruebas objetivas

Una de las principales metas perseguidas por el análisis sensorial de alimentos es el desarrollo de una metodología, idealmente objetiva, para

la determinación de parámetros organolépticos en los alimentos. Hasta la fecha, y pese a numerosos intentos, el hombre no ha conseguido crear un instrumento que sustituya al análisis sensorial. Dicho instrumento debería englobar todos los métodos analíticos encaminados a evaluar el aspecto exterior, el sabor y el aroma de nuestros alimentos.

Las metodologías instrumentales consideradas objetivas el color es la única propiedad sensorial que puede ser medida, de forma instrumental, más efectivamente que visual. Otros aparatos como los texturómetros universales y la gran variedad de test encaminados a determinar parámetros reológicos como la dureza, fibrosidad, harinosidad, adhesividad, jugosidad. Existen otras evaluaciones instrumentales, también de gran uso en laboratorios alimentarios, denominadas técnicas semi objetivas. Se incluyen dentro de este grupo a las cromatografías y las valoraciones físico-químicas y bioquímicas, indicadoras de la composición cualitativa del producto (sus vitaminas, elementos minerales, proteínas, ácidos y azúcares, colorantes, edulcorantes artificiales) aspecto íntimamente ligado a las propiedades sensoriales y al margen de aceptabilidad del alimento. Todas estas técnicas pueden, en el mejor de los casos, llegar a tener una buena correlación en sus medidas con el juicio sensorial, pero parece muy difícil que puedan sustituir al ser humano. En última instancia son las personas las que deben valorar la calidad de un alimento, expresar la compleja apreciación sensorial y valorar su grado de satisfacción al ser degustado.

Se puede decir que hoy en día no existe ninguna técnica capaz de simular las sensaciones que un catador experimenta, por lo que es necesaria una valoración sensorial de los alimentos por un equipo de personas.

Los análisis objetivos se dividen en dos grandes grupos: Pruebas discriminativas y descriptivas.

- Pruebas discriminativas: tienen como objeto detectar la presencia o ausencia de diferencias de atributos sensoriales entre dos o más productos.
- Pruebas descriptivas: su utilidad es muy diversa, desde la determinación de diferencias sensoriales entre un producto y sus competidores en el mercado, hasta la caracterización de aromas, un tema de gran interés para las empresas de alimentación, dada la disparidad de criterios entre el productor y el cliente con relación a su estabilidad (Parrilla, 2002).

3.4.1.2 Pruebas hedónicas

Es aquella en la que el juez catador expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, si lo prefiere a otro o no. Son pruebas difíciles de interpretar ya que se trata de apreciaciones completamente personales, con la variabilidad que ello supone.

Los estudios de naturaleza hedónica son esenciales para saber en qué medida un producto puede resultar agradable al consumidor. Pueden aplicarse pruebas hedónicas para conocer las primeras impresiones de un alimento nuevo o profundizar más y obtener información sobre su grado de aceptación o en qué momento puede producir sensación de cansancio en el consumidor (Van Trijp et al., 1995).

3.4.2 Factores a ser contemplados para la realización adecuada de un análisis sensorial.

Uno de los mayores problemas asociados al análisis sensorial de los alimentos es conseguir que la respuesta humana sea precisa y reproducible dado que el aparato sensorial humano muestra grados de variación de sensibilidad de persona a persona, que cada mundo individual de sensaciones es muy diferente dependiendo del nivel de desarrollo y que la sensibilidad puede ser influenciada fácilmente por cuestiones externas o del medio.

Existen numerosos elementos determinantes en la aceptabilidad o preferencia de un producto, elementos que deben ser tenidos en cuenta al momento del diseño del análisis sensorial. Se pueden subdividir en dos grandes grupos: Características del alimento o bebida y características del consumidor (Van Trijp et al., 1995).

3.4.2.1 Características del alimento

- Disponibilidad: Resulta básico que sea fácil encontrar el producto en las zonas habituales de compra para el consumidor, de ahí que uno de los objetivos mayoritarios de todas las empresas de alimentos sea ampliar sus puntos de venta.
- Utilidad: Por alimento útil se entiende aquel que resulta imprescindible en una dieta por el aporte de vitaminas, nutrientes esenciales, proteínas o carbohidratos, que puede ejercer un efecto beneficioso sobre nuestra salud o nuestro aspecto físico o que puede ayudar a reducir una enfermedad.
- Conveniencia: La conveniencia se diferencia básicamente de la utilidad porque se introducen factores económicos.
- Precio: Sin duda alguna es uno de los factores más limitantes para la libertad con la que el consumidor escoge el producto y puede ser origen de una diferenciación social. El hombre tiene una disponibilidad limitada de recursos económicos para el consumo, determinada por su nivel de renta y por la existencia de unos precios que debe pagar para acceder a aquello que desea (Van Trijp et al., 1995).
- Uniformidad, estabilidad y almacenamiento: Los productos poco estables, que requieren de unas condiciones de almacenamiento y conservación peculiares suelen tener poco éxito entre la población.

- Valor nutricional: Existe un nuevo perfil de consumidor cada vez más preocupado por el valor cualitativo y dietético de los alimentos.

3.4.2.2 Propiedades sensoriales

- Aspecto
- Olor
- Aroma y sabor
- Textura

3.4.2.3 Características del consumidor

- Preferencias regionales, por nacionalidad o raza: Está claro que en determinadas zonas existe una especial predilección por algunos alimentos, ya sea por tradición o porque la producción es abundante.
- Edad y sexo: La edad puede afectar a la preferencia por ciertos productos: dulces en niños, salados y amargos en adultos, mientras que la influencia del sexo depende del producto y de la cultura a la que pertenezca el individuo.
- Religión y educación: Se conoce las recomendaciones y orientaciones, en materia alimenticia, de algunas religiones. Se trata de una opción libre y como tal se entiende. En cuanto a la educación se convierte en un factor primordial.
- Motivación psicológica: Engloba creencias propias y ajenas, actitudes y expectativas y se encuentra innegablemente condicionada por la publicidad.
- Motivación fisiológica: Incluye determinadas necesidades fisiológicas. Es indudable que tener sed o hambre eleva, por

encima de otras prioridades, la necesidad de adquirir una bebida o una comida (Van Trijp et al., 1995).

3.5 Queso:

Es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido por la coagulación de leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, leche en polvo, crema, crema de suero, o suero de mantequilla o una combinación cualquiera de éstas, por la acción de cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin aplicación de calor, y con o sin la adición de otros ingredientes y aditivos alimentarios (Jiménez, 1983; Gálvez, 1997).

3.5.1 Queso fresco:

Es el producto lácteo sin madurar o madurado, obtenido por la coagulación, enzimática y/o ácida de leche, suero de leche, crema o cualquier combinación de los mismos, después de drenar el suero formado, con o sin aplicación de calor, y con o sin la adición de otros ingredientes y aditivos alimentarios (Volk, 1997).

3.5.2 Clasificación

El producto se clasificará de acuerdo a su composición y características físicas en los siguientes tipos (Goded & Mur, 1954).

3.5.2.1 Según el contenido de humedad

- Duro
- Semiduro
- Semiblando
- Blando

3.5.2.2 Según el contenido de grasa láctea

- Rico en grasa
- Graso
- Semigraso
- Magro

3.5.2.3 Según características del proceso

- Fresco: Para consumir hasta 10 días después de su fabricación.
- Semiduro: Para consumir después de reposar entre 10 y 30 días después de su fabricación.
- Madurado: Para consumir después del tiempo asignado según el tipo de queso.
- Madurado por mohos.
- Fundido.

3.6 Naturaleza química

La grasa del queso se encuentra principalmente en forma de glóbulos con la superficie cubierta de material proteínico; pero es así mismo inevitable la presencia de algunas grasas libres. Durante la maduración del queso, el glicerol y los ácidos grasos procedentes de grasa neutra se hidrolizan. Los ácidos grasos son fácilmente perceptibles por su olor, pero formando parte del todo, estos productos representan una porción relativamente pequeña del queso (Potter, 1978; Fox & Cameron, 1999).

Las proteínas de la leche se alteran notablemente; tan pronto como es añadido el cuajo se inicia la coagulación. La caseína se transforma en paracaseína, que se une con el calcio para formar la cuajada (Helen, 1998).

La caseína siendo anfótera, como todas las proteínas, tiene cierta acidez que le permite separar el metal de un carbonato, liberando el grupo carbónico, para luego formar sales. Bajo esta forma se encuentra en la leche de vaca formando caseinato de calcio, en tanto que en la humana se encuentra como caseinato de sodio o potasio (Potter, 1978; Lehninger, 1993).

El caseinato de calcio se encuentra en la leche en forma de micelas, y cuando este tipo de coloides precipitan de sus soluciones, dan un coágulo voluminoso que retiene gran cantidad de líquido. El caseinato de calcio se encuentra asociado a micelas más gruesas de fosfato cálcico; parece ser que el núcleo lo forma el fosfato rodeado del caseinato, con lo que adquiere las propiedades del coloide que lo rodea y pierde por ello su estabilidad

frente a los electrolitos. En el caso clásico de la protección de un coloide hidrófobo por otro hidrófilo (García et al., 1993).

La coagulación de la leche depende de la riqueza de ésta en caseína, de la fuerza del cuajo empleado, cantidad que de éste se emplee, reacción del medio, riqueza del suero en metales alcalinos y alcalinotérreos, la proporción de albúmina y globulina, riqueza en grasa de la leche y existencia o no de un grupo carbónico (Fox & Cameron, 1999).

Los componentes de la fase acuosa de la maduración del queso son de extraordinaria importancia, son ácidos grasos, aminoácidos, aminos, péptidos, lactosa, sales minerales, bacterias y enzimas en gran cantidad (Helen, 1998).

Las proteínas solubles del suero contienen una gran proporción de aminoácidos fluorados, cistina y cisteína. Cuando la proteína se calienta son liberados grupos sulfhídrico, seguidos por la formación de compuestos sulfhidrúlicos y de varias sustancias reductoras. La formación de sustancias reductoras que acompañan a la descomposición de los grupos sulfhídrico en compuestos sulfhidrúlicos, afecta probablemente el crecimiento de las bacterias productoras de ácido láctico, modificando el potencial de óxido-reducción de la leche (Potter, 1978).

Cualquier obstáculo al normal desenvolvimiento de ácidos adecuados durante el proceso de la fabricación del queso altera las propiedades finales de éste. La formación de ácido láctico depende hasta cierto punto de las propiedades de la leche ya que ésta es un excelente medio para el desarrollo de las bacterias lácticas (Fox & Cameron, 1999).

3.7 Elaboración de quesos

3.7.1 Materias primas y materiales

Para la elaboración de los quesos no madurados se emplean los siguientes ingredientes, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2001).

- Leche pasteurizada entera, semidescremada o descremada, leche evaporada, leche en polvo, crema o suero de leche; también se podrá emplear leche

sometida a otros procesos tecnológicos y cuyas características microbiológicas sean equivalentes o mejores que las de la leche pasteurizada.

Nota: La leche fresca utilizada para elaborar los quesos frescos no madurados no debe contener preservantes ni adulterantes.

- Enzimas y/o cultivo de bacterias inocuas
- Sal para consumo humano (grado alimentario)
- Aditivos alimentarios autorizados
- Cualquier otro tipo de producto de calidad comestible cuyo uso sea reconocido para la elaboración de quesos no madurados en sus diferentes tipos.

3.7.2 Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios deberán cumplir con las normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius (Flores, 1971).

3.7.3 Reguladores del pH

Se podrán emplear como reguladores del pH los ácidos o álcalis indicados en la tabla No. 2

Tabla No. 2 Reguladores del pH en queso fresco

Reguladores del pH	Dosis máxima en el producto final
Ácido cítrico	40 g/kg
Ácido fosfórico	9 g/kg
Ácido acético	40 g/kg
Ácido láctico	40 g/kg

Fuente: Marina, 1971

3.7.4 Coadyuvantes de la coagulación

Se puede emplear como coadyuvante de la coagulación el cloruro de calcio en una cantidad máxima de 0.02 % m/m, con respecto a la leche empleada en la elaboración y referido a la sal anhidra (Marina, 1971).

3.7.5 Estabilizadores

Se puede emplear las sustancias estabilizantes que se indican en la tabla siguiente, preferiblemente en los casos de queso cottage, queso cottage con crema y queso crema (Alais, 1984).

Tabla No. 3 Estabilizadores utilizados en la manufactura de queso fresco

Estabilizadores	Dosis máximas en el producto final
Goma del algarrobo	0.5 %, expresado en masa, solos o mezclados. (Para todos los Estabilizadores)
Carboximetil celulosa de Sodio	
Carragenina	
Goma de avena	
Alginatos de sodio y potasio	
Alginato de propilenglicol	
Goma Xanthán Locus Bean Gum	

Fuente: Alais, 1984

3.7.6 Conservadores

Solamente en los quesos no madurados que se presenten rodajados o en porciones equivalentes a unidades de consumo se podrá emplear como conservador el ácido sórbico y/o sus sales de sodio y potasio en una cantidad máxima de 0.3 % expresado en masa en el producto final y referido a ácido sórbico (Henry, 1981).

3.8 Método tradicional para la elaboración de queso fresco

Aunque la procedencia de la leche puede ser de diferentes especies animales, como oveja, cabra y búfalo, la mayor parte de los quesos que se consumen actualmente proceden de la leche de vaca. Un requisito para la elaboración de quesos es obtener leche de buena calidad sanitaria y fisicoquímica. También es necesario que el proceso de ordeñamiento y todas las manipulaciones posteriores sean efectuadas en condiciones de higiene adecuadas. La leche debe ser pasteurizada, es decir, sometida a tratamiento térmico que garantice la destrucción de las bacterias causantes de enfermedad. Una excepción a lo anterior es el queso añejo, en el cual se permite la utilización de leche

“bronca” o cruda, siempre y cuando el producto sea vendido 100 días después de su fabricación. La razón de lo anterior es que el añejamiento destruye los organismos generadores de enfermedades, que pudieran estar presentes en la leche sin pasteurizar (Compaire, 1986).

3.8.1 Cuajado de la leche

Una vez obtenida la leche, el siguiente paso es el cuajado o coagulación de la misma. Para lograrlo se puede recurrir a dos métodos: Mediante microorganismos o a través de la adición de enzimas de origen animal (cuajo o fermento). Lo más común es hacerlo por medio del agregado del cuajo (Compaire, 1986).

Al añadir el cuajo (en polvo, tabletas o líquido), la principal proteína de la leche (caseína), se separa del suero o fracción líquida de la misma. A este fenómeno, conocido como precipitación, se debe la formación de la cuajada o coágulo inicial (Compaire, 1986).

Una vez bien mezclado el cuajo, es preciso que la leche quede en perfecto reposo. De lo contrario la coagulación se inicia mientras la leche todavía está en movimiento, lo cual provoca que el queso sea muy quebradizo. Si la adición del cuajo no es uniforme, en la leche, se obtienen quesos con porciones muy duras en su pasta. Mientras mayor es la acidez de la cuajada, ésta se hace más elástica hasta el punto en que el cuajo puede estirarse considerablemente. Si se calienta puede alargarse en filamentos gruesos. Esta es la característica típica de los quesos asaderos y del que se produce en Italia (Mozarella), el cual es también de alta elasticidad (Compaire, 1986).

3.8.2 Desuerado

En toda clase de quesos, los coágulos que componen la cuajada, sufren un fenómeno de sinéresis (encogimiento) a partir de la expulsión del suero retenido en el mismo. Esta pérdida de agua da mayor firmeza a la cuajada. La combinación de la formación de la cuajada y el desuerado constituyen procesos de

deshidratación o desecación de la leche que impide la proliferación inicial de bacterias y favorece la conservación del producto.

La eliminación de humedad durante el proceso determina y condiciona la consistencia final del queso, su contenido de lactosa y por lo tanto de ácido láctico, con sus posteriores repercusiones fisicoquímicas y microbiológicas (Compaire, 1986).

Los quesos no madurados (caracterizados por su alta humedad), se obtienen a partir de cuajadas muy poco desueradas y es por esta razón que son muy vulnerables a la acción de las bacterias, hongos y levaduras que pueden originar tanto la descomposición del queso, como producir efectos dañinos en la salud del consumidor (Compaire, 1986).

3.8.3 Salado

Salvo muy raras excepciones a todas las variedades de queso se le añade sal en alguna de las etapas de su elaboración. Los métodos más frecuentes de aplicación consisten en poner el queso fresco en una salmuera fuerte o en frotar su superficie con sal seca. La concentración de este ingrediente en el producto depende de la sal en la salmuera, el tiempo y temperatura de exposición, la relación de la superficie con el volumen del queso, así como su contenido de humedad. La sal influye en el sabor del queso, elimina suero de la cuajada y contribuye a regular la humedad y la acidez. También ejerce un control sobre el crecimiento de los microorganismos indeseables, pues regula la microbiota del queso (Compaire, 1986).

La cuajada, una vez salada, constituye el queso en bruto. Ya desuerado se presenta como una masa blanquecina, insípida y semiconsistente. A excepción de los quesos frescos, las distintas variedades son sometidas a un proceso de maduración, en el que adquieren el sabor, olor y otras características propias de estos productos (Compaire, 1986).

3.8.4 Conservación del queso

Para su perfecta conservación, los quesos deben estar en una atmósfera húmeda, bien aireada y una temperatura que oscila entre 6 y 10°C. Los quesos de pasta, dura (machengo, roncal, gruyère, etc.). Pueden guardarse al aire libre, en un lugar fresco, excepto en las épocas más calurosas del año (Benenson, 2000).

Debido a su alto contenido de humedad, el queso suave se mantiene en buen estado por un corto período. Una práctica bastante común resulta mezclar hasta un 10% de sal en la cuajada, lo que permite extender su periodo de conservación y mejorar su sabor (De León, 1999).

Para conservar el queso en tiempo de calor, el mejor recurso es la refrigeración, se debe de tener especial cuidado en el control de temperatura y humedad. Los quesos frescos y de capas, deben de envolverse cuidadosamente con papel de estaño o plástico, para evitar que se sequen (Manual Codex Alimentarius).

El empaclado del producto, juega un papel muy importante, cumpliendo la función de protección del producto desde el momento de ser envasado hasta su consumo final, soporta el manipuleo de la carga, descarga, transporte y almacenamiento del mismo (Benenson, 2000).

3.9 Normas y especificaciones de calidad

La Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) es la encargada de encauzar debidamente la industrialización y el comercio de alimentos y de otros productos, logrando así un mayor desarrollo de nuestra economía, partiendo del concepto de que las normas son un instrumento público al servicio de la nación (Normas COGUANOR).

COGUANOR en la norma NGO 34 197, define al queso como producto lácteo sin madurar o madurado, obtenido por la coagulación enzimática y/o ácida de la leche, suero de la leche, crema o cualquier combinación de los derivados lácteos, después de drenar

el suero formado con o sin aplicación de calor, y con o sin la adición de otros aditivos alimentarios.

Según COGUANOR, el queso no madurado (queso fresco) puede ser moldeado o no, escaldado o no, prensado o no, y que inmediatamente después de las etapas de desuerado y salado, queda listo para el consumo y por lo general no son agregados cultivos lácticos (Jiménez, 1983).

El Codex Alimentarius define al queso como el producto blando, semiduro, duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche. Se entiende por queso sometido a maduración, el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse por cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión.

Se entiende por queso madurado por mohos un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente por consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso. Se entiende por queso sin madurar el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación (Goded & Mur, 1954).

Desde el punto de vista fisicoquímico el queso es un sistema tridimensional tipo gel, formado básicamente por la caseína, integrada en un complejo caseinato-fosfato-cálcico-magnésico, el cual por coagulación forma una masa que engloba los glóbulos grasos, algunos minerales, vitaminas, lactosa y otros componentes de la leche que se mantienen absorbidos en el sistema o en solución en la fase acuosa retenida (Henry, 1981).

3.9.1 Características generales del queso fresco

Los quesos no madurados deberán ser elaborados con ingredientes limpios, sanos, libres de contaminación y de insectos en cualesquiera de sus etapas evolutivas, así como de cualquier defecto que pueda afectar su

comestibilidad, el buen aspecto del producto final para una conservación adecuada del mismo; los quesos no madurados deberán ser elaborados y envasados bajo estrictas condiciones higiénicas sanitarias (Jiménez, 1983).

3.9.2 Características sensoriales del queso fresco

La apariencia, la textura, el color, el olor y el sabor de los quesos no madurados deberán ser los característicos para el tipo de queso que corresponda y deberán estar libres de los defectos indicados a continuación (Henry, 1981).

- Defectos del sabor: fermentado, rancio, agrio, quemado, o cualquier otro sabor anormal extraño.
- Defectos en el olor: Fermentado, amoniacal, fétido, rancio, mohoso, o cualquier olor anormal o extraño.
- Defectos en el color: Anormal; no uniforme, manchado o moteado, provocado por crecimiento de mohos o microorganismos que no correspondan a las características del queso de que se trate.
- Defectos en la textura: No propia o con cristales grandes de lactosa con consistencia ligosa acompañada de olor desagradable
- Defectos en la apariencia: No propia, con cristales grandes de lactosa, sucia o con desarrollo de mohos u otros hongos.

3.9.3 Características químicas del queso fresco

El producto deberá cumplir con las características químicas especificadas en la tabla No. 4

Tabla No. 4 Características químicas del queso fresco

Tipo de queso no madurado	Humedad % en masa, máximo	Grasa láctea, % en masa, en base húmeda
Queso cottage	80.0	No mayor de 2.0
Queso cottage con crema	80.0	No menor de 4.0
Queso quark	80.0	No mayor de 8.0
Queso quark en grasa	60.0	No menor de 18.0
Queso ricotta (elaborado solamente con suero de leche)	80.0	No menor de 0.5 (*)
Queso crema	65.0	No menor de 24.0
Queso fresco, bajo en grasa	70.0	No mayor de 1.2
Queso fresco	70.0	No menor de 1.23
Queso de capas	45.0	No menor de 1.4
Queso duro	39.0	No menor de 9.0
Queso mozzarella	60.0	No menor de 18.0

Fuente: Henry, 1981

3.10 Estudios previos

Oliva (2011), realizó una investigación sobre el Fraccionamiento bioquímico y tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos, de acetato de etilo y cloroformo de laurel: *Litsea glaucescens* HBK y *Litsea guatemalensis* Mez con el objetivo de evaluar la actividad antioxidante, antibacteriana y composición química de dos especies comerciales de laurel en Guatemala concluyendo que los extractos que presentaron mayor actividad antibacteriana contra *M. smegmatis* son los clorofórmicos para ambas especies, presentando una concentración inhibitoria mínima de 0.25 mg/mL para *L. guatemalensis* y 0.50 mg/mL para *L. glaucescens*. El extracto de acetato de etilo *L. glaucescens* presentó actividad antioxidante con un CI_{50} de 0.3093 mg/mL.

López (2008), realizó la siguiente investigación titulada: Determinación de *Salmonella* spp. en queso fresco y de capas producido artesanalmente y distribuido en el mercado la terminal zona 4, uno de sus objetivos era establecer por medio de análisis microbiológico la presencia y/o ausencia de *Salmonella* spp. en queso fresco y de capas producido artesanalmente y distribuido en el mercado de la Terminal. Por lo que concluyó por medio de un análisis microbiológico, que las muestras de queso fresco y de capas producido de forma artesanal y distribuido en el mercado la Terminal, registraron ausencia de *Salmonella* spp.

Hernández (2007), determinó que la infusión al 10% de las hojas de *L. guatemalensis* no presentó actividad antiinflamatoria a dosis de 750 y 1000 mg/Kg de peso corporal *in vivo*.

Barrios (2006), realizó la evaluación y mejoramiento de la calidad microbiológica de queso fresco a base de leche no pasteurizada, elaborado artesanalmente y comercializado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con el objetivo de establecer la calidad microbiológica de los quesos frescos, elaborados artesanalmente y expendidos por la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Con lo antes mencionado se concluyó que la pasteurización que se implementó durante el proceso de elaboración del queso fresco (82°C/4min) permitió disminuir los recuentos microbiológicos en producto final a límites aceptables por los parámetros sugeridos por la ICMSF y la norma COGUANOR NGO-34-197.

Según Ortiz (2005), los componentes mayoritarios para el aceite esencial de *Litsea glaucescens* son: 1,8-cineol (62.60%), linalol (8.23%), nerolidol (5.92%), terpinen 4-ol (5.30%) y limoneno (4.62%) para la región R1, Parramos, Chimaltenango; linalol (17.95%), nerolidol (19.52%) y limoneno (39.88%) para la región R2, San Lucas Sacatepéquez y 1,8-cineol (44.76%), linalol (29.77%), acetato de α -terpinilo (11.44%) para la región R3, Matanzas, San Jerónimo, Baja Verapaz.

Valverde (2003) reporta la composición del aceite esencial de las hojas de *Litsea guatemalensis*, indicando que los componentes mayoritarios son: 1,8-cineol (26.8%), α -terpineol(14.5%), linalol(10.8%) y terpinen-4-ol(6.8%), estudio realizado en México con materia prima de la región. Se observa que la composición química del aceite esencial de *Litsea guatemalensis* depende de la región de procedencia de la materia prima.

Determinación de la Contaminación por *Listeria monocytogenes* en Quesos de Producción Comercial en Guatemala Usando el Método USDA”, realizado en 1,997 en la Escuela de Química Biológica (Gálvez, Erick). En esta tesis se demostró que la mayoría de los quesos frescos muestreados estaban contaminados con *Listeria monocytogenes* lo cual indica que estos productos no están siendo elaborados con normas asépticas o que no son almacenados a la temperatura adecuada

Otro estudio microbiológico en productos lácteos es la tesis “Determinación en Cremas y Quesos no Madurados de *Coliformes* y *Staphylococcus aureus*, basándose en las Normas COGUANOR Vigentes”, la cual se elaboró en 1,993 en la Escuela de Química Biológica (Castillo, Roberto). En los resultados de este estudio se obtuvo que la mayoría de cremas y quesos frescos no cumplen con la normas GOGUANOR para *Staphylococcus aureus*, ya que presentan más de 10^2 microorganismos por cada gramo de producto, además tampoco cumplen con las especificaciones del Codex Alimentarius para Coliformes fecales ya que el máximo permitido es de 10,000 microorganismos por cada gramo de alimento.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el estudio de las plantas medicinales ha ganado protagonismo en el ámbito científico de Guatemala debido al amplio uso que se les puede dar a las mismas. El laurel es una planta ampliamente utilizada como condimento en la cocina guatemalteca y ha demostrado interesantes propiedades tales como antioxidante y antibacteriana. Previamente se han realizado estudios en donde los extractos etanólicos y aceites esenciales de las dos especies de Guatemala, *L. guatemalensis* y *L. neesiana*, han demostrado estas actividades por lo que es necesario comprobar *in vitro* si se mantienen dichas actividades para ser utilizados como prototipos de preservantes naturales en el queso fresco.

Con esta investigación se generará información valiosa en la caracterización de la flora nativa guatemalteca y la diversidad de su uso con el fin de potenciar su cultivo sostenible en caso de mostrar alguna actividad promisoría.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de dos especies de laurel, *L. guatemalensis* y *L. neesiana* para ser utilizado como un posible preservante natural en queso fresco.

5.2 Específicos

5.2.1 Determinar la actividad antioxidante en extractos y aceites de laurel, *L. guatemalensis* y *L. neesiana*.

5.2.2 Determinar la actividad antimicrobiana en extractos y aceites de laurel, *L. guatemalensis* y *L. neesiana* contra cepas contaminantes de alimentos como un posible preservante natural en queso fresco.

5.2.3 Evaluar las características organolépticas del queso fresco agregando extracto y aceite de laurel, *L. guatemalensis* y *L. neesiana*.

6. HIPÓTESIS

Al menos un extracto o aceite esencial de laurel, *L. guatemalensis*, y *L. neesiana* presentan actividad antimicrobiana o antioxidante para ser utilizado como preservante natural en queso fresco.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo:

7.1.1 Universo: Dos especies de laurel: (*L. guatemalensis* y *L. neesiana*.)

7.1.2 Muestra: Infusión, aceite esencial y extracto etanólico de dos especies del laurel *L. guatemalensis* y *L. neesiana*.

7.2. Medios:

7.2.1 Recursos Humanos:

7.2.1.1 Autor: Br. Gerber Antonio Solorzano Campos

7.2.1.2 Asesora: Sully Cruz Ph.D.

7.2.1.3 Revisora: Licda. Julia Amparo García Bolaños M.A.

7.2.2 Recursos Institucionales:

- Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia -CEDOF- de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio del Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

7.3 Materiales:

7.3.1 Materiales y equipo:

7.3.1.1. Extracción continua por percolación

- Percolador de acero inoxidable
- Balanza
- Algodón
- Papel filtro

- Vasos de precipitar
- Erlenmeyers

7.3.1.2. Concentración usando evaporador rotatorio

- Rotavapor
- Balón de evaporación
- Condensador
- Bomba de vacío
- Refrigerante
- Balón de colecta
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua
- Balón de 1000 mL

7.3.1.3 Extracción del aceite esencial

- Destilador tipo Neoclevenger (manta de calentamiento, destilador, balón de fondo redondo de 1000 mL y refrigerante)
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua
- Micropipetas
- Bulbo
- Viales

7.3.1.4. Actividad antimicrobiana *in vitro*

- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella tiphy*
- *Bacillus cereus*
- *Escherichia coli*
- Agar Muller-Hinton
- Asa de nicromo
- Autoclave
- Cajas de petri cuadrilate 100x15mm.
- Incubadora a 36 °C
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas de 200 µL

- Puntas azules de 100 μ L
- Refrigeradora
- Tubos de tapón de rosca de 15 mL

7.3.1.5 Actividad antioxidante por el método micrométrico 2,2-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)

- Extractos vegetales
- Balanza analítica
- Espátula
- Beacker
- Microplacas 96 pozos
- Embudo
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Vórtex
- Sonificador
- Lector de placas ELISA
- Pipetas automáticas de 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L

7.3.2 Reactivos

- Etanol al 50%
- Etanol al 95%
- Solución Salina
- Metanol
- 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)
- Agua desmineralizada

7.4 Métodos:

7.4.1 Preparación de la muestra

- El material vegetal de la especie de *L. neesiana* fue colectada en ladero del volcán de Acatenango y la especie *L. guatemalensis* por ser una especie comercial fue adquirida en la distribuidora Juanitas.

Ambas especies se depositaron en el Herbario de Laboratorio Farmaya, el número de voucher para la especie *L. neesiana* es CFEH 1,384 y para la especie *L. guatemalensis* es CFEH 1,385. Después de coleccionar ambas especies se secan a una temperatura de 40°C por medio de un horno de convección forzada, la humedad de la materia vegetal no debe exceder más del 10%.

7.4.2 Extracción continua por percolación con etanol al 95%

- Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón adecuado, de manera que sirva de filtro. Cortar un pedazo de papel filtro de forma circular y colocarlo cubriendo el fondo del percolador.
- Luego tapar la punta del percolador con un tapón plástico.
- Agregar la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y cubrir con etanol al 95 por ciento.
- Verificar que no queden burbujas y si las hay, hacer presión con una espátula para desaparecerlas.
- Agregar el resto de material vegetal seco y cubrir nuevamente con etanol al 95 por ciento, repetir el paso anterior.
- Rotular el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha y peso. Dejar reposar por 12-24 horas para que reaccione.
- Retirar el tapón plástico y dejar gotear hasta que salga todo el disolvente.
- Agregar el disolvente recuperado a la materia en extracción en el percolador, repetir esta operación cinco veces antes de comenzar a concentrar en rotavapor.
- Pasar el disolvente recogido al balón de rotavapor para concentrar. (Molina, 2005)

7.4.3 Concentración en evaporador rotatorio

- Encender el baño María y llevar la temperatura a 40°C ± 1°C.
- Lubricar con silicon todas las bocas esmeriladas y armar el rotavapor según el instructivo específico.
- Succionar la solución obtenida del percolador.

- Conectar la bomba de vacío y el rotavapor e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a consistencia semisólida.
- Verter el extracto concentrado en una caja de Petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.
- Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente tarados y rotulados.
- Calcular el rendimiento del extracto y guardar en viales o recipientes herméticos a 4°C.
- Calcular el rendimiento del extracto y guardar a 4°C. (CYTED, 1993; Kuklinski, 2000; Sharapin; 2000 Molina 2005).

7.4.4 Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación en Neoclevenger

- El material vegetal seco fue tamizado y posteriormente colocado en un balón de 1000 mL, humedeciéndolo con agua destilada.
- Seguidamente se colocó sobre una manta eléctrica y al sistema de destilación tipo Neoclevenger.
- El aceite destilado se recoge en un solvente orgánico como N-pentano y Hexano.
- El aceite destilado y el solvente orgánico se agregan en viales, luego se colocan en baño María para evaporar el solvente orgánico.
- El aceite obtenido se almacena en congelación hasta su utilización (Farmacopea Europea, 2001).
- Realizar las repeticiones necesarias hasta obtener la cantidad de aceite necesaria para evaluar la actividad antimicrobiana (Solis et al., 2005).

7.4.5 Microextracción en fase sólida

- Pesar 2 gramos de la muestra vegetal.
- Luego agregar estos dos gramos en un vial de 5 mL. Con tapón de rosca provisto de un septa Politetrafluoretileno y Silicona (PTFA/Silicona).
- Colocar cada vial en un calentador de bloque regulado a 50°C por 30 minutos.

- Para adsorber las aromas se debe utilizar una fibra de extracción en fase sólida Divenilbenzeno/Polidimetilsiloxano/Carboxeno (DVB/CAR/PDMS) Stableflex 2 Cm. (Supelco).
- Con la ayuda de una jeringa se inserta la fibra a través de la septa del vial y se expone durante 5 minutos. Antes de extraer la jeringa del vial se guarda la fibra dentro de la aguja.
- Luego desorber los aromas captados en la fibra se introduce la jeringa en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.
- Exponer nuevamente la fibra durante 3 minutos. Al flujo de gas, luego se extrae la jeringa.
- Las condiciones de trabajo deben ser las siguientes: Temperatura inicial de 60°C, seguido por una rampa de 3°C/minuto hasta alcanzar los 246°C. luego mantener un flujo constante de 1.02 mL/min de gas acarreador.

7.4.6 Tamizaje antimicrobiano

- La medición de esta actividad se realizará 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 el que no hay crecimiento visible en agar (placa) está basado en el descrito por Mitscher et al., 1972.
- Se mide por crecimiento de bacterias inoculadas en superficie de medios conteniendo moléculas bioactivas.
- Se realizará una distribución homogénea del compuesto en el agar que consiste en preparar cajas de Agar Muller- Hilton (AMH) con 0.1 mg/mL de extracto (AMH-E).
- Inocular las bacterias en caldo por 24 horas a 36°C.
- Diluir 1:100 en agua destilada estéril.
- Inocular con estrías por cuadruplicado con error (<0.05) en la superficie de AMH-E e incubar a 36°C por 24 horas.
- Se evaluará 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.

7.4.7 Tamizaje antimicrobiano en disco

La técnica está basada en el método de Kirby-Bauer. Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad por sus siglas en inglés NCCLS. El método se basa en la relación entre la concentración del aceite esencial necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado.

- Agregar en una caja petri el agar Mueller Hinton o agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras.
- La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 ó 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas.
- Luego sembrar homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm. de diámetro impregnado de aceite esencial a una concentración de 10 μ L.
- Presione cada disco firmemente para asegurar el contacto completo con la superficie de agar.
- Incubar 35°C por 16 a 18 horas.
- Para medir las zonas de inhibición desde la parte posterior de la placa usando luz reflejada se debe sostener la placa unos pocos centímetros sobre una superficie de color negro que no refleje la luz.

- Luego se mide redondeando al milímetro más cercano con una regla o un calibrador la luz reflejada es usada para *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, otros bacilos GRAM negativos, estafilococos y enterococos (excepto para oxacilina y vancomicina).
- Si la concentración de 10 μL de aceite esencial impregnada en los discos presentan un halo inhibitorio se procederá a determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Mitscher et al., 1972).

7.4.8 Determinación de la actividad antioxidante por medio del método Micrométrico DPPH.

- Preparación de solución madre

Pesar 20mg de extracto seco y agregar 1mL de metanol absoluto luego introducirlo en el sonificador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones ver tabla No. 5

Tabla No. 5 Serie de diluciones de la solución madre

No.	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Dilución	Concentración (mg/mL)
D-1	50	200	0.2	4
D-2	100	150	0.4	8
D-3	150	100	0.6	12
D-4	200	50	0.8	16
D-5	250	-----	1	20

Fuente: Mitscher et al., 1972

- Solución de 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH) 150 μM en metanol

Pesar 1.7 mg de reactivo de DPPH y disolver con metanol hasta un volumen de 25 mL en un balón aforado. Agitar la solución y conservar en un recipiente ámbar. Por ser una solución inestable, se recomienda preparar la solución en mismo día que se va a emplear, preparando únicamente lo necesario.

- Preparación de los pozos de reacción:

Utilizar microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos a utilizar deben ser nuevos. La preparación de las placas se realiza bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. (Todas las mediciones de volumen se realizan con pipetas automáticas). Ver tabla No. 6

Tabla No. 6 Preparación de los pozos de reacción

Pozo \ Reactivo	Muestra	Metanol	Solución de DPPH (150µM)
Blanco Control	---	220 µL	---
Control	---	20 µL	200 µL
Blanco de la muestra	20 µL	200 µL	---
Ensayo	20 µL	---	200 µL

Fuente: Mitscher et al., 1970

- Distribución en la placa

En una misma placa se pueden leer cuatro muestras distribuyéndolas adecuadamente, en la fila horizontal se colocan las repeticiones (A-C, F-H) y blanco de cada muestra (Columna D y E); y en la fila vertical se colocan cada una de las diluciones de ensayo (1-5, 8-12). En la fila 6A y 6H va el blanco del control; en la fila 7A y 7H va el control. Observar el siguiente esquema de distribución de muestras en una microplaca.

		R1	R2	R3		R3	R2	R1			
		H	G	F	E	D	C	B	A		
D-1	1				BMx	BMx				1	D-1
D-2	2				BMx	BMx				2	D-2
D-3	3				BMx	BMx				3	D-3
D-4	4				BMx	BMx				4	D-4
D-5	5				BMx	BMx				5	D-5
	6	BC							BC	6	
	7	CC							CC	7	
D-1	8				BMx	BMx				8	D-1
D-2	9				BMx	BMx				9	D-2
D-3	10				BMx	BMx				10	D-3
D-4	11				BMx	BMx				11	D-4
D-5	12				BMx	BMx				12	D-5
		H	G	F	E	D	C	B	A		
		R1	R2	R3		R3	R2	R1			

D = Diluciones de muestra, R = Repeticiones, BMx = Blanco de Muestra

BC = Blanco control, CC = Control

- Para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ Inhibición}$$

Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del blanco control

Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del blanco respectivo

Luego con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de cada dilución se elabora una gráfica lineal; esperando que valores de porcentaje de inhibición se encuentren entre el 60-70%. La ecuación de la recta debe tener un r^2 entre 0.97-0.99, para que la corrida sea aceptada.

Si no se cumple con un porcentaje de inhibición ente 60-70% y un r^2 entre 0.97-0.99, repetir el ensayo preparando otras diluciones (si la muestra está muy concentrada) y controlando el pipeteo para mejorar el r^2 .

Ya con una buena ecuación de regresión lineal determinar la concentración inhibitoria media, según la siguiente fórmula:

$$CI_{50}: \frac{50 \% - pendiente}{Intercepto}$$

7.4.8 Análisis de Durabilidad

Para este análisis se cuantificó el crecimiento bacteriano en términos de unidades formadoras de colonia (UFC/g), a fin de establecer el periodo de vida útil (días) del queso fresco con los diferentes tratamientos aceite esencial, infusión y extracto etanólico de las dos especies de laurel en estudio y los cambios organolépticos.

7.4.9 Análisis Sensorial

Para realizar el análisis sensorial al queso fresco se le presentó al jurado cinco muestras de queso fresco intercalando en cada dos muestras un pedazo de galleta soda y agua pura para limpiar el paladar de los jueces. La primera muestra de queso fresco con Aceite esencial de laurel (*L. guatemalensis*), segunda muestra queso fresco con infusión de hojas de laurel (*L. guatemalensis*), tercera muestra queso fresco con extracto etanólico al 95% (*Litsea guatemalensis*), la siguiente muestra queso fresco con infusión de hojas de laurel (*L. Neesiana*) y por último queso fresco con extracto etanolico al 50% (*L. neesiana*).

Para los resultados obtenidos en el análisis sensorial del queso fresco se evaluó por medio del test de aceptabilidad el cual se aplica para conocer la reacción de un consumidor frente a un alimento; este tipo de test es de carácter afectivo o subjetivo ya que miden el grado en que gustan o disgustan las preparaciones o productos por ello se dice que son pruebas de criterio personal. La aceptabilidad se puede evaluar en escalas que se presentan en una ficha junto con el nombre de la preparación a evaluar, la fecha y algunas veces el sexo, edad o lugar de origen del consumidor ya que esto servirá posteriormente cuando se realice tabulación de datos. Las escalas que se utilizaron para evaluar la aceptabilidad se denominan escalas hedónicas, y puede ser las siguientes:

- Me disgusta mucho MDM
- Me disgusta MD
- No me disgusta NMD
- Me gusta MG
- Me gusta Mucho MGM

7.5 Diseño de la investigación:

Para analizar el estudio *in vitro* del extracto y aceite esencial de las dos especies de laurel, *L. guatemalensis* y *L. neesiana* se utilizó como diseño estadístico un diseño de bloques completos al azar, con cinco réplicas con un nivel de significancia (α) de 0.05 los bloques serán las cajas de petri con una dilución de agar planta, en cada una de las cajas de petri se realizó una estría con las siguientes bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Shigella* en un orden aleatorio para evaluar el crecimiento o la inhibición del mismo.

Para el análisis del diseño de bloques completos al azar antes descrito se realizó la prueba de hipótesis binomial con un nivel de significancia (α) de 0.05.

Ho: $p = 0.5$ existe un crecimiento bacteriano en las cajas de petri con agar planta por lo tanto el extracto como el aceite esencial no tienen actividad bactericida.

Ha: $p > 0.5$ No existe un crecimiento bacteriano en las cajas de petri con agar planta por lo tanto el extracto como el aceite esencial si tienen actividad bactericida.

Se espera que con las cinco réplicas obtenidas todas tengan un efecto inhibitorio para poder rechazar la hipótesis nula H_0 .

Para evaluar las características organolépticas del queso fresco se realizó un estudio ciego en el cual los treinta jueces participantes degustaron sin saber que tratamiento previo tienen las cinco muestras de queso fresco. El análisis estadístico que se aplicó a las respuestas obtenidas por los jueces es una escala ordinal por medio de la prueba de Friedman.

8. RESULTADOS

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó el extracto etanólico de las dos especies de hojas en estudio y el aceite esencial de la especie *L. guatemalensis* según el cuadro No.1 se realizaron dos tipos de análisis un cualitativo y otro cuantitativo, en el primer análisis se determinó por medio de una cromatografía en capa fina con revelador del radical libre 2,2-difenil-1- picrilhidracilo (DPPH) este análisis se determina según la intensidad de decoloración del radical DPPH por lo tanto la especie que presentó mayor actividad antioxidante es *L. neesiana*. El análisis cuantitativo se evaluó por medio del método micrométrico con revelador DPPH, de las dos especies de hojas de laurel, la que reportó mayor actividad antioxidante por tener un coeficiente de inhibición CI_{50} menor a 1 es la especie de *L. neesiana* y una desviación estándar de ± 0.01 .

Cuadro No.1 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de laurel y aceite esencial de *Litsea guatemalensis*

		Tipo de Análisis	
Código	Muestra	Análisis Cualitativo por medio de Cromatografía en capa fina con revelador DPPH	Análisis Cuantitativo Micrométrico con revelador DPPH
		*Actividad Antioxidante	CI_{50} (mg/mL)
LGA	<i>Litsea guatemalensis</i> Aceite	++	---
LGE	<i>Litsea guatemalensis</i> Extracto	++	0.675 ± 0.009
LNE	<i>Litsea neesiana</i> Extracto	+++	0.290 ± 0.01
ESTANDARES	Vitamina C	+++	0.0896 ± 0.01
	Trolox	+++	0.1180 ± 0.0008
	TBHQ	+++	0.1147 ± 0.007
	Rutina	+++	0.1671 ± 0.0062
	Quercitina	+++	0.0749 ± 0.0004

Fuente: Datos experimentales.

*La actividad Antioxidante por CCF se determina por la intensidad de degradar el revelador DPPH en **+++ Fuerte, ++ Medio, + Leve**.

** La diferencia de medias entre ambas especies es de 0.35 con intervalo de confianza IC 95% número de muestra $n = 3/3$.

Se realizó un análisis de microextracción en fase sólida (Fibra) por cromatografía en gases, tomando como referencia las siguientes condiciones del método ADAMS: Temperatura del inyector 220°C, Columna J&WDB-5 X 30 metros de largo con un diámetro interno 0.25 µm. Temperatura inicial de 60°C, seguido por una rampa de 3°C/minuto hasta alcanzar los 246°C. Luego se mantuvo un flujo constante de 1.02 mL/min de gas acarreador.

Por medio de este análisis se determinó que la hoja de *L. guatemalensis* presentó 8 componentes como se observa en el cuadro No. 2, de estos 8 componentes los mayoritarios son: Eucaliptol, β - mirceno y γ - Terpineno. Para la especie *L. neesiana* fue D-Limoneno seguido del β -pineno.

Cuadro No. 2 Caracterización química de dos especies de hojas de laurel por medio del método de microextracción en fase sólida (Fibra) por cromatografía de gases

Muestra Hoja de <i>L. guatemalensis</i>					Muestra Hoja de <i>L. neesiana</i>				
TR min.	% de área	IR Teórico	IR Experimental	Tipo de Compuesto	TR min.	% de área	IR Teórico	IR Experimental	Tipo de Compuesto
4.909	1.11	939	681	α -pineno	7.525	69.00	1029	1155	D-Limoneno
5.978	0.57	979	1015	β -pineno	8.516	1.38	1060	1082	γ -Terpineno
6.360	4.96	989	1024	β - mirceno	12.010	1.61	979	1177	β -pineno
7.138	2.02	1002	1045	4-Carene					
7.443	0.69	1026	1053	O-Cimeno					
7.588	64.99	1031	1157	Eucaliptol					
8.521	3.99	1060	1082	γ - Terpineno					
13.17	1.16	1177	1195	Terpinen-4-ol					

*Se tomaron como metabolitos representativos en el aceite esencial de ambas especies, aquellos que mostraron una similitud mayor al 90% comparados con la base de datos NIST 05 a.L. Según el espectro de masas analizado y reportaron un porcentaje de área mayor a 0.5.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en la universidad del Valle de Guatemala

Los datos que se observan en el cuadro No. 3 son los resultados de las cinco repeticiones en diferentes concentraciones de las infusiones de las dos especies de laurel en estudio, donde se determinó que las infusiones no presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias más frecuentes en el queso fresco. Ver imagen en anexo No. 7 fotografía No. 7

Cuadro No. 3 Determinación de la actividad antimicrobiana de la infusión de dos especies de laurel

	Muestra																													
	<i>Litsea guatemalensis</i> No. Repeticiones															<i>Litsea neesiana</i> No. Repeticiones														
	1			2			3			4			5			1			2			3			4			5		
Concentraciones (% p/v)	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5	0.5	1	2.5
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales. * (+) = Inhibición, (-) = No hay inhibición

El cuadro No. 4 presenta los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana del extracto de laurel *L. guatemalensis* y *L. neesiana* contra las siguientes bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* y *Shigella*.

**Cuadro No. 4 Determinación de la actividad antimicrobiana
De los extractos etanólicos de *L. guatemalensis* y *L. neesiana***

No. Repeticiones	Muestra <i>Litsea guatemalensis</i>					Muestra <i>Litsea Neesiana</i>						
	**MIC	1	2	3	4	5	MIC	1	2	3	4	5
<i>E. coli</i>	1.25 mg/mL	*+	+	+	+	+	2.5 mg/mL	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	1.25 mg/mL	++	++	++	++	++	0.625 mg/mL	++	++	++	++	++
<i>Salmonella</i>	5mg/mL.	+	+	+	+	+	5mg/mL	+	+	+	+	+
<i>Shigella</i>	2.5 mg/mL	-	-	-	-	-	1,25 mg/mL	-	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales.

* (+) = Inhibición, **+++ Fuerte, ++ Medio, + Leve.** (-) = No hay inhibición

** MIC: Concentración mínima inhibitoria

El cuadro No. 5 evidencia que el aceite esencial de la especie de laurel *Litsea guatemalensis* no presenta ninguna actividad antimicrobiana contra las siguientes bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* y *Shigella*. Ver imagen en anexo No. 8

Cuadro No. 5 Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie *Litsea guatemalensis*

	Muestra <i>Litsea guatemalensis</i>				
No. Repeticiones	1	2	3	4	5
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales. * (+) = Inhibición, (-) = No hay inhibición

** La concentración que se utilizó para realizar esta prueba es de 10 µL

Los cuadros del No. 6 al No. 12 describen las características organolépticas como es el sabor, olor, color, textura de cada queso fresco con los diferentes tratamientos, el primero de ellos es queso fresco sin ningún tratamiento (blanco), luego queso fresco con preservante químico Sorbato de Potasio (control), el tercer queso fresco con Aceite esencial de laurel (*L. guatemalensis*), cuarto queso fresco con infusión de hojas de laurel (*L. guatemalensis*), quinto queso fresco con extracto etanólico al 95% (*L. guatemalensis*), sexto queso fresco con infusión de hojas de laurel (*L. Neesiana*) y por último queso fresco con extracto etanólico al 50% (*L. neesiana*). Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar el tiempo útil como preservante, con cada uno de los tratamientos anteriores evaluando las características organolépticas del queso fresco.

Cuadro No. 6 Características organolépticas del queso fresco blanco

Día de análisis	SABOR				OLOR				COLOR		TEXTURA	
	AGR	S	A	E	AM	R	FE	AGR	AG	NAG	CD	CB
1	X							X	X		X	
4	X							X	X		X	
8	X							X	X		X	
12			X		X				X		X	
16			X		X				X		X	
20				X			X			X	X	
24				X			X			X	X	

Fuente: Datos experimentales.

*AGR=agradable, S=salado, A=ácido, E=extraño, AM=amargo, R=rancio, FE=fétido, NAG=no agradable, CD=consistencia dura y CB=consistencia blanda.

Cuadro No. 7 Características organolépticas del queso fresco con Sorbato de Potasio (control)

Día de análisis	SABOR				OLOR				COLOR		TEXTURA	
	AGR	S	A	E	AM	R	FE	AGR	AG	NAG	CD	CB
1	X							X	X		X	
4	X							X	X		X	
8	X							X	X		X	
12	X							X	X		X	
16	X							X	X		X	
20			X		X				X		X	
24			X		X					X	X	

Fuente: Datos experimentales.

*AGR=agradable, S=salado, A=ácido, E=extraño, AM=amargo, R=rancio, FE=fétido, NAG=no agradable, CD=consistencia dura y CB=consistencia blanda.

**Cuadro No. 8 Características organolépticas
del queso fresco con aceite esencial de *Litsea guatemalensis***

Día de análisis	SABOR				OLOR				COLOR		TEXTURA	
	AGR	S	A	E	AM	R	FE	AGR	AG	NAG	CD	CB
1	X							X	X		X	
4	X							X	X		X	
8	X							X	X		X	
12	X							X	X		X	
16	X							X	X		X	
20	X							X	X		X	
24			X		X					X	X	

Fuente: Datos experimentales.

*AGR=agradable, S=salado, A=ácido, E=extraño, AM=amargo, R=rancio, FE=fétido, NAG=no agradable, CD=consistencia dura y CB=consistencia blanda.

**Cuadro No. 9 Características organolépticas
del queso fresco con infusión de hojas de *Litsea guatemalensis***

Día de análisis	SABOR				OLOR				COLOR		TEXTURA	
	AGR	S	A	E	AM	R	FE	AGR	AG	NAG	CD	CB
1	X							X	X		X	
4	X							X	X		X	
8	X							X	X		X	
12	X							X	X		X	
16			X		X					X	X	
20			X				X			X	X	
24			X				X			X	X	

Fuente: Datos experimentales.

*AGR=agradable, S=salado, A=ácido, E=extraño, AM=amargo, R=rancio, FE=fétido, NAG=no agradable, CD=consistencia dura y CB=consistencia blanda.

**Cuadro No. 10 Características organolépticas
del queso fresco con extracto de hojas de *Litsea guatemalensis***

Día de análisis	SABOR				OLOR				COLOR		TEXTURA	
	AGR	S	A	E	AM	R	FE	AGR	AG	NAG	CD	CB
1	X							X	X		X	
4	X							X	X		X	
8	X							X	X		X	
12	X							X	X		X	
16	X							X	X		X	
20	X							X	X		X	
24			X		X				X		X	

Fuente: Datos experimentales *AGR=agradable, S=salado, A=ácido, E=extraño, AM=amargo, R=rancio, FE=fétido, NAG=no agradable, CD=consistencia dura y CB=consistencia blanda.

**Cuadro No. 11 Características organolépticas
del queso fresco con infusión de hojas de *Litsea neesiana***

Día de análisis	SABOR				OLOR				COLOR		TEXTURA	
	AGR	S	A	E	AM	R	FE	AGR	AG	NAG	CD	CB
1	X							X	X		X	
4	X							X	X		X	
8	X							X	X		X	
12	X							X	X		X	
16	X							X	X		X	
20			X		X				X		X	
24			X		X				X		X	

Fuente: Datos experimentales. *AGR= agradable, S= salado, Acido= ácido, E= extraño, AM= amargo, R= rancio, FE= fétido, AGR= agradable, NAG= no agradable, CD= consistencia dura y CB= consistencia blanda.

**Cuadro No. 12 Características organolépticas
del queso fresco con extracto de hojas de *Litsea neesiana***

Día de análisis	SABOR				OLOR				COLOR		TEXTURA	
	AGR	S	A	E	AM	R	FE	AGR	AG	NAG	CD	CB
1	X							X	X		X	
4	X							X	X		X	
8	X							X	X		X	
12	X							X	X		X	
16	X							X	X		X	
20	X							X	X		X	
24	X							X	X		X	

Fuente: Datos experimentales. *AGR= agradable, S= salado, Acido= ácido, E= extraño, AM= amargo, R= rancio, FE= fétido, AGR= agradable, NAG= no agradable, CD= consistencia dura y CB= consistencia blanda.



En el cuadro No. 13 se observa el comportamiento de la inhibición del crecimiento bacteriano para evaluar la vida útil de cada uno de los tratamientos del queso fresco.

Cuadro No. 13 Determinación de la vida útil del queso fresco

Medición Día	Análisis Microbiológico	*T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	<i>E. Coli</i>	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
	<i>S. aureus</i>	120 UFC/g	10 UFC/g	10 UFC/g	< 1000 UFC/g	30 UFC/g	50 UFC/g	< 10 UFC/g
	<i>Salmonella</i>	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
	<i>Shigella</i>	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
	Mohos y Levaduras	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
31	<i>E. Coli</i>	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	>20000	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
	<i>S. aureus</i>	250 UFC/g	220 UFC/g	> 65000 UFC/g	510 UFC/g	> 65000 UFC/g	> 65000 UFC/g	< 380 UFC/g
	<i>Salmonella</i>	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
	<i>Shigella</i>	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
	Mohos y Levaduras	>30000 UFC/g	>30000 UFC/g	>30000 UFC/g	>30000 UFC/g	>30000 UFC/g	>30000 UFC/g	>30000 UFC/g

*T1 = Queso fresco blanco, T2 = Queso fresco con Sorbato de potasio, T3 = Queso fresco con aceite *L. guatemalensis*, T4= Queso fresco con infusión *L. guatemalensis*, T5=Queso fresco con extracto *L. guatemalensis*, T6 Queso fresco con infusión *L. neesiana*, T7 Queso fresco con extracto *L. neesiana*.

**Resultado Microbiológicos según Laboratorio de Control Microbiológico de la Universidad de San Carlos de Guatemala USAC.

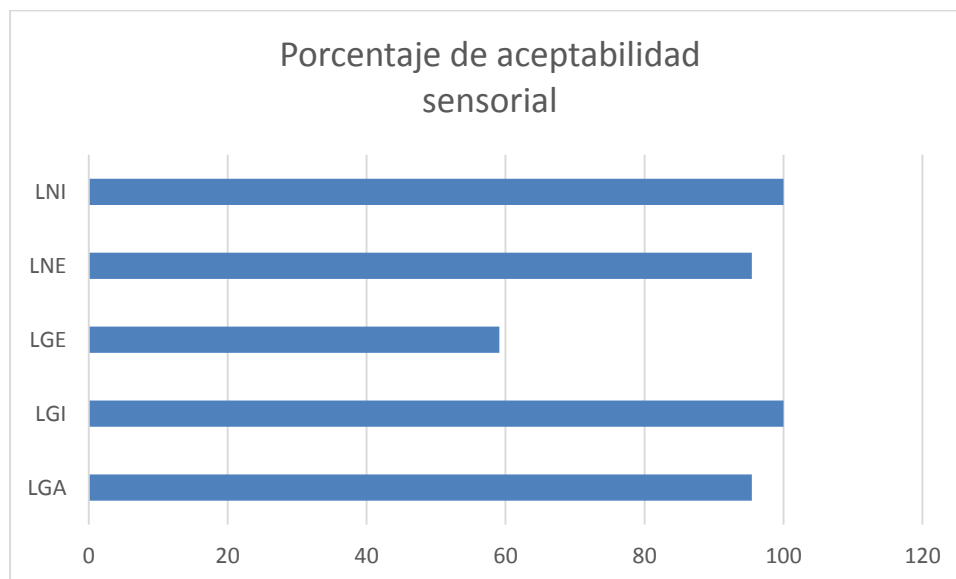
 Apto para el consumo humano
 No Apto para el consumo humano

Cuadro No. 14 Porcentaje de aceptabilidad del queso fresco con sus diferentes tratamientos

No.	Código	Quesos Frescos con Tratamientos	Porcentaje de aceptabilidad
T3	LGA	1 Lb. Queso fresco + 75 μ L de aceite esencial de <i>L. guatemalensis</i>	95
T4	LGI	1 Lb. Queso fresco + 2 g. de infusión de hojas de <i>L. guatemalensis</i>	100
T5	LGE	1 Lb. Queso fresco + 1 g. de extracto de <i>L. guatemalensis</i>	59
T6	LNE	1 Lb. Queso fresco + 1 g. de extracto de <i>L. neesiana</i>	95
T7	LNI	1 Lb. Queso fresco + 2 g. de infusión de hojas <i>L. neesiana</i>	100

Fuente: Datos experimentales

Gráfica No. 1 Porcentaje de aceptabilidad sensorial del queso fresco con sus diferentes tratamientos



Fuente: Datos experimentales

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con el anexo 1, cuadro No.1 el origen de las hojas de las especies de laurel *L. guatemalensis* y *L. neesiana*, la primera por ser una especie comercial fue adquirida en la distribuidora Juanitas; la especie *L. neesiana* fue recolectada en el ladero del volcán de Acatenango. El cual se ubica entre los municipios de San Miguel Dueñas y Antigua Guatemala cuyas coordenadas son: Altura de 2,795 msnm N 14° 31. 221' O 090° 52.670'. Ver Anexo 1 fotografía No. 1

Después de adquirir las hojas de las dos especies, se identificó cada especie con la ayuda de un biólogo quien es especialista en identificación de plantas. En el anexo No. 2 cuadro No. 2 describe los ensayos fisicoquímicos que se realizaron a las dos especies de hojas de laurel para su control de calidad. El primero de ellos es materia extraña, seguido el porcentaje de humedad para dichas especies de laurel es mayor al 10% por lo que se sometió a dichas drogas a un horno de convección forzada a 40°C hasta que su humedad fuera menor del 10%, con el objetivo de disminuir el crecimiento de hongos, hidrólisis y por último la degradación de las hojas, los últimos ensayos realizados fueron cenizas totales y cenizas insolubles en ácido estos ensayos permitieron identificar que ambas especies de laurel no presentan adulteraciones ni contaminantes minerales debido a que los límites obtenidos para cenizas totales son menores al 5% y para cenizas insolubles son menores al 2% según (Solis *et al.*, 2005; Vila & Reing, 2003), éstas fueron determinadas por el método de la Farmacopea Europea.

Posterior a los ensayos fisicoquímicos de ambas especies de laurel en el anexo No. 3 cuadro No. 3 los resultados permitieron comparar y escoger la concentración idónea del solvente (Etanol) por medio del porcentaje de sólidos totales, con el objetivo de extraer la mayor concentración de metabolitos secundarios de las especies de hojas de laurel. Para la especie *L. guatemalensis* fue Etanol al 95% con un porcentaje de sólidos totales de 0.95 y la especie *L. neesiana* se utilizó Etanol al 50% con un porcentaje de sólidos de 0.90. Luego se procedió a la extracción por percolación en el cual se pesaron 200 gramos de las dos especies de hojas de laurel con un porcentaje de humedad menor del 10%, luego se le agregan 2000 mL. de etanol según la concentración del mejor solvente a cada especie y se dejó reposar por 24 horas, después de estas 24 horas se recolecta el menstuo para el proceso de concentración por medio de un rotaevaporador y

el solvente recolectado se deposita de nuevo en el percolador este procedimiento se repite tres veces hasta obtener un extracto seco. La especie con mayor rendimiento fue *L. guatemalensis* con 18.68% y 11.60% *L. neesiana*.

La extracción del aceite esencial de las especies de laurel se realizó por medio del método por arrastre de vapor, el rendimiento obtenido de la especie *L. guatemalensis* es de 1.01% y de *L. neesiana* es de 0.01%. Estos resultados concuerdan con los resultados reportados por (Cruz, 2012). Esta diferencia en porcentajes de rendimiento se debe a que la especie de *L. guatemalensis* es más aromática que la especie *L. neesiana*.

Para determinar la diferencia entre compuestos de las dos especies de laurel en estudio se realizó una caracterización química por medio del método de microextracción en fase sólida (fibra) por cromatografía de gases, aplicando las especificaciones de tipo de columna y rampa de temperatura del método de Adams, descrito en la sección de materiales y métodos. En el cuadro No. 2 se observa que existe una variación entre el índice de Kovats teórico con el experimental, esto se debe a que no se inyectó el aceite puro de ambas especies. Por este método se identificaron ocho compuestos para la especie *L. guatemalensis* y tres para *L. neesiana*. Los compuestos comunes para ambas especies son γ -terpineno y β -pineno. *L. neesiana* difiere de la otra especie porque presenta menos compuestos, por lo tanto, el aroma de esta especie es muy baja comparado con el aroma característico de *L. guatemalensis*.

La variación que existe Según (Jiménez et.al, 2011) en su estudio titulado: Aceites esenciales de laureles mexicanos (*Litsea spp.*, *Lauraceae*): Distribución taxonómica e implicaciones etnobotánicas indica que los terpenoides comunes en todas las especies estudiadas de *Litsea* fueron: 1,8-cineol, linalool, α -pineno, β -pineno, m-cimeno, terpinen-4-ol, α -terpineol, cariofileno y óxido de cariofileno, sin embargo, cada una de las siete especies puede distinguirse por un perfil característico de terpenoides. A este respecto, las especies *L. guatemalensis* y *L. neesiana* son ricas en eucaliptol y limoneno respectivamente. Los compuestos comunes para ambas especies, mencionados anteriormente coinciden con los resultados de esta investigación, como se puede observar en los cromatogramas de ambas especies en el anexo No. 6.

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó el extracto etanólico de las dos especies en estudio y el aceite esencial de la especie *L. guatemalensis* según el cuadro

No.1 se realizaron dos tipos de análisis un cualitativo y otro cuantitativo, en el primer análisis se realizó una cromatografía en capa fina utilizando como revelador del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) este método se analizó según la intensidad de decoloración del radical DPPH por lo tanto la especie que presentó mayor actividad antioxidante es *L. neesiana*. El análisis cuantitativo se evaluó por medio del método micrométrico con revelador DPPH, utilizando los extractos de ambas especies de laurel, para determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}), como se observa en el cuadro No.1 el extracto que presentó mayor actividad antioxidante por tener CI_{50} de 0.290 ± 0.01 es la especie *L. neesiana* al compararlo con la especie *L. guatemalensis* que presentó un CI_{50} 0.675 ± 0.009 . Las muestras difieren de los estándares por que no superan la actividad antioxidante de los mismos, el mejor estándar es la Quercitina con un CI_{50} 0.07496 ± 0.0004 . Ver anexo No. 5 Ver fotografía No. 5.

Los datos que se observan en el cuadro No. 3 son los resultados de las cinco repeticiones en diferentes concentraciones de las infusiones de las dos especies de laurel en estudio, donde se determinó que las infusiones no presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias más frecuentes en el queso fresco. Ver imagen en anexo No. 7 fotografía No. 7.

El cuadro No. 4 describe las concentraciones inhibitorias mínimas CIM de las dos especies de laurel, para el extracto etanólico de *L. neesiana* son: *Staphylococcus aureus* (0.625 mg/mL.), *Escherichia coli* (2.5 mg/mL.), *Salmonella* (5 mg/mL.). Para la especie *L. guatemalensis* son: *Staphylococcus aureus* (1.25 mg/mL.), *Escherichia coli* (1.25 mg/mL.), *Salmonella* (5 mg/mL.) pero ambas especies no presentaron actividad contra *Shigella*. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Cruz en 2008, en dicho estudio el extracto etanólico de *L. guatemalensis* presentó actividad contra *M. smegmatis* a una concentración de 0.25 mg/mL, *S. aureus* y *S. typhi* a 1 mg/mL.

Por lo antes descrito, estadísticamente cada una de las concentraciones tienen un nivel de significancia de (α) 0.05 con lo se concluye que los extractos etanólicos de ambas especies si tienen una actividad bactericida.

El cuadro No. 5 describe que el aceite esencial de la especie de laurel *L. guatemalensis* no presenta ninguna actividad antimicrobiana contra las siguientes bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* y *Shigella*. Ver anexo No 7 fotografía No. 8

Los cuadros del No. 6 al No. 12 describen las características organolépticas como es el sabor, olor, color, textura de cada queso fresco con los diferentes tratamientos, el primero de ellos es queso fresco sin ningún tratamiento (blanco), luego queso fresco con preservante químico Sorbato de Potasio (control), el tercer queso fresco con Aceite esencial de laurel *L. guatemalensis*, cuarto queso fresco con infusión de hojas de laurel *L. guatemalensis*, quinto queso fresco con extracto etanólico al 95% *L. guatemalensis*, sexto queso fresco con infusión de hojas de laurel *L. neesiana* y por último queso fresco con extracto etanólico al 50% *L. neesiana*. Esta prueba se realizó con el objetivo de evaluar el tiempo en cada uno de los tratamientos anteriores preservan las características organolépticas del queso fresco.

De acuerdo con el cuadro No. 13 se observa el comportamiento de la inhibición del crecimiento bacteriano para evaluar la vida útil de cada uno de los tratamientos del queso fresco antes descritos. Los tratamientos 3, 4, 5 y 6 no son aptos para el consumo a partir del día 31 por presentar >65000 UFC/g de *S. aureus*. Los tratamientos 1,2 y 7 para el día 31 son aptos para el consumo humano.

Al comparar el T2 (Queso fresco son Sorbato de potasio) con el T7 (Queso fresco con extracto de *L. neesiana*) en el día 31, se observa que el T7 es el prototipo idóneo como preservante natural por que la concentración de *E. coli* para ambos es igual con <10 UFC/g, difieren en la concentración de *S. aureus* de 220 UFC/g a <380 UFC/g por lo tanto estos valores son aptos para el consumo humano.

El tratamiento menos efectivo como preservante del queso fresco es el T4 (Queso fresco con infusión de *L. guatemalensis*) por presentar un crecimiento tanto en el día 1 como el día 31 de *S. aureus*.

Para la prueba de aceptabilidad de los quesos frescos con los diferentes tratamientos se estandarizó el método de presentación de las muestras el cual es importante para que cada uno de los panelistas reciba una porción representativa de los

quesos frescos y como se observa en el anexo No. 9 fotografía No. 11 a cada panelista se le ofreció en cinco cucharas plásticas con un código las muestras de los quesos frescos con los diferentes tratamientos y para limpiarse el paladar después de degustar dos muestras de queso agua pura y galletas soda. Para puntaje obtenido de cada queso se le dio una cartilla con caras para evaluar el grado de aceptabilidad de cada uno de los quesos. Ver Anexo 9 fotografía No. 10. El cuadro No. 14 describe los resultados obtenidos de 30 panelistas con una edad promedio de 25 años en su mayoría de sexo femenino. El análisis estadístico que se aplicó a las respuestas obtenidas por los panelista es una escala ordinal por medio de la prueba de Friedman.

Por lo que se observa en la gráfica No. 1 que los quesos que obtuvieron mayor aceptabilidad fueron los quesos con infusión de hojas y el menos consumido es el queso fresco con extracto de *L. guatemalensis*. Esto se dió debido a la cantidad de extracto añadido al queso fresco y por presentar un sabor potente a laurel.

10. CONCLUSIONES

10.1 El extracto etanólico *L. neesiana* presentó mayor actividad antioxidante con un (CI₅₀ de 0.290 mg/mL) comparada con la especie *L. guatemalensis* (CI₅₀ de 0.675 mg/mL).

10.2 El porcentaje de rendimiento del aceite esencial de la especie *L. guatemalensis* es de 1.01%, detectándose un total de ocho compuestos, siendo el mayoritario el Eucaliptol; para *L. neesiana* se reportó un porcentaje de rendimiento 0.01%, presentando tres compuestos, siendo el mayoritario el D-limoneno. El γ -terpineno y β -pineno son componentes comunes de ambas especies y coinciden con lo descrito en la literatura.

10.3 La infusión de las hojas de laurel de ambas especies y el aceite esencial *L. guatemalensis* no presentaron ninguna actividad antimicrobiana.

10.4 El extracto etanólico de la especie *L. neesiana* presentó una concentración inhibitoria mínima CIM frente a las siguientes bacterias: *S. aureus* (0.625mg/mL), *E. coli* (2.5mg/mL), y *Salmonella* (5mg/mL).

10.5 El extracto etanólico de la especie *L. guatemalensis* presentó una concentración inhibitoria mínima CIM frente a las siguientes bacterias: *S. aureus* (1.25mg/L), *E. coli* (1.25mg/L), y *Salmonella* (5mg/L).

10.6 La mejor forma de preservar el queso fresco pasteurizado es con el extracto etanólico de laurel *L. neesiana* ya que no interfiere con las características organolépticas del queso fresco e inhibe el crecimiento bacteriano del mismo.

10.7 Las infusiones de ambas especies de laurel en el queso fresco presentaron un porcentaje de aceptabilidad del 100%, seguido el aceite esencial de *L. guatemalensis*. El extracto etanólico de *L. neesiana* con un 95% el extracto con *L. guatemalensis* presentó bajo puntaje bajo debido al sabor potente de laurel el cual cambiaba las características organolépticas del queso fresco

11. RECOMENDACIONES

11.1 Utilizar como máximo la proporción de 0.50 mg del extracto de laurel *L. guatemalensis* por libra de queso fresco producido, para obtener un buen sabor, color y olor.

11.2 Realizar estudios de mercado para el queso fresco con laurel ya sea como extracto, aceite esencial o infusión de hojas y de esta forma identificar los diferentes estratos sociales y visualizar hacia quiénes puede ir dirigida esta tecnología en la elaboración de quesos frescos condimentados.

11.3 Evaluar la factibilidad del extracto de laurel *L. neesiana* en un producto cosmético para aprovechar su uso como antioxidante debido a su liposolubilidad.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alais CH. 1984. Ciencia de la Leche. Editorial Continental. 5ta Edición. México DF, p.46-50.
- Astiasarán, Iciar y Martínez Alfaro. 1999. Alimentos: Composición y Propiedades. Primera edición. McGraw-Hill Interamericana. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. España. Pp. 108 – 115.
- Bandoni, Arnoldo. 2003. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Segunda edición. Argentina, pp. 19-21, 27-31, 136-138, 141-144, 181-191, 209.
- Benenson, AS. 2000. Manual de lucha contra las enfermedades trasmisibles. 16ª Edición. México: editorial American Public Health Association.
- Cáceres, A; et al. 1998 Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. J. Ethnopharmacol. 62: 195-202.
- Cáceres, A. 1996 Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cáceres, A. 1998 Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Castillo Roberto. 1993 “Determinación en Cremas y Quesos no Madurados de Coliformes y *Staphylococcus aureus*, Basándose en las Normas COGUANOR vigentes”. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Biológica. Pp. 1-26.

Codex Alimentarius. Guatemala. Normas Generales para el Queso. Codex STAN A-6 y 221-2001.

Código de Salud. Decreto 90-97. Congreso de la República de Guatemala. Guatemala Centroamérica. 2,001.

Comisión de Normas de Venezuela (COVENIN). Análisis de Quesos. II parte. Pp. 9 -13.

Compaire C. 1986. Quesos tecnología y control de calidad. Madrid: Publicaciones de Extensión. Argentina p.493.

Charley Helen. 1998 Tecnología de Alimentos: Procesos Químicos y Físicos en la Preparación de Alimentos. Sexta edición. Editorial Limusa. México. Pp. 411-434.

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

De León, L. 1999. Adaptación y transferencia de tecnología para mejorar la calidad sanitaria del queso artesanal en Guatemala. Guatemala. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).

European Pharmacopoeia . 2001 4Th Edition and supplementes. Strasbourg: Consil e L'Europe.

Flores Marina. 1971. Valor Nutritivo de los Alimentos para Centroamérica y Panamá. INCAP. Investigación Dietética-Nutrición Aplicada. Guatemala. Pp. 34 – 38.

Fox Brian y Cameron Allan. 1999 Ciencia de los Alimentos, Nutrición y Salud. Tercera edición. Editorial Limusa. México. Pp. 96-111.

García, Quintero y López. 1993 Biotecnología Alimentaria. Primera Edición. Editorial Limusa. México. Pp. 179-196.

Goded y Mur. 1954. Industrial Derivadas de la Leche. Primera edición. Editorial Salvat. Barcelona, España. Pp. 531-605.

Guenther, Ernest. 1996. The Essentials Oils. Editorial Van Nostrand. Estados Unidos, Vol. IV Pp. 207. Vol V. pp. 54.

Hernández I. 2007. Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio, de hoja de *Solanum Hatwegii Benth.* (Huiz), de hoja de *L. guatemalensis Mez.* (Laurel), y de hoja de *Piper jacquemontianum Kunth.* (Cordoncillo). Tesis de graduación de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Jiménez María, 1983. "Estudios del Efecto de la Adición de Peróxido y de Leche de Soya a Leche de Vaca sobre la Calidad del Queso Fresco". Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Nutrición. Pp. 2-47.

Jones, S. 1987 Sistema vegetal. México: McGrawHill.

Judkins Henry y Keener Harry. 1981 La Leche su Producción y Procesos Industriales. Editorial Continental. México. Pp. 400-411.

La Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). Tecnología y Control de Calidad de Productos Lácteos.

Lehninger AL. Principles of Biochemistry. Worth Publishers. New York. 199 Pp. 225 - 301.

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

Murria y Granner. Bioquímica de Harper. 13 edición. El Manual Moderno. 1,990. Pp. 112 – 115.

Parrilla Corza, P. 2002. A través de los sentidos. Revista Énfasis Alimentación Latinoamérica. Año VIII. Edición N° 3 Junio-Julio 2002

Potter Norman. 1978. La Ciencia de los Alimentos. Segunda edición. Editorial Harla. México. Pp. 408-429.

Reglamentos y Normas Emitidas por el Departamento de Regulación y Control de Alimentos de la Dirección General de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de la República de Guatemala.

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

Solis, PN. Etal. 1993. A microwell citotoxicity assay usin Artemia Salina (Brine Shrimp). Planta Med. 59:250-25

Tecnología de Quesos Frescos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Colombia.

Van Trijp, H.C.M; Schifferstein, H. N.J.. 1995. Sensory analysis in marketing practice: comparison and integration. J. Sens. Stud.10, 127-147

Vallverdú, C. *et al.* 2005. Composition of the essential oil from leaves of *Litsea guatemalensis*. Flavour and Fragrance Journal 20:415-41

13. ANEXO

Anexo No. 1

Cuadro No. 15 Recolección del material Vegetal

Código	Muestra	Fecha Colecta	Lugar de Colecta	Coordenadas	Identificación
LG	Hojas de <i>Litsea guatemalensis</i>	15.11.13	Distribuidora Juanitas	-----	Lic. Max Mérida
LN	Hojas de <i>Litsea neesiana</i>	12.03.14	Volcán Acatenango	N 14° 31. 221' O 090° 52.670' 2,795 msnm	Lic. Max Mérida

Fuente: Datos Experimentales.

Fotografía No.1 Recolecta de las hojas de de laurel *L. neesiana*.b. Identificación de la especie *L. neesiana*

a. Registro de las coordenadas por el Lic. en Biología Max Mérida

c. Corte de las hojas de laurel *L. neesiana*.d. Selección de las hojas de laurel *L. neesiana*

Anexo No. 2

Cuadro No. 16 Control de calidad de las dos especies de hojas de laurel

Código	Muestra	Materia Extraña	Porcentaje de Humedad	Cenizas totales	Cenizas ácidas
LG	<i>Litsea guatemalensis</i>	0	18	1.04 ± 0.03	1.38 ± 0.05
LN	<i>Litsea neesiana</i>	40	20	4.05 ± 0.02	3.25 ± 0.04

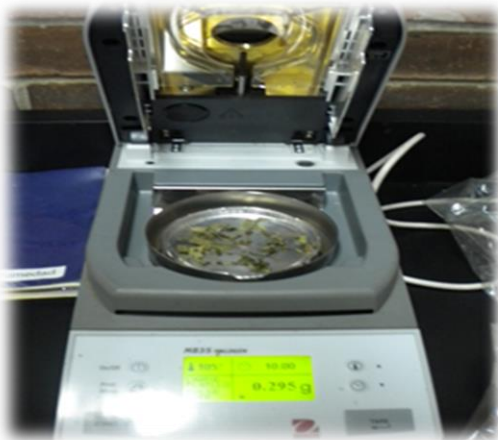
Fuente: Datos Experimentales

Fotografía No.2 Secado y tamizaje de las dos especies de hojas de laurel (*Litsea guatemalensis* y *Litsea neesiana*)

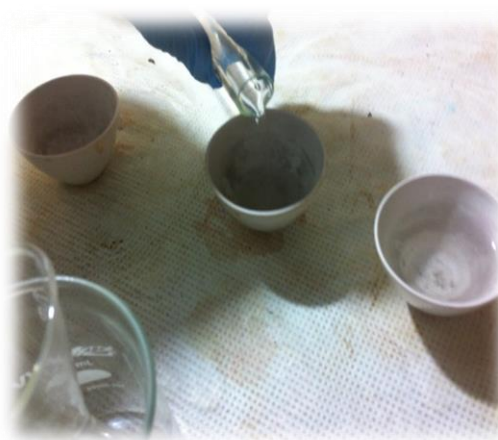
a. Selección de la droga vegetal para su posterior secado.



b. Desinfección con etanol al 70% de la droga vegetal.



c. Porcentaje de humedad de la droga vegetal.



d. Control de calidad, Prueba de cenizas totales.

Anexo No. 3

Cuadro No. 17 Prueba de mejor Solvente

Código	Muestra	Concentración de Etanol	% Sólidos Totales
LG	<i>Litsea guatemalensis</i>	50%	0.40
		70%	0.63
		95%	0.95
LN	<i>Litsea neesiana</i>	50%	0.90
		70%	0.74
		95%	0.38

Fuente: Datos Experimentales

Fotografía No.3 Prueba de mejor solvente

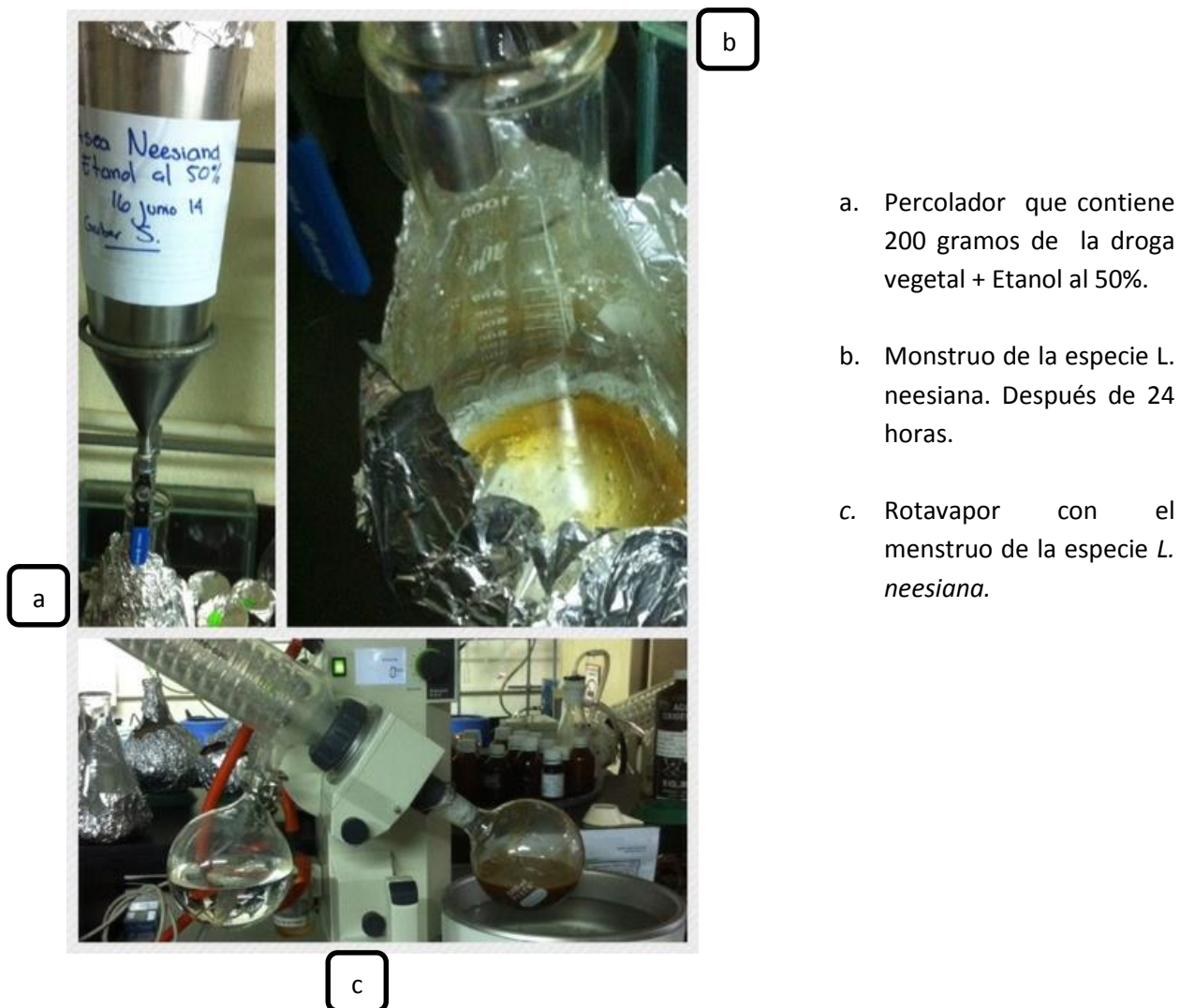


Anexo No. 4

Cuadro No. 18 Proceso de extracción por percolación, concentración por rotavapor y porcentaje de rendimiento del aceite esencial

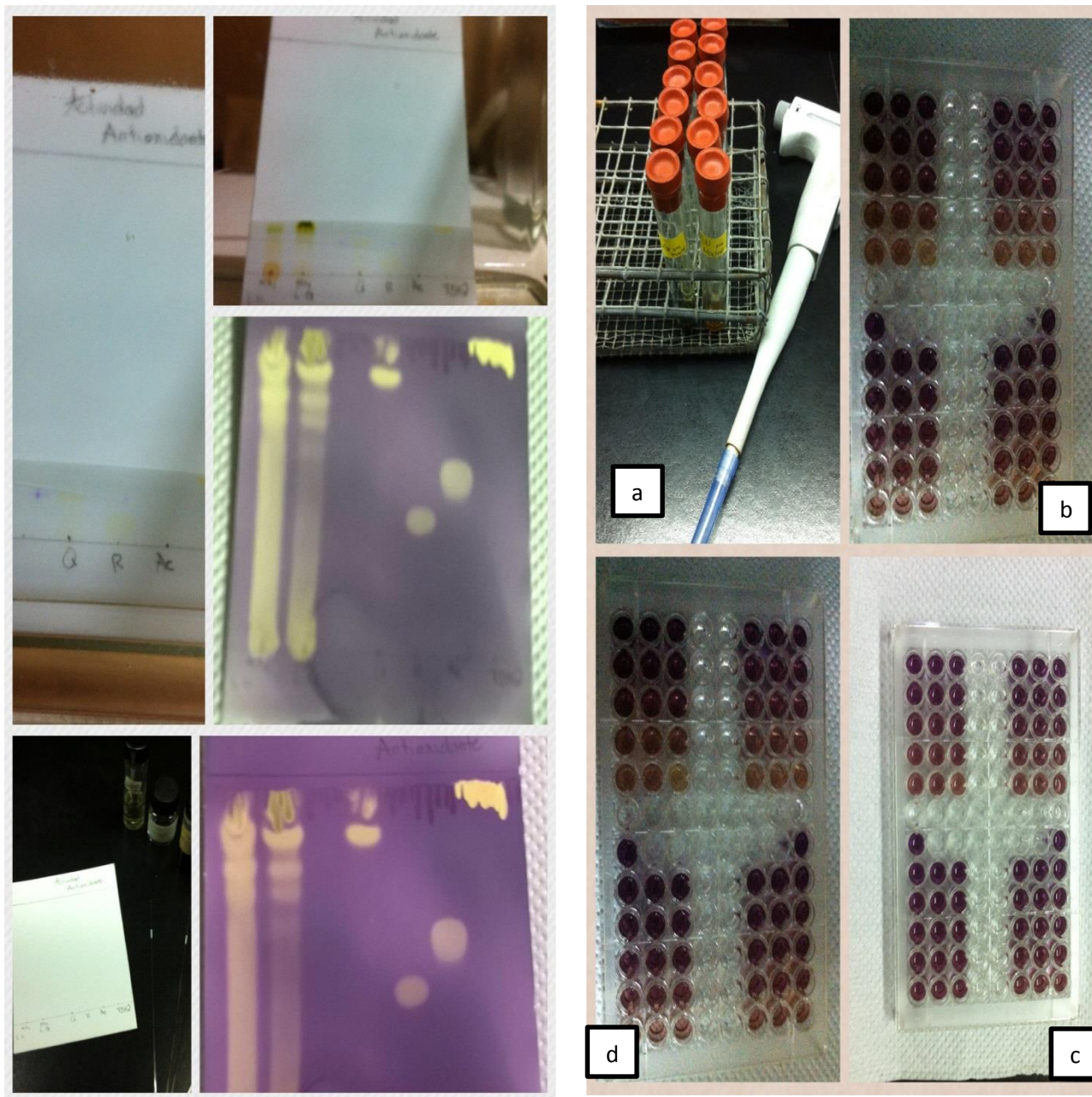
Código	Materia Vegetal (g)	Humedad de la droga vegetal (%)	Cantidad de Solvente (L)	Extracto seco (g)	Rendimiento de extracción (%)	Rendimiento de aceite (%)
LG	200	8	2 Etanol 95 %	37.36	18.68	1.01± 0.18
LN	200	7	2 Etanol 50 %	23.20	11.60	0.01±0.16

Fotografía No.4 Proceso de extracción por percolación y extracción de Aceite esencial



- Percolador que contiene 200 gramos de la droga vegetal + Etanol al 50%.
- Monstruo de la especie *L. neesiana*. Después de 24 horas.
- Rotavapor con el menstruo de la especie *L. neesiana*.

Anexo No. 5

Fotografía No. 5 Actividad antioxidante por medio del método cualitativo CCF y micrométrico

I. Determinación de la actividad antioxidante por medio del método cualitativo CCF utilizando como revelador DPPH. En esta prueba se observa como la banda de la especie *L. neesiana* presenta mayor actividad antioxidante frente a la especie *L. guatemalensis*.

II. Determinación de la actividad antioxidante por medio del método micrométrico.

- a. Preparación de las disoluciones.
- b. Servir cada una de las disoluciones en la placa de 96 pozos con fondo plano.
- c. Esperar por 30 minutos para el revelador DPPH reaccione con las muestras.

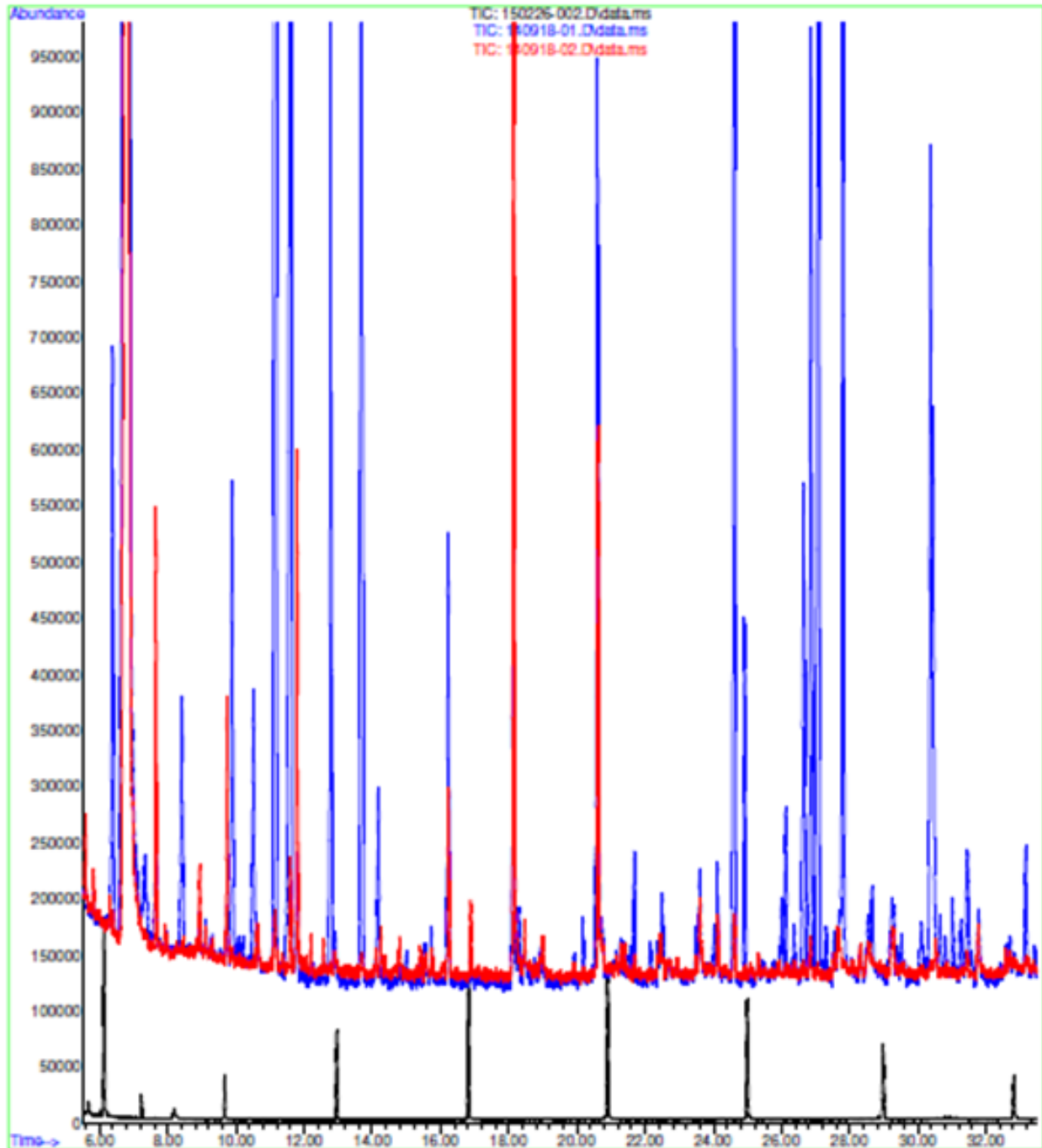
Anexo No. 6




Caracterización química de dos especies de hojas de laurel por medio del método de microextracción en fase sólida (Fibra) por cromatografía de gases

Fotografía No. 6 Método de microextracción en fase sólida (Fibra) por cromatografía de gases



Imagen No. 3 Sobre posición de las dos especies de laurel y estándar de alcanos.



 *L. guatemalensis*
 *L. neesiana*
 Estándar

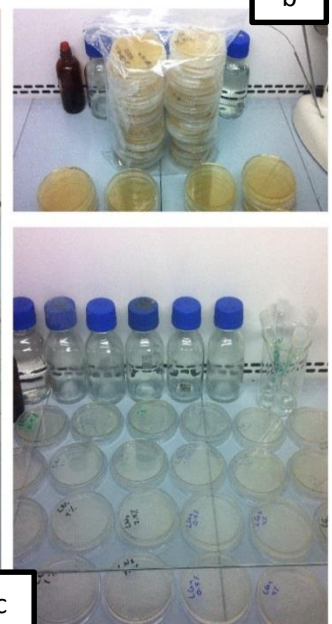
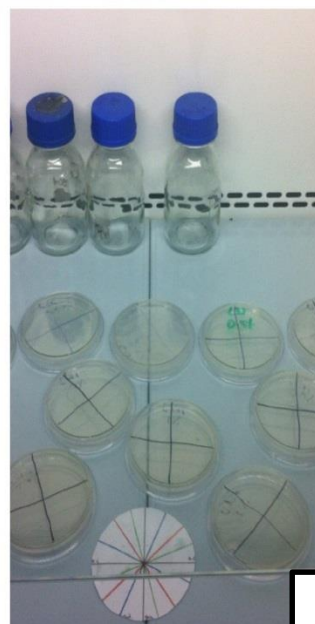
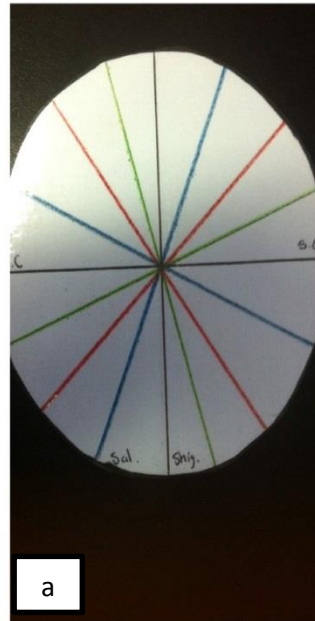
Anexo No. 7

Actividad in vitro de la dos especies de laurel

Fotografía No. 7 Activación de bacterias y evaluación microbiológica del extracto e infusión de laurel *Litsea guatemalensis* y *Litsea neesiana*.

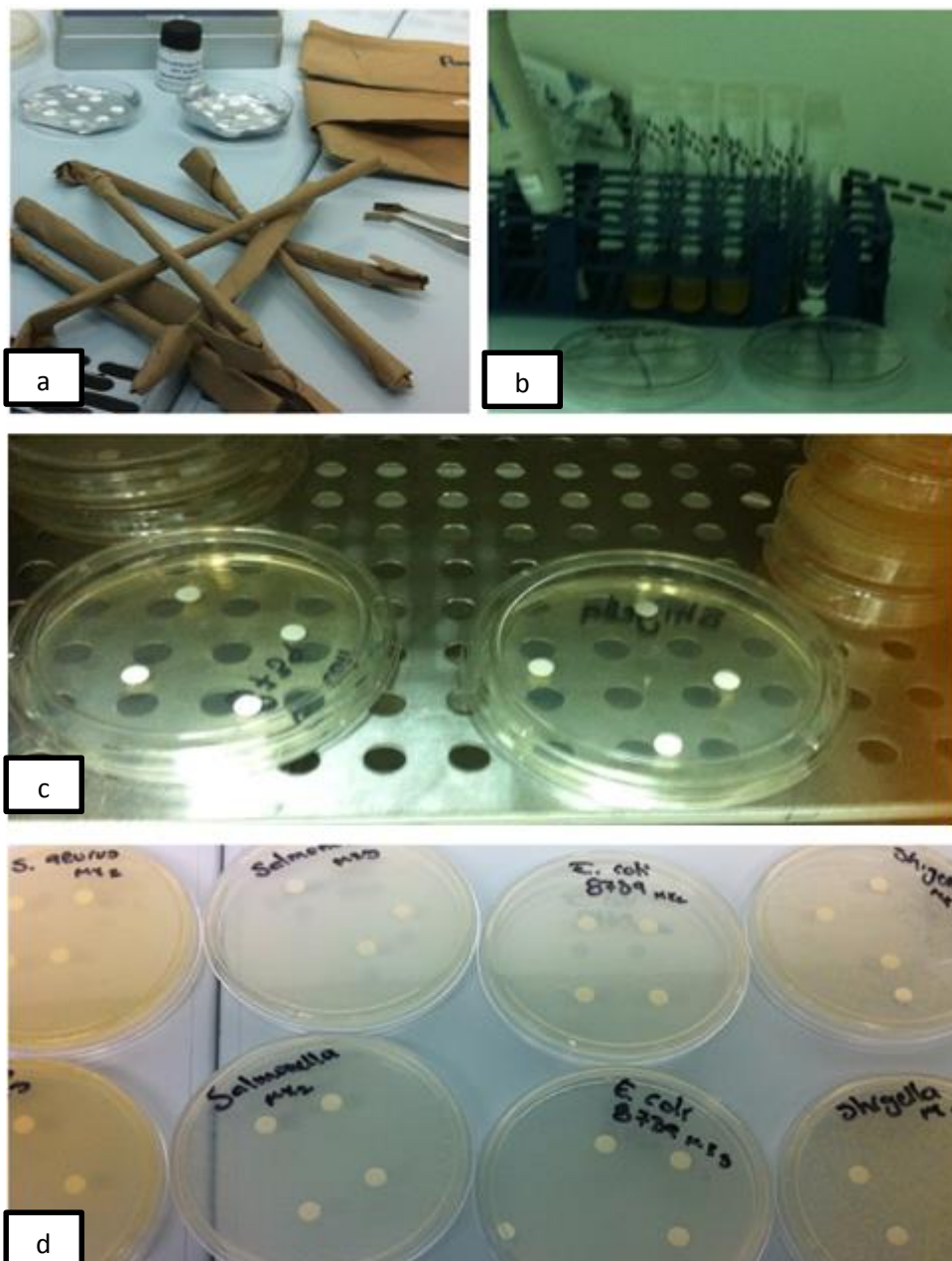


- Preparación del agar.
- Prueba de esterilidad de los agares por 24 hrs a 37°C en una cámara incubadora.
- Inoculación de la bacterias y esperar 24 horas para su crecimiento.



- Disco identificador de bacterias en estudio.
- Preparación del área y medios para su posterior inoculación de las bacterias.
- Identificación e inoculación de las bacterias.

Fotografía No. 8 Evaluación de la actividad *in vitro* del aceite esencial de *L. guatemalensis*



- Esterilización y preparación de los taxos con 10 μ L de aceite esencial *L. guatemalensis*.
- identificación e inoculación de las bacterias en las cajas de Petri para luego poner los taxos .
- Incubación por 24 horas de las cajas de Petri.
- Después de 24 horas se evaluó el resultado y no existe ningún halo de inhibición por lo que la prueba nos indica que el aceite esencial a esta concentración no tiene actividad antimicrobiana.

Anexo No. 8 Manufactura del queso fresco






Fotografía No. 9 Manufactura del queso fresco

- a. Lavado de las pesuñas de las vacas.
- b. Desinfección de las ubres de la vaca.
- c. Conectores de leche
- d. Sistema semi automático del ordeño de leche.
- e. Ordeño manual para eliminar el residuo de leche que quedo del ordeño semi automático para evitar mastitis.



- a. Ingredientes.
- b. Pasteurización de la leche.
- c. 30 minutos de espera para que se cuaje la leche.
- d. Corte de la cuajada.
- e. Separación del suero y el queso.
- f. Producto terminado.

Fotografía No. 10 Cartilla de evaluación de aceptabilidad del queso fresco

PRUEBA ORGANOLÉPTICA QUESO FRESCO		No. CÓDIGO
INSTRUCCIONES: Se le presentan varias muestras de queso fresco las cuales están identificadas con códigos, los cuales deberá escribir dentro del paréntesis y luego degustar cada una de las muestras y marcar con una X en la silueta que crea conveniente según su gusto.		
SEXO: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>		EDAD: _____
SABOR		
Me disgusta mucho MDM		
Me disgusta MD		
No me disgusta NMD		
Me gusta MG		
Me gusta Mucho MGM		
ACEPTABILIDAD		
Consumiría usted este tipo de queso fresco? SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		

Fotografía No. 11 Evaluación Organoléptica del queso fresco



I. Preparación de las muestras de queso para la evaluación organoléptica.

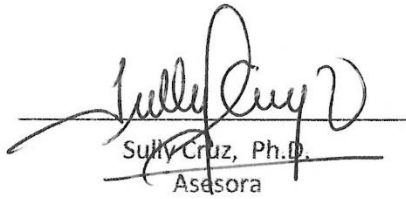
II. Evaluación organoléptica del queso fresco con los diferentes tratamientos con estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Fotografía No. 12 Análisis de durabilidad del queso fresco con tratamientos

- a. Día No. 1 se evaluó las características organolépticas y microbiológicas del queso fresco con diferentes tratamientos.
- b. Día No. 8 se observó un cambio de color pero sus características organolépticas y microbiológicas son aceptables.
- c. Día 16 cambio en la acidez pero sus características microbiológicas son aceptables.
- d. Día 24 las características organolépticas en algunos tratamientos cambiaron en cuanto a la acidez y apariencia.



Gerber Antonio Solorzano Campos
Autor



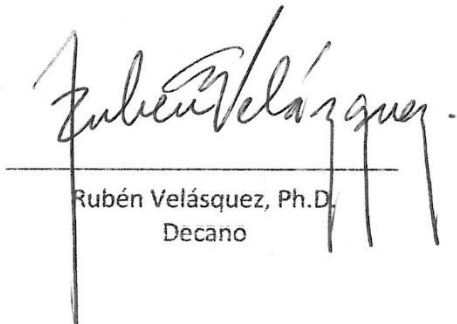
Sully Cruz, Ph.D.
Asesora



Licda. Julia García
Revisora



Licda. Gloria Navas
Directora de Escuela



Rubén Velásquez, Ph.D.
Decano