



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y
CITOTÓXICAS DE EXTRACTOS ORGÁNICOS
OBTENIDOS DEL LAUREL AROMÁTICO (*Litsea
glaucescens*)**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

Presenta:

VERONICA VIRGINIA TEPIXTLE COLOHUA

Bajo la supervisión de:

DR. BENITO REYES TREJO



Chapingo, Texcoco Estado de México

Mayo de 2022



APROBADA

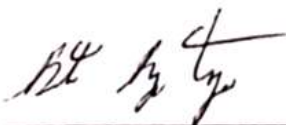


**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y CITOTÓXICAS DE
EXTRACTOS ORGÁNICOS OBTENIDOS DEL LAUREL AROMÁTICO (*Litsea
glaucescens*)**

Tesis realizada por **VERONICA VIRGINIA TEPIXTLE COLOHUA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

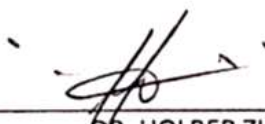
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR:



DR. HOLBER ZULETA PRADA

ASESOR:



DRA. MA. AMPARO MÁXIMA BORJA DE LA ROSA

CONTENIDO

PÀGINA

LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS EMPLEADAS	VI
DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTOS	VIII
RESUMEN GENERAL	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	3
1.2. Justificación	4
1.3. Planteamiento del problema	5
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo general	7
2.2. Objetivo particular	7
3. REVISION DE LITERATURA	8
3.1. Antecedentes Nacionales e internacionales	8
3.2. Ámbito legal del uso de plantas medicinales	9
3.3. Principios teóricos	10
3.4. Bases teóricas del Laurel (<i>Litsea glaucescens</i>)	11
3.4.1. Descripción	11
3.4.2. Información taxonómica	13
3.4.3. Nombre común	13
3.4.4. Distribución	13
3.4.5. Usos de <i>Litsea glaucescens</i>	16
3.5. Metodologías presentes en el trabajo de investigación	20
3.5.1. Las plantas medicinales	20
3.5.2. Métodos de extracción de componentes activos	21

3.5.3.	Aceites esenciales.....	21
3.5.4.	Resonancia magnética nuclear	21
3.5.5.	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	22
3.5.6.	Actividad antioxidante	22
3.5.7.	Ensayo ABTS	22
3.5.8.	Ensayo FRAP	23
3.5.9.	Actividad Citotóxica	23
3.5.10.	Pruebas de Artemia salina	23
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1.	Descripción del área de estudio.	25
4.2.	Recolección de la planta.....	26
4.3.	Aceite esencial de laurel aromático	27
4.4.	Determinación de espectros de RMN	29
4.5.	Métodos para la determinación de actividad antioxidante	29
4.6.	Método para la evaluación citotóxica.....	34
4.7.	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas	37
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
5.1.	Rendimiento de extracto	38
5.2.	Análisis por Resonancia Magnética Nuclear	40
5.3.	Capacidad Antioxidante de laurel aromático	46
5.4.	Determinación de la citotoxicidad del aceite esencial	48
6.	CONCLUSIONES	58
7.	LITERATURA CITADA	60
8.	APÉNDICES	75

LISTA DE CUADROS

PÀGINA

Cuadro 1. Información Taxonómica de <i>Litsea glaucescens</i>	13
Cuadro 2. Especies asociadas a laurel aromático (<i>L. glaucescens</i>) según el tipo de vegetación donde se desarrolla.	15
Cuadro 3. Usos medicinales de laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i>) en México.....	17
Cuadro 4. Coordenadas de los sitios de muestreo realizadas al Ejido "El Nopalillo". ..	27
Cuadro 5. Aforo de las alícuotas necesarias	30
Cuadro 6. Diluciones de las muestras de aceite esencial con Propanol.....	31
Cuadro 7. Alicuotas para determinar la curva de Trolox.....	33
Cuadro 8. Clasificación de toxicidad empleada en el trabajo.	36
Cuadro 9. Método para el análisis de muestras en equipo de Cromatografía de gases acoplado a masas	37
Cuadro 10. Rendimiento en porcentaje del aceite esencial de laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i>).....	38
Cuadro 11. Capacidad antioxidante del aceite esencial de laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i>).....	47
Cuadro 12. Evaluación de la toxicidad (CL50) de extractos <i>Litsea glaucescens</i> mediante el modelo de <i>Artemia salina</i>	49
Cuadro 13. Estudios citotóxicos con el ensayo de <i>Artemia salina</i> en especies de la familia laurácea.....	51
Cuadro 14. Composición de aceites esenciales de laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i>).....	54
Cuadro 15. Composición de aceites esenciales de laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i>) en muestra Zongolica Ver.	56

LISTA DE FIGURAS

PÀGINA

Figura 1. Inflorescencias de Laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i> Kunth).....	12
Figura 2. Mapa de distribución ecológica en México de <i>Litsea glaucescens</i>	14
Figura 3. Mapa de ubicación del ejido "El Nopalillo", Epazoyucan Hidalgo.....	26
Figura 4. Muestras obtenidas para el estudio: A) Chignahuapan, Pue., B) Nopalillo, C) Zongolica, Ver., D) tienda naturista "Los cedros, E) centro comercial "Soriana", Tex, F) Mercado Texcoco Centro, G) San Andrés Metla, Mex., H) Mercado Salitrería, Tex., Mex., I) tienda naturista "Yerberero Antigüita".	28
Figura 5. Espectrómetro de RMN de 400 MHz Agilent DD2 disponible en el Laboratorio de Productos Naturales UACH.	29
Figura 6. Configuración del ensayo ABTS ⁺ en la microplaca.....	32
Figura 7. Configuración del ensayo FRAP en la microplaca.....	34
Figura 8. Eclosión de larvas de <i>Artemia salina</i> por 24 horas e incubación de larvas en equipo Incubadora de mesa con agitación orbital modelo INO 650M.	36
Figura 9. Cromatografo de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas disponible en el Laboratorio de Productos Naturales UACH.	37
Figura 10. Estructura molecular de los metabolitos secundarios más abundantes aislados de laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i>).	40
Figura 11. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H (Trazo inferior) y ¹³ C (Trazo superior) del o-cimeno 1 (RMN ¹ H 300 MHz y ¹³ C 75 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	41
Figura 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H (Trazo inferior) y ¹³ C (Trazo superior) del eucaliptol 2 (RMN ¹ H 300 MHz y ¹³ C 75 MHz, CDCl ₃ , TMS).	42
Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H (Trazo inferior) y ¹³ C (Trazo superior) del terpinen-4-ol 3 (RMN ¹ H 300 MHz y ¹³ C 75 MHz, CDCl ₃ , TMS). 42	
Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H (Trazo inferior) y ¹³ C (Trazo superior) de s-carvona 4 (RMN ¹ H 300MHz y ¹³ C 75 MHz, CDCl ₃ , TMS).....	42

Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Trazo inferior) y ^{13}C (Trazo superior) de del aceite de eucalipto dólar (RMN ^1H 400MHz y ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , TMS).....	43
Figura 16. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , TMS) de los aceites esenciales de eucalipto dólar (trazo inferior), de laurel de Chignahuapan, Puebla (Trazo intermedio) y de laurel del Mercado Centro de Texcoco, México (Trazo superior)	44
Figura 17. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , TMS) de los aceites esenciales de eucalipto dólar (trazo inferior), de laurel de Salitrería, Texcoco (Trazo intermedio) y de laurel de El Nopalillo, Oyamel, Epazoyucan, Edo de Hidalgo (Trazo superior).....	45
Figura 18. Expansiones de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN- ^1H 400 MHz, CDCl_3 , TMS) del aceite esencial de El Nopalillo, Epazoyucan, Hidalgo (trazo inferior), y del publicado por la empresa Sigma-Aldrich, (RMN- ^1H 300 MHz, CDCl_3 , TMS) para o-cimeno 1 , (Trazo superior).....	46

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABTS:	ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfónico
CA:	Capacidad antioxidante
CL50:	Concentración letal media
ET:	Equivalentes de Trolox
FRAP:	Poder antioxidante reductor férrico
IK:	Índice de Kovats
MeOH:	Metanol
mL:	Mililitro
RMN:	Resonancia magnética nuclear
RMN 13C:	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN 1H:	Resonancia Magnética Nuclear de hidrogeno (protón).
TROLOX:	Análogo de la vitamina E
µmol ET/µL	Microgramos equivalentes de Trolox por microlitro
µmol ET/mL	Microgramos equivalentes de Trolox por mililitro

DEDICATORIA

A mi esposo José Ignacio Martínez Olaya

Por su paciencia, motivación y perseverancia en cada etapa juntos. Por ser parte una inspiración. Gracias por el gran apoyo.

Mi hija Samara Yali Martínez Tepixtle

Por ser el motivo de mejorar como persona cada día, cada esfuerzo es motivada por tu hermosa sonrisa. ¡Te amo muchísimo Sam!

A mis padres Natalia Colohua y Federico Tepixtle

Por su confianza, valores y por ser un ejemplo de fortaleza.

A mis hermanos Everardo Tepixtle e Israel Tepixtle

Por su apoyo incondicional, consejos, amistad y amor. Son los mejores hermanos, siempre nos apoyamos y nos cuidamos.

A mis suegros Obdulia y Darío

Por su apoyo incondicional y su motivación en muchas partes de mi vida

A mis amigos:

Edwin Bautista, Alma Betancio, Norma Cecilia Morales, Jorge Luis Pizeno, María Hernández, Avelina García, Nicodemus Velazco, Diana Tepixtle, Galdino Namigtle y Miriam Rojas que siempre creyeron en mí y me motivaron en cada momento.

A mis maestros de la universidad

En especial al Profesor **Ismael García (†)** que, en este andar por la vida, influyó en mi forma de ver la vida, que más que un profesor siempre será mi amigo, tomaré en cuenta cada consejo otorgado, siempre lo recordaré como la persona que cambio la dirección de vida.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta investigación ha sido posible gracias al apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A la Universidad Autónoma Chapingo, y a la División de Ciencias Forestales por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente, la infraestructura, materiales y equipo para llevar a cabo el proyecto.

Al Departamento de Preparatoria Agrícola, Área de química y al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme la infraestructura, materiales y apoyo del equipo que colaboró con la realización de la investigación.

Al Dr. Benito Reyes Trejo, por su apoyo en la dirección, revisión, observaciones y recomendaciones, así como sus conocimientos brindados en este proyecto de investigación.

Al Dr. Holber Zuleta Prada por el apoyo en la revisión, observación y asesoría del proyecto.

A la Dra. MA. Amparo Máxima Borja de la Rosa en la revisión y asesoría en este proyecto.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez, por su conocimiento brindado y su apoyo en el proyecto de investigación.

A la Dra. Ma. Rosa González Tepale, por su apoyo y conocimiento brindado en el proyecto.

Al Dr. Felipe Reyes Fuentes y al ejido “El Nopalillo”, Epazoyucan Hidalgo por el acceso a las áreas de muestreo y el material analizado.

Al núcleo de profesores de la maestría en Ciencias en Ciencias Forestales y del Departamento de Ingeniería Agroindustrial, por todos sus conocimientos brindados.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre:	Veronica Virginia Tepixtle Colohua
Fecha de nacimiento:	3 de febrero de 1995
Lugar de nacimiento:	Cotlaixco, Zongolica, Veracruz
CURP:	TECV950203MVZPLR06
Profesión:	Ingeniero Forestal
Cédula profesional:	12090117

Desarrollo académico

Bachillerato: Telebachillerato Palenque Cotlaixco, Clave: 30ETH03700, Ubicados en: Palenque Cotlaixco estado de Veracruz. Periodo: 2010-2013.

Licenciatura: Licenciatura en Ingeniería Forestal. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco de Mora, Estado de México. Periodo 2014-2018.

RESUMEN GENERAL

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y CITOTÓXICAS DE EXTRACTOS ORGÁNICOS OBTENIDOS DEL LAUREL AROMÁTICO (*Litsea glaucescens*)

El laurel aromático (*Litsea glaucescens*) es una especie forestal no maderable (PFNM) aprovechada ampliamente en México. Actualmente se encuentra registrado en la Norma Oficial Mexicana la NOM-059- SEMARNAT- 2019, con la categoría de P (en peligro de extinción). Este trabajo compara la actividad biológica y la composición química de los extractos de las hojas de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) obtenidas durante los años 2020 y 2021.

Los resultados mostraron un rendimiento 1.43% a 0.27%, aún más alto que lo reportado por algunos autores. El equipo de RMN refleja señales principalmente de eucaliptol situadas en 73.5 y 69.6 ppm. La capacidad antioxidante analizada por el método ABTS se encuentra entre 12.89 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$ y 4.99 $\text{ET}/\mu\text{L}$, mientras que con el método FRAP oscila entre los 0.17149 a 0.00682 $\mu\text{mol ET}/\text{mL}$. La prueba de *Artemia salina* para medir la capacidad citotóxica mostró un CL_{50} de 53.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 451.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con categoría de alta toxicidad y moderada toxicidad. El análisis en Cromatografía de gases evidenció principalmente los siguientes compuestos: 34.99 % de Eucaliptol (1,8-cineol), 7.45% de 1R- α -Pineno, 6.51% de L-Limoneno, 5.26 % de trans-dihidrocarvona, 4.62% de (-)- β -Pineno, 4.46 % de acetato de bormilo, 4.11 % de trans-4-Tujanol, 3.85 % de Canfeno, 3.06 % de γ -terpineno y 2.91% de Cariofileno, además se obtuvo una muestra diferente compuesta principalmente de 51.60 % de β -ocimeno, 24.20 % de β -linalol, 5.07 % de (-)-limoneno, 3.99 % de β -trans-ocimeno y 1.25 % de Cariofileno.

Palabras clave: *Artemia salina*, citotoxicidad, Cromatografía de gases, ensayo ABTS, ensayo FRAP, RMN.

Tesis de Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Ing. Veronica Virginia Tepixtle Colohua
Director de Tesis: Dr. Benito Reyes Trejo

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF EXTRACTS ORGANIC PRODUCTS OBTAINED FROM THE AROMATIC LAUREL (*Litsea glaucescens*)

The aromatic laurel (*Litsea glaucescens*) is a nontimber forest species (NTPF) widely used in Mexico. It is currently registered in the Official Mexican Standard with the category of P(endangered) NOM-059-SEMARNAT-2019. This work compares the biological activity and chemical composition of extracts from aromatic bay leaves (*Litsea glaucescens*) obtained in 2020 and 2021.

The results show a yield of 1.43% to 0.27%, even higher than that reported by some authors. The NMR equipment reflects signals mainly from eucalyptol located at 73.5 and 69.6 ppm. The antioxidant capacity analyzed by the ABTS method is between 12.89 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$ and 4.99 $\text{ET}/\mu\text{L}$, while the FRAP method ranges from 0.17149 to 0.00682 $\mu\text{mol ET}/\text{mL}$. The brine shrimp test to measure the cytotoxic capacity showed an LC_{50} of 53.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 451.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with a category of high toxicity and moderate toxicity. Gas Chromatography analysis showed mainly the following compounds: 34.99% Eucalyptol (1,8-cineole), 7.45% 1R- α -Pinene, 6.51% L-Limonene, 5.26% trans-dihydrocarvone, 4.62% (-)- β -Pinene, 4.46% bormyl acetate, 4.11% trans-4-Tujanol, 3.85% Camphene, 3.06% γ -terpinene and 2.91% Caryophyllene, in addition, a different sample composed mainly of 51.60% of β -ocimeno, 24.20% of β -Linalool, 5.07% (-)-Limonene, 3.99% of β -trans-ocimene and 1.25% Caryophyllene was obtained.

Keywords: brine shrimp, cytotoxicity, Gas Chromatography, ABTS assay, FRAP assay, NMR.

Thesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Ing. Veronica Virginia Tepixtle Colohua
Advisor: Dr. Benito Reyes Trejo

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento sobre la medicina tradicional a base de plantas es una práctica amplia y aun conservada para muchos pueblos de América Latina tal es el caso de México, como un país que por su historia se ha constituido como un lugar con gran tradición ancestral, así como una gran riqueza en el uso de plantas medicinales y uso comestible.

Annan y Houghton (2008), mencionan que existe al menos 35 000 especies vegetales que presentan potencial para uso medicinal, y gran parte de la población mundial al menos 80% depende de medicina herbolaria tradicional. En México se registran alrededor de 4 500 especies que se emplean en remedios naturales, ocupando así el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (Barragán, 2006).

En este sentido muchas de las especies empleadas no cuentan con un registro que proporcione información científica para el uso adecuado en la medicina tradicional, tal es el caso del laurel aromático (*Litsea glaucescens*), una planta utilizada ampliamente en México para uso alimenticio o como condimento sin embargo en épocas prehispánica contaba con usos de herbolaria tradicional para el alivio de problemas ginecológicos, o postparto, trastornos estomacales, y para combatir la esterilidad femenina; así como en el tratamiento de problemas inflamatorias (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional, 2014). En México, esta planta se distribuye en varios estados desde los estados del norte (como Chihuahua), hasta las áreas de la meseta central.

Litsea glaucescens es una planta que crece en diferentes tipos de vegetación como Selva baja caducifolia, Bosque de Abies, Bosque mesófilo de montaña, Bosque de Pino y Bosque de Encino, a pesar de ser una planta recomendada para tratar varios padecimientos de salud, se ha demostrado que algunos factores ambientales y genotípicas pueden genera variación del metabolismo secundario en la planta, es decir que los compuestos químicos responsables de la efectividad de la planta pueden cambiar según en las condiciones ambientales

donde se desarrollen, tal como la falta de nutrientes o déficit de agua pueden aumentar las sustancias de defensa en la planta, haciendo que en algunos casos las plantas de la misma especie presente mayor o menor efectividad al tratamiento de cierto padecimiento.

En este estudio se investigará desde el punto de vista fitoquímico y de la actividad biológica principalmente de la actividad citotóxica y antioxidante del laurel aromático perteneciente al ejido El Nopalillo, municipio de Epazoyucan, Hidalgo, así como muestras obtenidas en centros comerciales, tiendas naturistas y áreas naturales, posteriormente se compara los resultados obtenidos en otros estudios.

El ejido El Nopalillo fue constituido en el año 1934 y que desde 1982 se encuentra realizando plantación anual de árboles de pino y mantenimiento del bosque.

En los últimos años se ha implementado en el ejido el aprovechamiento de recursos no maderables como lo es la recolección de hongos y plantas medicinales, en este sentido y observado el aprovechamiento de laurel aromático en la zona, se ha gestionado ante SEMARNAT un permiso para el aprovechamiento del *Litsea glaucescens* como una especie forestal no maderable, este arbusto crece en el sotobosque y es muy apreciado por sus propiedades condimentarias y medicinales, esto mismo ha generado que las poblaciones silvestres se vean reducidas, actualmente es una especie en peligro de extinción por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2019.

A pesar de contar con el permiso de aprovechamiento no se ha logrado tener mayor reconocimiento de la especie ya que el destino del laurel aromático mayormente es hacia el uso comestible, como condimento y este mercado no es muy exigente.

Actualmente los ejidatarios de Nopalillo buscan alternativas que les permita dar un valor agregado al laurel aromático, generando un mayor reconocimiento a las propiedades biológicas de la planta como lo son los atributos terapéuticos

reconocidos en la medicina tradicional (efectos carminativo, ansiolítico, antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio).

Mediante esta situación se basará el siguiente estudio, el cual tiene como objetivo evaluar el contenido de las propiedades citotóxicas y antioxidantes de *Litsea glaucescens*, compararlo con los resultados de otras muestras obtenidas de varios lugares del país y finalmente generar un informe de las propiedades químicas de la especie para dar un mayor valor fitoquímico, comercial y ecológico.

1.1. Antecedentes

México es considerado como un país con una amplia tradición en uso de la medicina tradicional y así como de sus prácticas curativas, un poco de esta historia se encuentra plasmada en el “Libro de las yerbas medicinales de los indios”, primer libro de medicina tradicional a base de plantas de origen azteca y es considerado una de las fuentes bibliográficas más importantes de América latina, conocido cuatro siglos después como Códice Badiano (Códice De la Cruz-Badiano), en esta obra se describen más de 150 plantas endémicas de México y su uso medicinal (Valverde, 1984).

Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene alrededor de 4000 (15% de la flora total mundial) plantas que tienen potencial terapéutico. Entre 3,500 a 4,000 son usadas por la población mexicana; 3,600 se recolectan de forma silvestre; 1,500 son utilizadas regularmente sin procesar; 370 se cultivan en el huerto familiar o en el comercio; y 35 especies están en estatus de amenazadas por diversos factores. (CONABIO,1998).

Existe una compilación de alrededor de 3,000 de plantas medicinales empleadas por diversos grupos étnicos. Aproximadamente solo el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades medicinales. Es por ello por lo que es necesario realizar diversos estudios fitoquímicos y etnobotánicos, en virtud de elucidar el posible beneficio medicinal que ofrecen las plantas (Lozoya, 1994; Huerta, 1997).

1.2. Justificación

El laurel aromático es una especie con gran potencial industrial para la extracción de productos químicos (Masten, 1999), sin embargo, el uso más frecuente obtenido de esta planta es como condimento en la cocina y como planta medicinal, también es visto frecuentemente en los rituales religioso (Montañez, 2011).

El género *Litsea* es una especie de la familia lauráceas que nivel nacional alcanza el 66% de endemismo, datos muestran que la diversidad de la familia de la familia *Laurácea* en México es más grande que lo que se consideraba hace 50 años (Allen, 1945).

A pesar de que *Litsea glaucescens* Kunth puede considerarse un recurso no maderable, su condición de especie en peligro de extinción hace que todo cuanto se relaciona con su conservación y gestión sea regulado por la Ley General de Vida Silvestre, esto debido a que existe poca información a su manejo y aprovechamiento, pues mucho de su uso es obtenido directamente de las poblaciones silvestres, reduciendo de esta forma su población en el medio natural.

Por lo anterior es que es necesario estudios que permitan generar más información ecológica, silvícola y de caracterización fitoquímica, esto último ya que la especie es ampliamente utilizada con fines terapéuticos y se desconoce la composición y efectos de sus actividades biológicas.

Este estudio tiene como objetivo proporcionar información científica acerca de la actividad antioxidante y citotóxica que el laurel aromático presenta, complementando de alguna forma la información disponible de esta especie; se realizara estudios de comparación de componentes activos de la misma especie obtenidas de diferentes accesiones y variabilidad de metabolitos secundarios.

1.3. Planteamiento del problema

El Ejido El nopalillo, es un poblado perteneciente municipio de Epazoyucan, estado de Hidalgo, oficialmente este se constituyó como ejido en el año de 1934. Presenta una ubicación en la zona de intersección entre el Eje Neovolcánico Transversal y la Sierra Madre Oriental a unos 2 300 y 3 100 msnm.

Cuenta con más de 828 hectáreas de las cuales 72% es destinado a manejo forestal , desde 1982 los ejidatarios realizan plantación anual de 10, 000 árboles de pino, de esta forma se mantienen dentro de las áreas un manejo sustentable del bosque , brechas corta fuego, podas, aclareos, protección contra animales domésticos y de ganadería, estas actividades les han permitido obtener beneficios económicos por el cuidado del bosque, como el pago por captura de carbono y producción de oxígeno, además se ha desarrollado un proyecto ecoturísticos para que permite a la ciudadanía conocer sobre los benéficos ecológicos de los bosques y por otro lado se obtiene beneficios económicos a los locales.

En esta dinámica, en el ejido de Nopalillo ha gestionado ante la SEMARNAT un permiso para el aprovechamiento de una especie forestal no maderable, el laurel mexicano (*Litsea glaucescens*).

Litsea glaucescens es una especie forestal no maderable que se distribuye en México ampliamente por 14 de las 32 entidades federativas, su principal uso se central en la cocina tradicional mexicana y usos como medicina tradicional, este último con pocos estudios que fundamenten sus componentes y áreas de aplicación en la salud.

Esta especie se encuentra en poblaciones silvestres sin manejo alguno, por lo que ha generado que la especie por la demanda que sufre se encuentre como una especie en peligro de extinción por la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2019.

Por esta situación los ejidatarios de Nopalillo están buscando alternativas que les permitan canalizar el laurel mexicano a un mercado que reconozca la calidad del producto, asimismo pretenden incorporarse al mercado de las plantas medicinales, puesto que el laurel cuenta con atributos terapéuticos reconocidos tanto por la medicina popular como por evaluaciones académicas, entre los que destacan los efectos carminativo, ansiolítico, antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio.

Este estudio tiene como objetivo hacer las evaluaciones fitoquímicas que permitan caracterizar las propiedades citotóxicas y antioxidantes del laurel aromático mediante pruebas con el modelo de *Artemia salina*, de acuerdo con el procedimiento descrito (Meyer et al. 1982) y aplicando los ensayos de Folín-Ciocalteu adaptado a microplacas y del radical libre estable para el caso de evaluación de antioxidantes, estos estudios proveniente de este ejido en particular ya que se ha realizado investigaciones sobre otras zonas del país, generando variabilidad en algunos componentes químicos de los metabolitos secundarios que contienen esta planta.

Cabe resaltar que la presencia los metabolitos secundarios está asociada con el crecimiento natural de la planta y conforman parte de las estrategias de defensa contra patógenos y predadores (Yan et al., 2000).

Estas mismas variaciones podría generar que los resultados en los estudios sean diferentes a los ya reportados, por lo que este estudio es de gran importancia para dar solución a los problemas reales de un proyecto productivo ejidal y generar información científica que fundamente los componentes químicos del laurel aromático mexicano.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluación de los aceites esenciales de *Litsea glaucescens* obtenidos del ejido El Nopalillo, municipio de Epazoyucan, Hidalgo y comparación con varias accesiones para describir el recurso genético que otorga esta planta como antioxidante y citotóxico.

2.2. Objetivo particular

- Evaluar la actividad antioxidante de los aceites esenciales mediante ensayo FRAP y ABTS*+.
- Evaluar la actividad citotóxica de los aceites esenciales con el método de *Artemia salina*.
- Identificar compuestos químicos por medio del análisis en Cromatografía de gases acoplada a masas para determinar cualitativamente los componentes de los aceites esenciales.
- Comparar por medio de análisis de espectros de RMN la estructura molecular de los principios activos de los aceites esenciales de laurel aromático.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Antecedentes Nacionales e internacionales

A lo largo de los años se ha podido manifestar el uso de plantas con propiedades medicinales en el tratamiento de enfermedades fisiológicas, incluso para tratamientos espirituales, así como en rituales, las principales civilizaciones.

Datos mencionan que en el mundo se utilizan cerca de 10000 especies de origen vegetal con fines medicinales, la mayor parte con usos medicinales (who 1993, Calixto 2000, Newman et al. 2003). Según estudio el mercado mundial de plantas medicinales está estimado en un 5% del mercado farmacéutico lo que equivale a más de US\$ 12.000 millones (Cañigüeral et al., 2003).

El 50% del comercio de las plantas medicinales son usadas como alimenticio humano, el 25% en cosmética, el 20% en la industria farmacéutica y un 5% en otros usos. Esta producción proveniente principalmente de países en desarrollo como América, África y Asia y estos son dirigidos posteriormente a países desarrollados como UE, EE. UU, de NA y Japón (Cañigüeral et al., 2003).

En Alemania, el porcentaje de la población que utiliza medicamentos fitoterapéuticos ha aumentado en los años, entre 1970 y 1997, de un 4% y un 92% según las patologías presentes, entre los principales usos son los preparados fitoterapéuticos para el alivio del resfriado con un 66% de aplicación (Blumenthal, M., 1998).

En el mercado de Francia los productos que tienen mayor presencia son para el tratamiento de trastornos circulatorios (44%), después por los digestivos, antitusígenos y productos para el tratamiento del resfriado (Blumenthal, M. 1998).

En EE. UU de Norteamérica el porcentaje de la población americana que utiliza algún tipo de terapia alternativa ha aumentado de 39% a 42% entre 1990 y 1997, de todas las terapias incluidas es la que ha aumentado su porcentaje de uso de 2.5% al 12.1% en un periodo de 7 años de 1990-1997(Eisenberg et al, 1998).

Por lo que se puede decir que la medicina alternativa o el uso de plantas para el tratamiento de problemas de la salud es un método que es aceptado por la sociedad y que actualmente se encuentra en auge.

3.2. Ámbito legal del uso de plantas medicinales

Ley marco en materia de la medicina tradicional: elaborada para el Parlamento Latinoamericano, 2009, tiene por objeto establecer lineamientos para la regulación y modulación de la práctica, la enseñanza y la investigación de la medicina tradicional que son utilizados actualmente por grupos indígenas, esto con el propósito de implementar medidas necesarias de seguridad y vigilancia al patrimonio cultural, se propone términos y condiciones que permitan el uso sustentado de la información tomando en cuenta el respeto a los Derechos Humanos, los Derechos Indígenas, el Derecho de la Salud y en concordancia con la legislación de Salud (Almaguer González, 2009).

En este marco se puede observar dos artículos muy interesantes relacionados al manejo sustentable de la materia prima y el tema del desarrollo de la investigación en este ámbito:

Art. 11.- “El manejo sustentable de plantas y animales medicinales.”

Es necesario la creación de hábitats o jardines de plantas medicinales según sea el caso, así como el cultivo de plantas para el aprovechamiento comercial esto con el fin de aprovechar de manera sustentable los recursos naturales. Para las empresas privadas que se dediquen a la venta de remedios herbolarios y medicamentos naturales están obligados a adquirir insumos a través de compras certificadas o comprobar su legal procedencia, esto con el fin de promover un manejo sustentable de las especies.

Art. 12. “La investigación acerca de la Medicina Tradicional Indígena.”

Todas las investigaciones relacionadas con la medicina tradicional y cualquier asunto que implique a las poblaciones indígenas se llevaran a cabo tomando en cuenta la opinión de los integrantes de esta, informando los objetivos de manera

clara y el método de investigación, la información será registrada según los criterios de se establezcan conjuntamente y si es posible mediante un “Registro Nacional de la Medicina Tradicional”. Esto aplica a todas las investigaciones realizadas por instituciones públicas, privadas, particulares y todas aquellas que se dedican a la investigación según las normas vigentes.

3.3. Principios teóricos

Fitoquímica: Uno de los principios teóricos para el estudio del siguiente proyecto se centra en el concepto de la fitoquímica.

La Fitoquímica es una disciplina científica de la rama de la bioquímica y se ocupa principalmente de los procesos químicos de las plantas, esta disciplina tiene como objetivo el aislamiento, y análisis de las actividades biológicas de diversas sustancias producidas por los vegetales (Hernández et al.,2005).

Farmacognosia: El termino fue adquirido en el año 1815 por Seydler, este término se refiere al estudio de las sustancias químicas de origen natural y con algún potencial para el uso médico, está relacionado con la botánica y la fitoquímica y que por un lado en la botánica se describe la morfología y anatomía de las fuentes primarias para la obtención de las sustancias y mediante la fitoquímica se analiza los componentes químicos de los extractos.

Esta ciencia es altamente especializada y multidisciplinaria, ya que representa una de las bases para la educación farmacéutica, el termino deriva del griego *Pharmakon: Droga* y *Gnosis: Conocimiento*, esta disciplina estudia principalmente la materia prima de partida y sustancias usadas en el alivio de malestares de salud.

En la farmacognosia, se tiene un mayor interés en la planta con beneficios farmacéuticos, sus componentes químicos y sus contribuyentes,

Farmacología: Estudia el efecto que tiene las drogas a nivel del organismo. En esta ciencia se estudian principalmente los beneficios con los que cuentan los compuestos químicos ya sea de origen sintético o de origen vegetal.

Medicina tradicional: Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define como la suma de conocimientos, prácticas y técnicas basadas en el conocimiento empírico y creencias de diversas culturas, y que tiene un uso para el tratamiento de la salud física y mental. La medicina tradicional también es conocida como complementaria, popular, alternativa, no oficial, no convencional y no ortodoxa (INCMNSZ, 2017).

3.4. Bases teóricas del Laurel (*Litsea glaucescens*).

El laurel aromático (*Litsea glaucescens*) es una especie de la familia de las lauráceas, misma que cuenta con aproximadamente 50 géneros y 2500 a 3000 especies, con una distribución tropical y subtropical de todo el mundo (Van der Werff y Lorea, 1997). Actualmente en México se encuentran 10 géneros y 13 especies de esta familia, el aguacate (*Persea americana* Mill.) y la canela (*Cinnamomum verum* Presl) son algunos considerados de gran importancia comercial (Lorea Hernández, 2002).

Litsea es un género de árboles o arbustos que consta de 400 especies de las cuales siete se encuentran distribuidas en el continente americano y siete presentes en México: *Litsea glaucescens*, *L. guatemalensis* Mez, *L. muelleri* Rehder, *L. neesiana* (S. Schauer) Hemsl., *L. parvifolia* (Hemsl.) Mez, *L. pringlei* Bartlett y *L. schaffneri* Bartlett (Jiménez Pérez et al., 2011).

Actualmente el laurel (*Litsea glaucescens*) es considerada en peligro de extinción, según la Norma Oficial Mexicana la NOM-059- SEMARNAT- 2019, esto debido a su gran uso de la especie y su extracción del medio silvestre.

3.4.1. Descripción

Generalmente es un árbol o arbusto de 0.5 a 10 m de altura, glabro o puberulento, con frecuencia muy ramificado; con hojas alternas a opuestas o subverticiladas, penninervadas, rara vez triplinervadas, cuenta con peciolo de menos de 2 cm de largo, láminas lanceoladas o elíptico lanceoladas, llega a medir de 8 cm de largo por 2.5 cm de ancho, ápice agudo o acuminado, el borde liso, la base aguda

o subaguda, penninervadas, coriáceas, glabras, apariencia brillantes, envés con frecuencia glauco (Figura 1) (Rzedowski G y Rzedowski J., 2010).

Flores

Las flores son Unisexuales, más bien campanuladas; tépalos usualmente 6, elípticos u ovados, semejantes entre sí, pocas veces desiguales, cuentan con una apariencia más o menos extendidos, nunca papilosos, tempranamente deciduos. Flor de color blanco a ligeramente rosa, cuando son flores tempranas están cubiertas por dos pares de brácteas, florece en los meses de febrero a mayo y se produce los frutos maduros en agosto a septiembre.



Figura 1. Inflorescencias de Laurel aromático (*Litsea glaucescens* Kunth)

Fuente: Naturalista. Neptalí Ramírez Marcial, 2017

Fruto

Fruto esférico, de 8 a 10 mm de diámetro, negro en la madurez, asentado en una cúpula pequeña discoide, de cerca de 3 mm de diámetro, tépalos y estambres algunas veces persistentes (pero marcescentes) en el margen de la cúpula.

3.4.2. Información taxonómica

Cuadro 1. Información Taxonómica de *Litsea glaucescens*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lurales
Familia:	Laurácea
Nombre científico:	<i>Litsea glaucescens</i> , 1817

Fuente: Luna Vega (2003).

3.4.3. Nombre común

Litsea glaucescens, cuenta con varios sinónimos como: *Tetranthera glaucescens* var. *Subsolitaria*, *Litsea glaucescens* var. *Subsolitaria*, *Litsea pringlei* Bartlett, *Litsea schaffneri* Bartlett, *Litsea novoleontis* Bartlett, *Malapoenna glaucescens* (van der Werff et. al.,1997).

En México presenta varios nombres comunes como: *aureli* (México), *carnelillo* (México), *ecpatli de chietla* (México, Veracruz), *laurelillo* (México, Veracruz), *tzajaltziltzil zujch* (México, Chiapas) y *li gua dsíi* (Mexico, Oaxaca) (Luna Vega, 2003).

3.4.4. Distribución

L. glaucescens se encuentra distribuida desde el norte de México hasta Costa Rica, en México se encuentra presente en 14 de las 32 entidades federativas, Aguascalientes, Chiapas, Durango, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz y Quintana Roo (Hernández y Vargas, 2020).



Figura 2. Mapa de distribución ecológica en México de *Litsea glaucescens*.

Fuente: Luna Vega (2003).

El laurel aromático es una especie que se desarrolla bajo el dosel de diferentes tipos de vegetación, dentro de los que destaca Encino-Pino, encinares o encino-oyamel y bosques mesófilo de montaña llegando incluso a estar presente en áreas menos húmedas y más expuestas, como matorrales semiáridos, siempre entre los 800 y los 2830 msnm (Dávila Figueroa, 2011).

Los suelos en donde se desarrollan presentan un pH que varía de 5.7 a 7, con buenas concentraciones de nitrógeno, fósforo, potasio y materia orgánica (Dávila Figueroa, 2011).

En condiciones naturales el laurel aromático crece bajo la interacción de diferentes especies según el tipo de vegetación donde se desarrolle ver cuadro 2.

Cuadro 2. Especies asociadas a laurel aromático (*L. glaucescens*) según el tipo de vegetación donde se desarrolla.

Tipo de vegetación	Altitud	Especies
Selva baja caducifolia	0 msnm a 1,500 msnm hasta 1,900 msnm	<i>Lysiloma watsonii</i> <i>Bursera inopinata</i> , <i>Cochlospermum vitifolium</i> , <i>Jatropha cordata</i> , <i>Tabebuia palmeri</i> , <i>Bombax palmeri</i> , <i>Ceiba parvifolia</i> , <i>Pithecellobium recordii</i> , <i>Pithecellobium delce</i> , <i>Guazuma ulmifolia</i>
Bosque de <i>Abies</i>	Mayores a los 2400 msnm	<i>Heuchera</i> , <i>Symphoricarpos</i> , <i>Lonicera</i> , <i>Arstostaphylos</i> , <i>Salix</i> , <i>Alnus</i> , <i>Cupressus</i> , <i>Arbutus</i> , <i>Penstemon</i> , <i>Cirsium</i> , <i>Garrya</i> , <i>Delphinium</i> , <i>Juniperus</i>
Bosque mesófilo de montaña	800 msnm a 2700 msnm	Asociado con <i>Quercus spp.</i> , <i>Clethra mexicana</i> , <i>Liquidambar macrophylla</i> , <i>Magnolia spp.</i> <i>Alnus jorulensis</i> , <i>Ostrya virginiana</i> , <i>Carpinus sp</i> , <i>Cornus</i> , <i>Cupressus lusitanica</i> .

Tipo de vegetación	Altitud	Especies
Bosque de Pino	800 msnm a 3500 msnm	<i>P. rudis</i> , <i>Pinus montezumae</i> , <i>Abies pseudopsuga</i> , <i>Pinus teocote</i> , <i>Pinus greggii</i> , <i>Pinus oocarpa</i> , <i>Pinus pringlei</i> , <i>Pinus patula</i> , <i>Pinus ayacuhuite</i>
Bosque de Encino	1200 msnm a 2800 msnm	<i>Quercus eugeniifolia</i> , <i>Quercus affinis</i> , <i>Quercus sartorii</i> , <i>Quercus xalapensis</i> y <i>Quercus crassipes</i> .

Fuente: Luna Vega (2003).

3.4.5. Usos de *Litsea glaucescens*

Usos medicinales

Desde el siglo XVI se habla del uso de *Litsea glaucescens* para el tratamiento de varios padecimientos, Francisco Hernández en su publicación “La Historia de las plantas de la Nueva España” describe a una planta llamada “ecapatli” con características similares al laurel de Europa, a diferencia en el tamaño de sus hojas (Valdés y Flores, 1985).

Antiguamente esta planta se usaba para el tratamiento de enfermedades como epilepsia y la parálisis, los cuales están relacionados con problemas del sistema nervioso (Guzmán Gutiérrez *et al.*, 2012).

En el libro “Florilegio Medicinal” escrito por Juan de Esteyneffer en 1712, describe una combinación entre la medicina tradicional de Europa y la del nuevo Mundo, en él se hace mención del uso del laurel para curar enfermedades frías, dolores de cabeza y también la parálisis, haciendo uso de los vapores de las hojas de laurel, además para el tratamiento de otras enfermedades con diversas recetas donde el principal ingrediente son las hojas de laurel (Esteyneffer, 1712; Jiménez Pérez *et al.*, 2011).

Actualmente el laurel aromático se usa ampliamente en varios lugares del país, principalmente con fines alimenticios, sin embargo, se puede usar para el tratamiento de varios problemas de salud (Cuadro 3).

Cuadro 3. Usos medicinales de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) en México.

Estado del País	Parte de la planta	Uso medicinal	Modo de preparación
Chiapas	Hojas	Dolor de estómago	En té
Oaxaca	Hojas	Dolor de estómago	infusión de las hojas diluida en licor de caña.
Morelos	Ramas, Flores y Hojas	Problemas ginecológicos y esterilidad Femenina	Infusión de las ramas, baños corporales (Hervir laurel con <i>Potentilla candicans</i> , <i>P. rubra</i> , <i>P. staminea</i> , <i>Silene laciniata</i> , <i>Buddleja cordata</i>)
Chiapas	Ramas y hojas	Espirituales, aires fríos y el empacho	vaporizaciones e infusiones
Chihuahua y el suroeste de Durango y Sonora	Hojas y ramas	Cólicos menstruales	Té de hojas de laurel, vapores y baños.
Otras partes del país	Ramas, Flores y Hojas	Tos y Tosferina	Té de hojas de laurel con hojas de <i>Ruta graveolens</i> , <i>Lantana cámara</i> , <i>Sambucus mexicana</i> , hinojo y clavo.
Otras partes del país	Ramas y Hojas	Reumas por enfriamiento	Hervir ramas con <i>Buddleja cordata</i> y hediondilla, usar el vapor en la zona de dolor.
Otras partes del país	Hojas, flores y ramas	Trastornos estomacales, anginas, infecciones, calentura, escalofríos	Té de hojas de laurel, infusiones, vapores y baños.

Fuente: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009)

2.2.7 Aprovechamiento e importancia

El laurel aromático es una planta que ha estado presente en la vida de las comunidades mexicanas desde tiempos ancestrales, usada principalmente con fines medicinales, aunque actualmente es empleada como condimento y ornamental en gran medida.

Cosechadores

Las personas dedicadas a la recolección y extracción de laurel aromático, “Laureleros”, son en su mayoría gente que tienen una fuerte relación con el campo, ya que todos se encuentran ubicados dentro de las actividades de producción primaria (Montañez Armenta, 2011).

Dentro de este tipo de actividad no existe una estructura organizacional bien establecida, ya que cada recolector realiza la actividad por su cuenta, posteriormente los aprovechamientos de las hojas pasan a su comercialización con intermediarios (Dávila Figueroa, 2011).

Para el aprovechamiento de las hojas y ramas de laurel, los recolectores se valen de diferentes herramientas manuales como la oz o rozadera, tijeras de jardinería o machetes, la forma en que lo hacen siempre es mediante podas del follaje que representa hasta el 50 % del árbol (Dávila Figueroa, 2011 y Montañez Armenta et al, 2011).

Aprovechamiento

Litsea glaucescens cuenta con un amplio aprovechamiento, actualmente el principal uso de esta especie es el empuado en la gastronomía como condimento (Martínez, 1969), en México son usadas cinco de las siete especies de *Litsea* con fines medicinales y culinarios, siendo *L. glaucescens* la más comercializada como especia en mercados locales (Jiménez et al., 2011).

Como condimento el laurel se vende en los mercados locales de México, en manojos de hojas secas junto con otras especias de olor (Jiménez et al., 2011).

Un estudio realizado en el Parque Nacional El Chico, México, indica que la principal razón del aprovechamiento del laurel es con fines alimenticios (95%) y utilizado principalmente en el hogar, otros usos que se observaron en esta región son como uso cultural (53%) y usos medicinales (42%) (Ortega *et al*, 2019).

Ortega *et al.*, 2019, en su estudio menciona que el laurel tiene usos recreativos para la población del Parque Nacional El Chico, México, pues dentro de la comunidad existe una tradición llamada “*Cabalgata laurelera*”, actividad anual con más de 100 años de antigüedad, en la cual el uso de laurel es fundamental para su realización, se ha documentado que durante esta festividad se realiza un aprovechamiento de hasta 120 kg de laurel aromático.

Por otro lado, estudios de aprovechamiento del laurel para el estado de Aguascalientes, describen que el principal motivo de la extracción del laurel es para elaboración de ramos de adornos, demandados principalmente en las épocas de semana santa, en donde se aprovecha principalmente ramas tiernas o rebrotes de las plantas de laurel, aprovechando aproximadamente la mitad de la planta (Dávila-Figeroa, 2011 y Montañez-Armenta *et al*, 2011).

Para esta zona del país se reporta que, en la época de semana santa, puntualmente para el “domingo de ramos”, se llega a aprovechar un total de 900 kg de las ramas de laurel aromático, recolectado en tres días de trabajo, generando una derrama económica de hasta \$13,040.00 de pesos mexicanos, \$ 362.22 pesos mexicanos de jornal al día per cápita por recolector (Montañez Armenta *et al*, 2011).

Composición química

Estudios realizados en aceite esencial de *L. glaucescens* muestran un contenido principalmente de 22% de 1,8-cineol, 13% de sabineno, 10% de terpineno-4-ol, 9% de α -terpineno, 7% de acetato de α -terpinilo, 7% de acetato de nerilo, 5% de β -pineno y 4% de sabineno y α -pineno. Los extractos etanólicos de la corteza muestran presencia de flavanonas (pinostrobina, pinocembrina y dihidrochalconas) (López *et al.*, 1995).

Además, se puede observar un 6.9% de fenoles totales equivalente a ácido tánico. Los extractos de *L. glaucescens* no presentan compuestos de alcaloides ni glicósidos cianogénicos (Jiménez et al., 2007).

3.5. Metodologías presentes en el trabajo de investigación

3.5.1. Las plantas medicinales

Se le conoce como plantas medicinales a aquellas plantas que cuentan con propiedades terapéuticas o que ejercen efectos farmacológicos sobre algún organismo (Saranraj et al., 2016).

A las plantas medicinales se les puede dar un uso muy variado, ya que se aprovecha diferentes partes de la planta, semillas, raíces, hojas, frutos, cascara, cortezas y flores (Jamshidi-Kia et al., 2018).

El uso de las plantas o extractos de plantas se remonta desde épocas antiguas para la conservación de alimentos, como medicina alternativa y para terapias ancestrales.

Los estudios actuales señalan que el uso de plantas son una alternativa como fuente de antibióticos contra patógenos fúngicos y bacterias, (Uma et al., 2013). Estudios recientes también se encuentran enfocados en los extractos y compuestos biológicamente activos aliados de especies de plantas con propiedades farmacológicas.

Las técnicas tradicionales para la extracción de extractos de productos naturales incluyen: técnicas de destilación, extracción de fluidos supercríticos, infusión, maceración, percolación, digestión, decoración, extracción continua en caliente, extracción acuosa- alcohólica por fermentación, extracción a contracorriente, extracción asistida por microondas y extracción por ultrasonido (Aparicio, 2020).

3.5.2. Métodos de extracción de componentes activos

El primer paso para el análisis de las plantas medicinales es la extracción de estas ya que es necesario extraer los componentes bioquímicos deseado de las plantas medicinales para su estudio individual y descripción (Sasidharan *et al.*, 2011).

3.5.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son un líquido oleoso, volátil que se obtiene de plantas o partes de plantas por algún método físico de extracción. Este líquido representa la fracción aromática de la planta y se puede obtener de diferentes partes de la planta, flores, frutos, semillas, hojas, tallos, y raíces, está constituido principalmente por alcoholes, terpenos, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos y ésteres. Esta sustancia líquida es insoluble en agua, pero se solubiliza alguna parte en etanol, cloroformo y en aceites fijos (Montoya, 2010).

La mayoría de los aceites esenciales se obtienen mediante la destilación: arrastre de vapor con agua y destilación directa con vapor de agua, además también se puede obtener mediante la destilación directa con agua, otra forma de obtener los aceites esenciales es mediante el uso de disolventes volátiles, extractos con fluidos supercríticos, maceración, y expresión (Sharapin, 2000).

3.5.4. Resonancia magnética nuclear

Es un método espectral relativamente nuevo, se basa en las propiedades magnéticas que poseen los núcleos. Este método nos permite entender estructuras moleculares, principalmente orgánicas (Laurella, 2016).

El fenómeno fue descubierto en el año 1946 por dos grupos de investigadores Purcell de la universidad de Harvard y Bloch de la universidad de Stanford, quienes trabajaban de manera independiente, la gran aplicación que podía tener este método se hizo evidente y en año 1953 aparecieron en el mercado los primeros espectrómetros comerciales de RMN (Nathan, 1967).

3.5.5. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Se describe como una técnica que forma una herramienta muy potente para la separación, identificación y cuantificación de los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

La técnica tiene como objetivo la identificación de compuestos, a menudo es usado para confirmar la presencia o ausencia de compuestos en una muestra en específico. También es empleada para establecer la cantidad de componentes individuales presentes en una muestra, esto con el uso de curvas de calibraciones los correspondientes patrones.

3.5.6. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad que tienen algunos compuestos de inhibir o detener los procesos de oxidativos, es decir, cuentan con la capacidad de atrapar radicales libres (moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo), causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto benéfico en la prevención de enfermedades cancerígenas, cardiovasculares, circulatorios y neurológicos. (Kuskoski et al., 2005).

Para el análisis de la actividad antioxidante existen diferentes ensayos de evaluación, estos pueden ser clasificados según el mecanismo de reacción que tiene estos antioxidantes para estabilizar los radicales libres.

3.5.7. Ensayo ABTS

Este método, es la versión mejorada del método de capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC), establecido por Miller y colaboradores en el año 1993, en el cual se observa básicamente la actividad relativa de los antioxidantes de otorgar electrones al radical $ABTS^+$ y donde los resultados son comparados frente al antioxidante sintético Trolox. El método ABTS presenta una alta estabilidad química y solubilidad en agua, cuando el sustrato empieza a oxidarse con la ayuda de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) genera el radical catión $ABTS^+$.

Posteriormente se debe de realizar un monitoreo por medio del espectrofotómetro a 734 nm para observar la habilidad del antioxidante para retener el radical catión en la fase acuosa, hasta el punto de que la absorbancia se vuelva estable (Antolovich et al. ,2002).

3.5.8. Ensayo FRAP

Como principal característica es la reducción del complejo Fe^{3+} , este ensayo mide la actividad antioxidante por el aumento en la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Según Hagerman et al., 1998, es necesario en este método mantener las condiciones de un pH ácido de 3.6 para lograr la solubilidad del hierro y así como de estimular la transferencia de electrones, lo que generara el aumento del potencial redox. Este ensayo mide el poder redox en plasma y también evalúa la actividad antioxidante en sustratos biológicos, alimentos y extractos de plantas (Shahidi y Zhong, 2015).

3.5.9. Actividad Citotóxica

La Organización Mundial de la Salud recomienda que para la reducción de los efectos adversos del consumo de medicamentos a base de hierbas es necesario una validación científica completa sobre la toxicidad de estas plantas (Uangbaoje et al., 2016).

3.5.10. Pruebas de *Artemia salina*

Artemia salina Leach. (*Artemiidae*) es un crustáceo de agua salina, este organismo cuenta con un papel importante en el flujo de energía de la cadena alimentaria de este medio. Este crustáceo es usado ampliamente en estudios científicos toxicológicos para determinar de forma rápida la concentración letal en el medio o muestra, el uso de este método resulta es fácil y barato ya que la obtención de los materiales no tiene restricciones de uso y se encuentra de manera inmediata (Bezerra et al., 2017).

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se basa en el porcentaje de muerte de las larvas de este crustáceo, el método fue propuesto por Michael et al, 1956, y

posteriormente desarrollado por Vanhaecken et al. 1981, con el fin de tener una metodología fácil y útil para la determinación de toxicidad (Calienes *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Libralatoa *et al.*, (2016) se menciona que las principales ventajas de utilizar bioensayos con *Artemia Salina* para determinar la toxicidad existente es su rapidez de la prueba, ya que solo requiere entre 28-72 h desde la eclosión hasta el primer punto final, es una prueba rentable y altamente disponible ya que los huevos del crustáceo se logran obtener en diferentes acuarios los cuales son usados como alimento para algunos peces.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se realizó un muestreo en el área de estudio, el ejido “El Nopalillo”, Epazoyucan, estado de Hidalgo.

Además, se recolectaron muestras de Chignahuapan, Pue., Zongolica, Ver., San Andrés Metla, Mex., centro comercial “Soriana”, Tex., Mex., tienda naturista “Los cedros”, Tex., Mex., tienda naturista “Yerbero Antigüita”, mercados locales de Salitrería, Tex., Mex. Y Texcoco Centro.

Para la etapa experimental el trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales situada en el Departamento de Preparación Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.1. Descripción del área de estudio.

El Nopalillo, es un poblado perteneciente al municipio de Epazoyucan, estado de Hidalgo, oficialmente este se constituyó como ejido en el año de 1934. Presenta una ubicación en la zona de intersección entre el Eje Neovolcánico Transversal y la Sierra Madre Oriental a unos 2 300 y 3 100.

El ejido de Nopalillo cuenta con más de 828 hectáreas de las cuales el 72% es destinado al manejo sustentable del bosque, en este sentido, desde el año de 1982 los ejidatarios realizan actividades de plantación anual de aproximadamente 10,000 árboles de pino.

El ejido también cuenta con actividades de mantenimiento del bosque como: establecimiento de brechas corta fuego podas de formación, aclareos, protección contra el ganado doméstico, entre otros, estas actividades a su vez permiten la remuneración económica a través de pago por servicios ambientales, destacando la captura de carbono, la producción de oxígeno y el desarrollo de un parque ecoturístico.

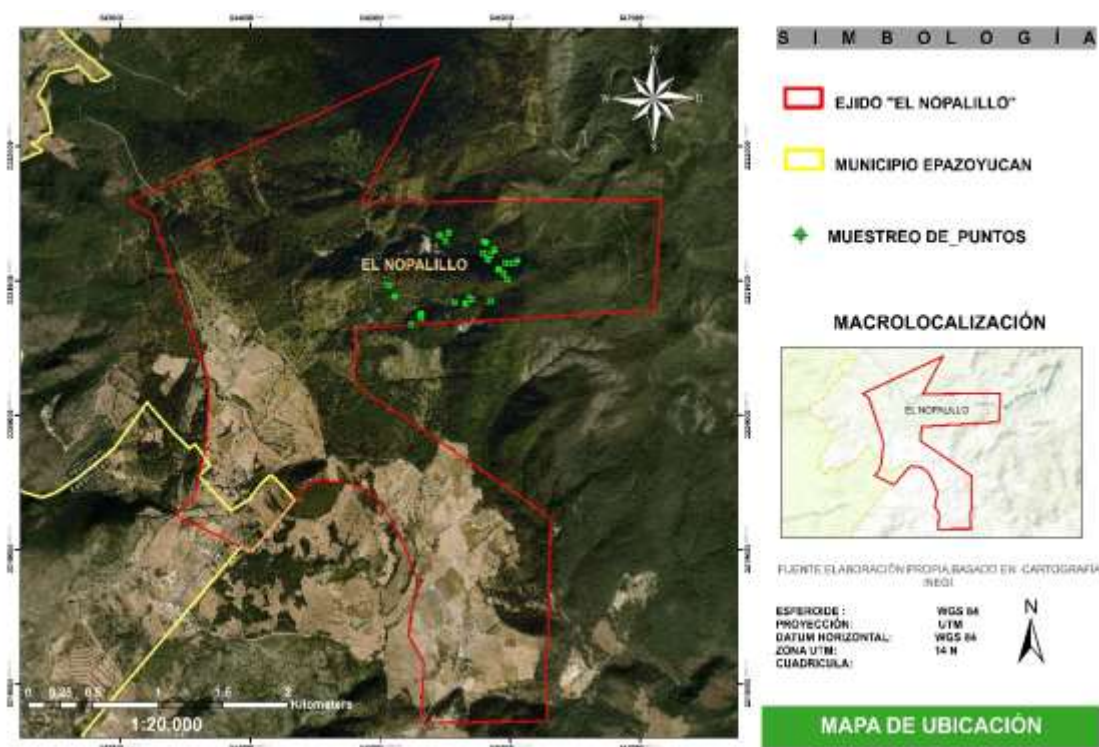


Figura 3. Mapa de ubicación del ejido "El Nopalillo", Epazoyucan Hidalgo.
Fuente: Elaboración propia basada en cartografía de INEGI.

4.2. Recolecta de la planta

Durante el año 2020 y 2021 se realizó la recolecta de hojas de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) en el ejido "El Nopalillo", Epazoyucan, Hidalgo, durante el recorrido se diferencié tres tipos de estratos: bosque de pino- encino, bosque de oyamel y bosque mixto donde se realizó un total de 19 puntos (Ver tabla 4). Posteriormente se realizó el secado del material vegetal en sombra esto para evitar que se volatilicen algunos compuestos. se procesó la materia una parte en fresco y otra en seco en el Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Preparatoria agrícola. Para la extracción de aceites esenciales se utilizó el equipo tipo Clevenger con el principio de arrastre de valor.

Cuadro 4. Coordenadas de los sitios de muestreo realizadas al Ejido "El Nopalillo".

Punto	Coordenada X	Coordenada Y	Altitud
1	545069	2220970	2960
2	545055	2220971	2954
3	545240	2220675	2956
4	545315	2220721	2969
5	545313	2220735	2972
6	545314	2220755	2969
7	545112	2220885	2957
8	546054	2221150	3027
9	546052	2221144	3025
10	546030	2221135	3030
11	545996	2221134	3028
12	545985	2221138	3027
13	545972	2221131	3031
14	545963	2221134	3031
15	545829	2221161	3003
16	545798	2221290	3001
17	545799	2221295	3001
18	545809	2221288	3008
19	545792	2221205	2998

Fuente: Elaboración propia

4.3. Aceite esencial de laurel aromático

El aceite esencial fue obtenido por hidrodestilación, empleando un equipo tipo Clevenger, se colocó en un matraz bola de base plana de 1 L la cantidad de 100g de hojas secas ó fresca perfectamente trituradas de Laurel aromático, se agregarán aproximadamente 500 mL de agua para macerarlos.

Los matraces fueron conectados a un destilador de aceite esencial tipo Clevenger, en seguida se inició un calentamiento suave y se aumentó gradualmente la temperatura de la parrilla eléctrica hasta lograr una ebullición constante y controlada, previamente se activó la recirculación de agua fría a través del refrigerante de rosario integrado destilador mencionado de tal manera que se logró una condensación del vapor y el aceite se acumuló en la parte superior del líquido condensado, dicha destilación se llevó a cabo por 60 a 90 min hasta que ya no se observó la presencia de gotas del aceite separado (Dominguez, 1982; Dominguez, 1985).

Finalmente, el aceite fue colectado y se guardó en frasco ámbar y bajo refrigeración a 4 °C hasta su uso. Esta operación se repitió con todas las muestras estudiadas (Figura 4): Chignahuapan, Pue., El Nopalillo Hgo. (Pino-Encino), El Nopalillo Hgo. (Oyamel), El Nopalillo Hgo. (Bosque Mixto), Zongolica, Ver., Tienda Naturista “Los cedros”, Centro comercial Soriana, Mercado Centro Texcoco Méx., San Andrés Metla Edo, San Andrés Metla Edo., Mercado Salitrería, Tex. Méx., Tienda Naturista Yerbero, Tienda Naturista Antigüita y Zongolica, Ver. (Hoja con semilla).



Figura 4. Muestras obtenidas para el estudio: A) Chignahuapan, Pue., B) Nopalillo, C) Zongolica, Ver., D) tienda naturista “Los cedros”, E) centro comercial “Soriana”, Tex, F) Mercado Texcoco Centro, G) San Andrés Metla, Mex., H) Mercado Salitrería, Tex., Mex., I) tienda naturista “Yerbero Antigüita”.

4.4. Determinación de espectros de RMN

Los aceites esenciales obtenidos fueron analizados por sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y de ^{13}C , mismos que fueron determinados en un espectrómetro Agilent 400 MR DD2 (Santa Clara, CA, USA) operado a 400 MHz. Los desplazamientos químicos de ^1H fueron estimados en CDCl_3 , adicionando Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros mostrados, corresponden al resultado del procesamiento de los archivos FID, empleando el programa Mestrec versión 2. 3^a.



Figura 5. Espectrómetro de RMN de 400 MHz Agilent DD2 disponible en el Laboratorio de Productos Naturales UACH.

4.5. Métodos para la determinación de actividad antioxidante

Ensayo ABTS⁺

Este ensayo se llevó a cabo realizando el método descrito por Re et al., 1999, adaptado a microplacas.

Para llevar a cabo el ensayo ABTS + Se realizó la preparación de la disolución del radical ABTS, mezclando volúmenes iguales de las disoluciones A y B.

Disolución A. Se pesó 40.6 mg de ABTS, posteriormente se disolvió en 2 mL de agua destilada y finalmente se aforó en un matraz volumétrico de 10 mL.

Disolución B. Se pesó 15.47 mg de persulfato de potasio, se disolvió en 5 mL de agua destilada, posteriormente se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL con agua destilada.

Una vez realizada la preparación de las disoluciones A y B, se mezclaron volúmenes de 10 mL de cada una de las disoluciones, posteriormente se dejó reposar un lugar oscuro durante 16 horas a temperatura ambiente.

Una vez pasado el tiempo de reposo de 16 horas se tomó 1800 µL de la mezcla y se aforó a 25 mL con metanol puro para obtener la disolución ABTS+, esta disolución debe de ser verificado en el equipo de microplacas en un rango de 0.7 a 1.2 de absorbancia.

Curva de Trolox. (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchomane-2-carboxylic acid). Para obtener la disolución madre Trolox, se pesó 12.5 mg de Trolox y se aforó a 50 mL con metanol al 80%, una vez obtenida la disolución madre, se tomó las alícuotas indicadas en el siguiente cuadro y se aforo a 1 mL.

Cuadro 5. Aforo de las alícuotas necesarias
determinar la curva Trolox.

Alícuota de la disolución madre de Trolox (µL)	µL de metanol al 80%
50	950
100	900
150	850
200	800
300	700
400	600
500	500
600	400

Una vez obtenida las mezclas correspondientes, en una microplaca de 96 pozos se colocó en cada pozo 20 µL de las disoluciones de Trolox y se le agrego 180 µL de disolución ABTS+, esto para obtener la curva de Trolox correspondiente. De cada una de las disoluciones se hace un ensayo por triplicado.

Preparación de las disoluciones para la microplaca. En tubos ependorf se mezcló la cantidad necesaria de la muestra con propanol para obtener valores de absorbancia que caigan dentro de la curva de calibración (tabla 6), posteriormente en cada pozo de una microplaca se colocó 20 μL de muestra y se le agrego 180 μL de disolución ABTS $\cdot^+$, usando como blanco 200 μL de la disolución ABTS $\cdot^+$, se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y posteriormente se midió los valores de la absorbancia en 734 nm. De cada muestra se hace un triplicado (Figura 6).

Cuadro 6. Diluciones de las muestras de aceite esencial con Propanol.

Nombre de la muestra	μL de la muestra	μL de Propanol
1 Chignahuapan, Pue.	10	350
2 Nopalillo (P-E), HGO.	20	200
3 Nopalillo (O), HGO.	20	200
4 Nopalillo (M), HGO.	20	200
5 Eucalipto	20	100
6 Zongolica, Ver. Los cedros, Tex.,	10	300
7 Mex.	10	300
8 Soriana, Tex., Mex.	10	300
9 Mercado Tex., Mex.	10	200
10 San Andrés Metla	10	300
11 Salitrería, Tex., Mex.	10	200
12 Yerbero Antigüita Zongolica (Semilla),	20	300
13 Ver.	10	450

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, con los resultados obtenidos de la curva de calibración de Trolox, se realizó una tabla de concentración y absorbancia, así como una gráfica que nos permitió calcular los micromoles equivalentes de Trolox por microlitro de muestra ($\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50	100	150	200	300	400	500	600	BLANCO			
B	50	100	150	200	300	400	500	600				
C	50	100	150	200	300	400	500	600				
D	50	100	150	200	300	400	500	600				
E												
F												
G												
H												

Figura 6. Configuración del ensayo ABTS ⁺ en la microplaca

Ensayo FRAP

Este ensayo se realizó con el método realizado por Benzie y Strain (1996) adaptado a microplacas.

Para llevar a cabo el ensayo FRAP (Ferric reducing antioxidant power), primero se preparó las siguientes disoluciones.

Preparación de disoluciones

- A) Se pesó 4.624 de acetato de sodio trihidratado y se midió 18.2 mL de ácido acético glacial.

En un vaso de precipitados se disolvió el acetato de sodio con 30 mL de agua destilada, posteriormente se vertió la solución en un matraz aforado de 100 mL, se realizó 3 enjuagues al vaso con un poco de agua destilada y se incorporó al matraz. Después se adiciono el ácido acético glacial y finalmente se aforo con agua destilada. Se midió el pH y se ajustó a 3.6.

- B) Para esta disolución se utilizó como disolvente HCl 40 mM. Se pesó 31.23 mg de TPTZ (2,4,6 Tripiridil-s triazina).

Para la preparación del HCL 40 Mm, se colocó 200 mL de agua destilada en un matraz aforado de 250 ml, se agregó 1 mL de HCL concentrado y se aforó.

Posteriormente en un vaso de precipitados de 10 mL se disolvió con 2 ml de HCL 40 mM, 31.23 mg de TPTZ. Después se vertió la disolución a un

matraz aforado de 10 mL, se realizaron tres enjuagues con 1 mL de HCL 40 mM, se adicionaron al matraz y finalmente se aforó.

- C) Para esta disolución se pesó 54.03 mg de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Iron (III) chloride hexahydrate,). En un vaso de precipitados de 10 ml se disolvió, con 2 ml de agua destilada los 54.03 mg de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente se agregó la disolución a un matraz aforado de 10 ml, se realizó tres enjuagues con 1 ml de agua destilada, se adiciono al matraz y finalmente se aforó.

Preparación de la disolución de FRAP

En un frasco ámbar se mezcló las siguientes cantidades de nuestras disoluciones.

- A. 40 ml de buffer de acetato
- B. 4 ml de la solución TPTZ (2,4,6 Tripiridil-s triazina).
- C. 4 ml de solución $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Curva de Trolox. (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchomane-2-carboxylic acid).

Para obtener la disolución madre Trolox, se pesó 12.5 mg de Trolox y se aforó a 50 mL (Concentración $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) con metanol al 80%, a partir de esta disolución se tomó las alícuotas indicadas en el siguiente cuadro y se aforo a 1 mL.

Cuadro 7.Alícuotas para determinar la curva de Trolox.

Alícuota de la disolución madre de Trolox (μL)	μL de metanol al 80%
20	980
30	970
40	960
50	950
100	900
150	850
200	800
400	600
600	400

Posteriormente en una microplaca de 96 pozos se colocó en cada pozo 20 μ L de las disoluciones Trolox y se le agrego 180 μ L de disolución FRAP, esto para obtener la curva de Trolox correspondiente. De cada una de las disoluciones se hace un ensayo por triplicado.

Para realizar la prueba con las muestras, se colocó en cada pozo de la microplaca 20 μ L de muestra de aceite esencial y se le agrego 180 μ L de la disolución FRAP, usando como blanco 200 μ L de la disolución FRAP, se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y posteriormente se midió los valores de la absorbancia en 595 nm. De cada muestra se hace un triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20	30	40	50	100	150	200	400	600	MUESTRAS		
B	20	30	40	50	100	150	200	400	600			
C	20	30	40	50	100	150	200	400	600			
D	20	30	40	50	100	150	200	400	600			
E												
F										BLANCO		
G												
H												

Figura 7. Configuración del ensayo FRAP en la microplaca.

Finalmente, con los resultados obtenidos de la curva de calibración de Trolox, se realizó una tabla de concentración y absorbancia, así como una gráfica que nos permitió calcular los micromoles equivalentes de Trolox por mililitro de muestra (μ mol ET/mL).

4.6. Método para la evaluación citotóxica

Prueba con *Artemia salina*

Para realizar la prueba de evaluación de toxicidad de las diferentes muestras de aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) se realizó empleando el método propuesto por Meyer et al., 1982 y Michael et al., 1956 con algunas modificaciones.

Como primer paso para la realización de la prueba fue necesario la eclosión de las larvas de *Artemia salina*, las cuales fueron obtenidas en la compra en un acuario local de Texcoco de Mora.

Ya que los quistes se deben eclosionar en un medio salino, se preparó en una pecera 228g de sal de mar y se disolvió en 6 L de agua destilada, para lograr una oxigenación del agua se colocó una bomba de aire para peceras y también un foco de 60 watts para mantener la temperatura del agua. Posteriormente se pesó 150 mg de los quistes de *Artemia salina* y se depositaron en la pecera, los quistes se mantuvieron en este medio por 24 horas para obtener las larvas (Figura 8).

Para realizar la evaluación de toxicidad se procedió a preparar las concentraciones del aceite esencial en acetona, se preparó una solución madre de cada aceite esencial a una concentración de $10,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ disolviendo 50 mg del aceite esencial en 5 ml de acetona. De la solución madre se realizaron cinco concentraciones de 0.1, 1, 10, 100, $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, de cada concentración se tomó 0.5 ml y se colocó en un vial de cristal, estos viales se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura ambiente para lograr su evaporación, de cada concentración se realizó tres repeticiones. Para el tratamiento testigo se colocó 0.5 ml de acetona en el vial.

Posteriormente de las 24 horas, el disolvente se evaporó y las larvas de *Artemia salina* eclosionaron en la pecera, en cada vial que contenía las concentraciones de prueba se depositaron 10 larvas, se aforó a un volumen de 5 ml con agua salina contenida de la pecera. Después se colocaron los viales en una incubadora para controlar la temperatura y la oxigenación (Figura 8), se dejó reposar durante 24 horas y pasado este tiempo se realizó el conteo de larvas vivas y muertas por vial.

Para el análisis estadístico de la prueba se tomaron los valores de las larvas muertas para hacer una estimación de la concentración Letal 50 (CL_{50}), empleando la función Probit.

Para la clasificación de toxicidad se empleó lo descrito por Meyer et al. 1982 y las recomendaciones de CYTED, 2014 (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Clasificación de toxicidad empleada en el trabajo.

I	Extremadamente tóxico	1-10	µg/mL
II	Altamente tóxico	10-100	µg/mL
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/mL
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/mL
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/mL
VI	Relativamente inocuo	>1500	µg/mL

Fuente CYTED, 2014



Figura 8. Eclosión de larvas de *Artemia salina* por 24 horas e incubación de larvas en equipo Incubadora de mesa con agitación orbital modelo INO 650M.

4.7. Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

Las muestras obtenidas de aceite esencial fueron analizadas mediante el equipo de cromatografía de gases (GC) acoplada a un espectrómetro de masas (MS) marca Agilent 6890 con una columna VF-5ms (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m de espesor de película) disponible en el Laboratorio de Productos Naturales del departamento de preparatoria agrícola (Figura 9).

Para la preparación de la muestra se utilizó 5 μ L de aceite esencial en 995 μ L de hexano grado HPLC, para el enjuague de la columna se utilizó hexano y acetona grado HPLC.

La temperatura inicial del horno fue de 70°C, se estableció la primera rampa de 2°C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 120°C posteriormente se aumentó la temperatura a 15 °C por minuto en la segunda rampa hasta alcanzar los 230 °C, se mantuvo la temperatura del inyector y del detector a 250°C, la velocidad de flujo se estableció a 0.7 mLmin⁻¹, se helio como gas acarreador. El análisis duro aproximadamente 35 minutos por muestra.

El método utilizado se expresa en la siguiente tabla:

Cuadro 9. Método para el análisis de muestras en equipo de Cromatografía de gases acoplado a masas

	Tasa °C	Valor	Tiempo de espera	Tiempo de ejecución
Inicial		70	0	0
Rampa 1	2	120	0	25
Rampa 2	15	230	2	34.333



Figura 9. Cromatografo de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas disponible en el Laboratorio de Productos Naturales UACH.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Rendimiento de extracto

Para el análisis de antioxidantes en aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*), se colectaron 12 muestras diferentes de hoja de laurel obtenido de distintos sitios naturales, así como establecimientos comerciales y mercados de la zona de Texcoco de Mora. En la tabla siguiente se muestra la información de fechas de colecta de cada muestra, así como su rendimiento en porcentaje, considerando la cantidad en gramos de cada muestra utilizada y la cantidad de aceite esencial en mL obtenida en el proceso por hidrodestilación, empleando un equipo tipo Clevenger (Ver Tabla 9).

Para calcular el rendimiento se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{\text{Masa del aceite}}{\text{masa de las hojas}} \right) \times 100$$

Cuadro 10. Rendimiento en porcentaje del aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*).

ID	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Fecha de proceso	Cantidad en gramos (g)	Fresco o seco	Cantidad (ml)	% en peso
1	El Nopalillo Hgo. Oyamel	10/10/2020	11/12/2020	100	Seco	1.43±0.404	1.43
2	El Nopalillo Hgo. Pino-Encino	10/10/2020	11/12/2020	100	Seco	1.37±0.289	1.37
3	El Nopalillo Hgo. Bosque Mixto	10/10/2020	11/12/2020	100	Seco	1.32±0.161	1.32
4	Centro comercial "Soriana"	10/12/2020	11/12/2020	100	Seco	1.32±0.355	1.32
5	Mercado "Texcoco Centro"	02/11/2020	03/11/2020	100	Seco	1.2±0.2	1.2
6	Mercado "Salitreria, Texcoco "	10/12/2020	11/12/2020	100	Fresco	1.17±0.153	1.17
7	Tienda Naturista "La Antiguaita"	04/02/2021	05/02/2021	100	Seco	1.13±0.153	1.13

8	Chignahuapan , Puebla	01/10/2020	02/12/2020	100	Seco	1.02±0.225	1.02
9	San Andrés Metla Edo. Méx	05/02/2021	05/02/2021	100	Fresco	0.97±0.252	0.97
10	Tienda Naturista "Los Cedros"	04/02/2021	05/02/2021	100	Seco	0.78±0.029	0.78
11	Zongolica, Veracruz.	11/01/2021	02/02/2021	100	Seco	0.63±0.153	0.63
12	Zongolica, Veracruz (Hoja- Semilla).	25/04/2021	28/05/2021	100	Seco	0.27±0.029	0.27

Fuente: Elaboración propia

El rendimiento obtenido de las muestras de laurel oscila entre 1.43% a 0.27%, el rendimiento más bajo se presentó en la muestra de hoja de laurel obtenidas en la región de Zongolica Veracruz y el rendimiento más alto lo presenta las muestras del ejido “El Nopalillo Hgo.”, con 1.43%,1.37% y 1.33%.

El rendimiento obtenido en este estudio es aún más alto que lo reportado por Jiménez et al, 2011, que con el método de hidrodestilación utilizando un equipo Clevenger obtuvo un rendimiento de 0.1% a 1.15% en aceite esencial de laurel aromático.

Camacho et al., 2011, de igual forma menciona que el rendimiento del aceite esencial es 0.1% a 1% del peso seco de la planta y Andreatta et al., 2012 indica que con el método por hidrodestilación se obtiene un rendimiento de 0.4%. En general el rendimiento de los aceites esenciales se encuentra en 0.01% y 2.00% (Moreno et al.,2010) tal como se puede observar en este trabajo.

Cabe resaltar que entre las muestras evaluadas existe una diferencia entre rendimientos, esto se debe a que las muestras fueron obtenidas de lugares con condiciones ambientales diferentes.

Stashenko et.al., (1997)., Menciona que existen factores que influyen en el rendimiento y composición de los aceites esenciales estos son las condiciones diferentes geobotánicas (altitud, clima, suelo, temperatura, precipitación, época de recolección y etapas fenológicas de la planta) y las condiciones de manejo en

cosecha y postcosecha (técnicas de cultivo y métodos de extracción de los aceites).

Uno de los factores que también afecta al rendimiento del aceite esencial es el manejo durante el corte de las hojas y el secado de estas ya que durante el corte se rompe tejidos celulares que contienen los aceites esenciales y durante el secado se pierde por la alta volatilidad (Vásquez et al., 2001).

5.2. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear

Los aceites esenciales obtenidos fueron analizados por sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y de ^{13}C , mismos que fueron determinados en un espectrómetro Agilent 400 MR DD2 (Santa Clara, CA, USA) operado a 400 MHz. Los desplazamientos químicos de ^1H fueron estimados en CDCl_3 , adicionando Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros mostrados, corresponden al resultado del procesamiento de los archivos FID, empleando el programa Mestrec versión 2.3^a.

Estudios previos del análisis y composición del aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) colectado en Veracruz, México, indica la presencia en cantidades abundantes de o-cimeno (**1**) ((25.86%), eucaliptol (**2**) (26.06%), terpinen-4-ol (**3**) (5.08%) y s-carvona (**4**) (1.85%) (Guzmán Gutiérrez et al, 2012).

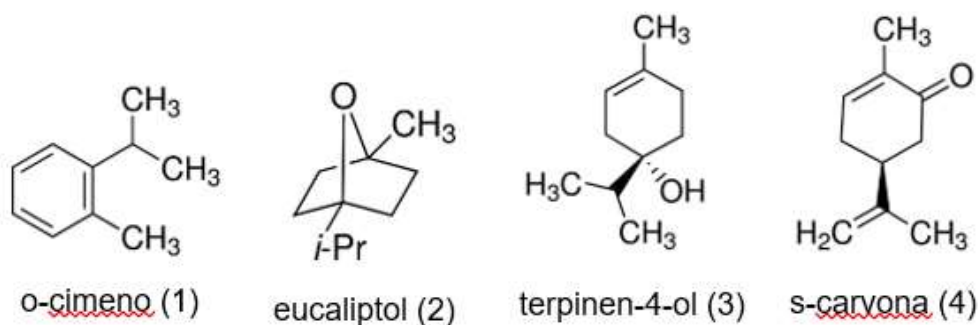


Figura 10. Estructura molecular de los metabolitos secundarios más abundantes aislados de laurel aromático (*Litsea glaucescens*).

Para realizar una comparación de los aceites de laurel aromático, fue necesario obtener los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C publicados por la empresa Sigma-Aldrich, mismos que se muestran en las figuras 11 (o-cimeno), figura 12 (eucaliptol), figura 13 (terpinen-4-ol) y figura 14 (s-carvona). De igual forma, se preparó por destilación utilizando el equipo Clevenger, el aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus cinerea*) recolectado en las áreas verdes del Departamento de Preparatoria Agrícola, UACH., los espectros de resonancia se muestran en la figura 15, esta acción se llevó para la comparación con muestra auténtica de eucaliptol, ya que las muestras vegetales de laurel contienen una gran cantidad del compuesto eucaliptol (2).



Figura 11. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Trazo inferior) y ^{13}C (Trazo superior) del o-cimeno 1 (RMN ^1H 300 MHz y ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 , TMS).

Fuente: Sigma-Aldrich

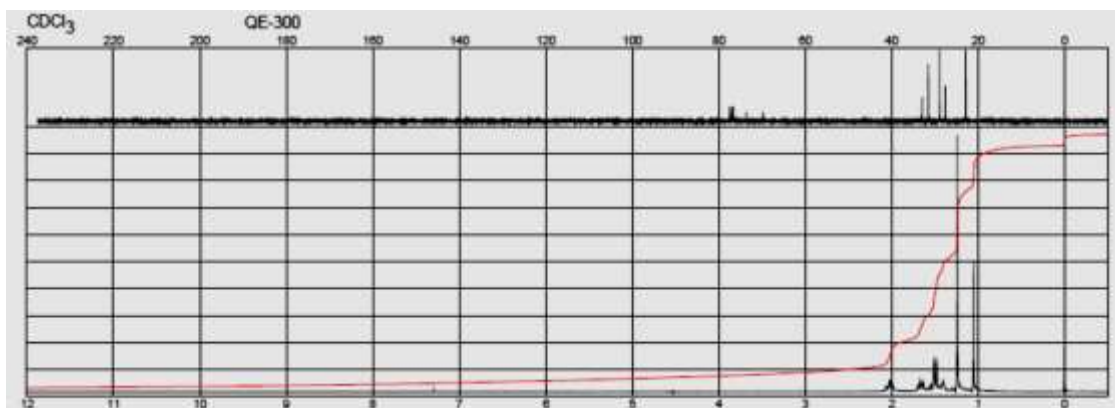


Figura 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Trazo inferior) y ^{13}C (Trazo superior) del eucaliptol 2 (RMN ^1H 300 MHz y ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 , TMS).

Fuente: Sigma-Aldrich

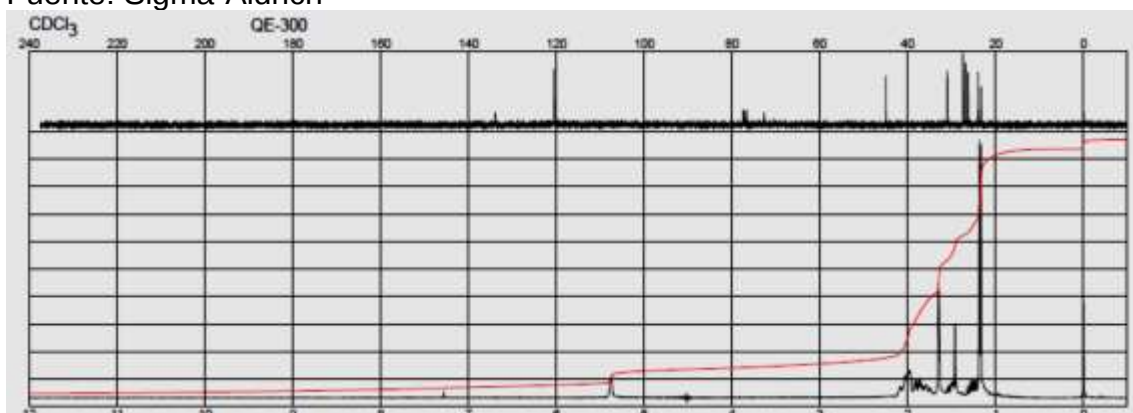


Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Trazo inferior) y ^{13}C (Trazo superior) del terpinen-4-ol 3 (RMN ^1H 300 MHz y ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 , TMS).

Fuente: Sigma-Aldrich

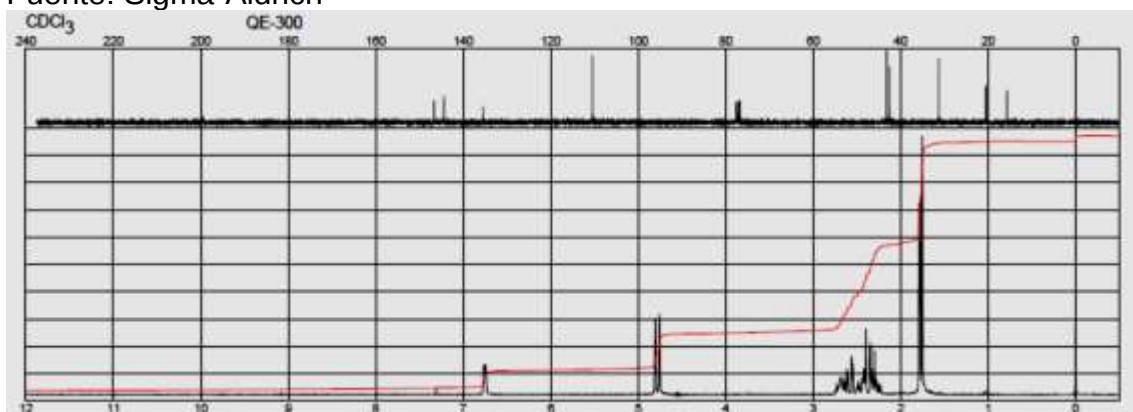


Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Trazo inferior) y ^{13}C (Trazo superior) de s-carvona 4 (RMN ^1H 300MHz y ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 , TMS).

Fuente: Sigma-Aldrich

En la comparación del espectro de RMN de ^{13}C publicado por Sigma-Aldrich para eucaliptol (**2**) con el determinado para el aceite esencial de eucalipto dólar (Figura 15) se observa que los carbonos $(\text{CH}_3)_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_3$ muestran un desplazamiento químico de 69.6 y 73.5 y ppm, información que el siguiente trabajo es importante ya que demuestra la presencia o ausencia de este metabolito secundario en los análisis con los extractos de laurel aromático.

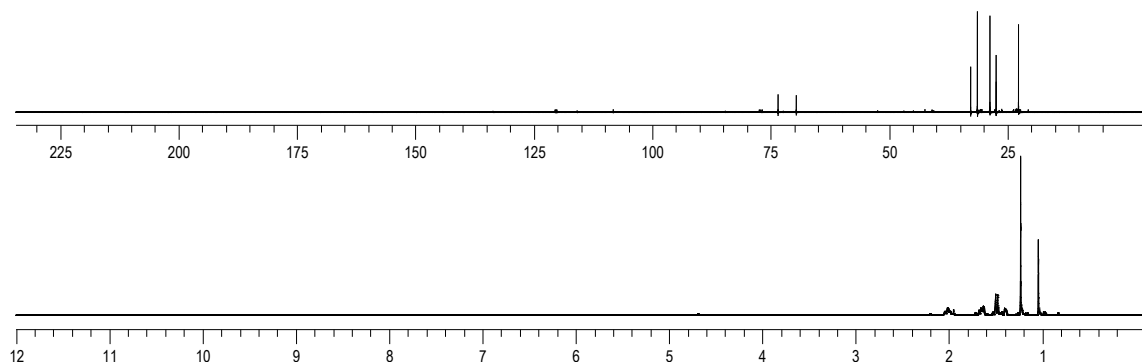


Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Trazo inferior) y ^{13}C (Trazo superior) de del aceite de eucalipto dólar (RMN ^1H 400MHz y ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , TMS)

Fuente: Elaboración en equipo de RMN.

Se realizó una comparación de los aceites esenciales de laurel aromático, el espectro de RMN de ^{13}C , mostró evidencias muy claras de las diferencias en los compuestos de eucaliptol, por ejemplo, al comparar el espectro del aceite esencial de Chignahuapan, Puebla. En esta muestra se observa una ausencia del compuesto eucaliptol, ya que las señales de resonancia mencionadas a 73.5 y 69.6 ppm, no se exhiben en el espectro de la figura 15 (Trazo intermedio), adicionalmente se observan señales claras a 213.5 y 212.2 ppm de cetonas, pudiendo tratarse de una muestra en descomposición y que la pérdida del eucaliptol se deba al tiempo de almacenamiento (Casi un año después para ser procesada). Por otro lado, la muestra obtenida del laurel aromático del Mercado Centro de Texcoco, si exhibe las señales características espectroscópicas para el eucaliptol, constituyendo una muestra aceptable para ser empleada o aprovechada en sus propiedades medicinales.

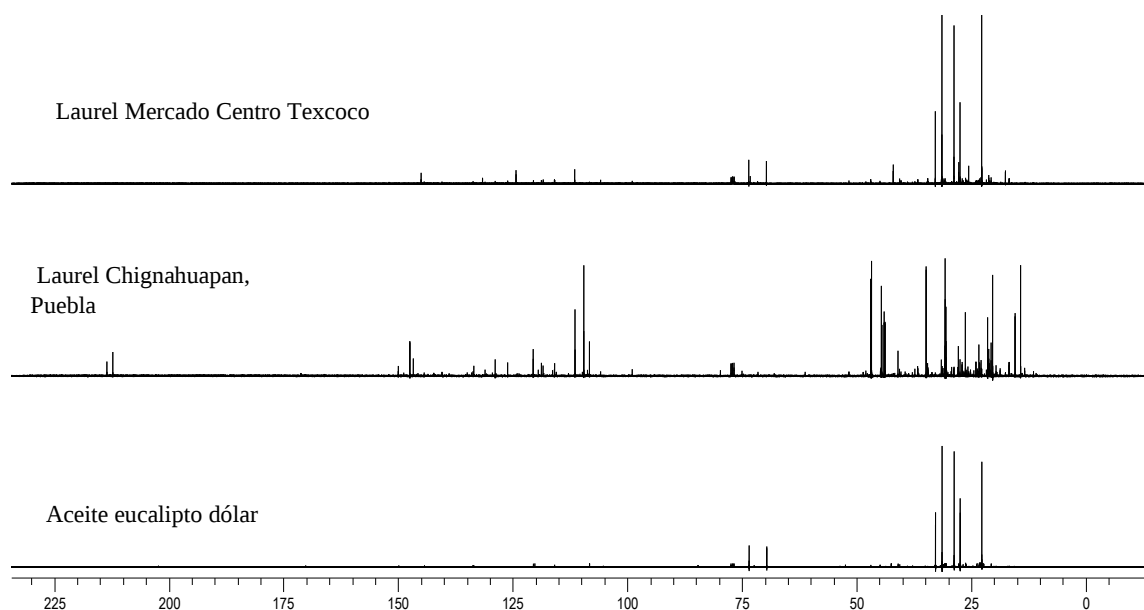


Figura 16. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , TMS) de los aceites esenciales de eucalipto dólar (trazo inferior), de laurel de Chignahuapan, Puebla (Trazo intermedio) y de laurel del Mercado Centro de Texcoco, México (Trazo superior)

En las muestras analizadas de aceite esencial de laurel aromático del sitio Salitrería, Texcoco, Edo de México, se observa en su espectro de RMN de ^{13}C evidencias claras de las diferencias en cuanto a la presencia de eucaliptol, ya que en dicha muestra se observa la ausencia del compuesto eucaliptol en 73.5 y 69.6 ppm, de igual forma se presentaron señales a 213.5 y 212.2 ppm de cetonas, como en la muestra de aceite esencial de Chignahuapan, Puebla, figura 16 (Trazo intermedio), por otro lado el aceite esencial del ejido “El Nopalillo” bosque de Oyamel, Hidalgo, se identifica claramente la presencia de eucaliptol de manera abundante (Figura 17, trazo superior). Cabe mencionar, que el aceite esencial de salitrería, Texcoco, da indicios de un material afectado por el medio ambiente, ya que no corresponde a una muestra previamente cosechada y almacenada, sino que fue colectada de manera fresca.

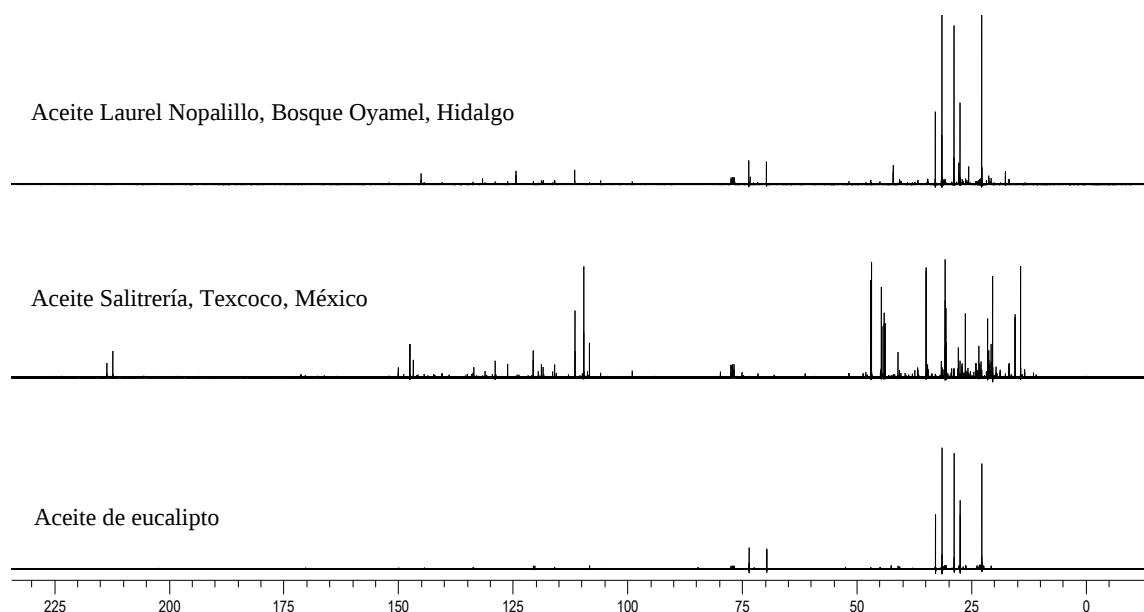


Figura 17. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , TMS) de los aceites esenciales de eucalipto dólar (trazo inferior), de laurel de Salitrería, Texcoco (Trazo intermedio) y de laurel de El Nopalillo, Oyamel, Epazoyucan, Edo de Hidalgo (Trazo superior).

En este proyecto también se descartó la presencia del segundo metabolito más abundante descrito previamente por Guzmán Gutiérrez et al, 2012, el o-cimeno¹. Esta comparación se llevó a cabo en las muestras de laurel aromático del ejido El Nopalillo, Epazoyucan, Hidalgo, ya que al comparar el espectro (Figura 18) de RMN de ^1H (expansión en el trazo inferior) con el publicado por la empresa Sigma-Aldrich (Expansión en el trazo superior), no se observa la señal séptuple característica en 3.15 ppm del grupo isopropilo ($\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), ni las señales típicas de los hidrógenos del anillo aromático de 7 a 7.2 ppm, como se muestra en la figura 18. Tampoco fue posible detectar la presencia de terpineol **3** al no reconocerse señales de RMN como las mostradas en el espectro de la figura 13, y de carvona **4**, debido a que en el mismo espectro (Figura 18, trazo inferior), no es posible observar las dos señales para dos hidrógenos de alqueno del grupo isopropileno en 4.8 ppm, cuya forma de esta señal se muestra en el espectro de la figura 14.

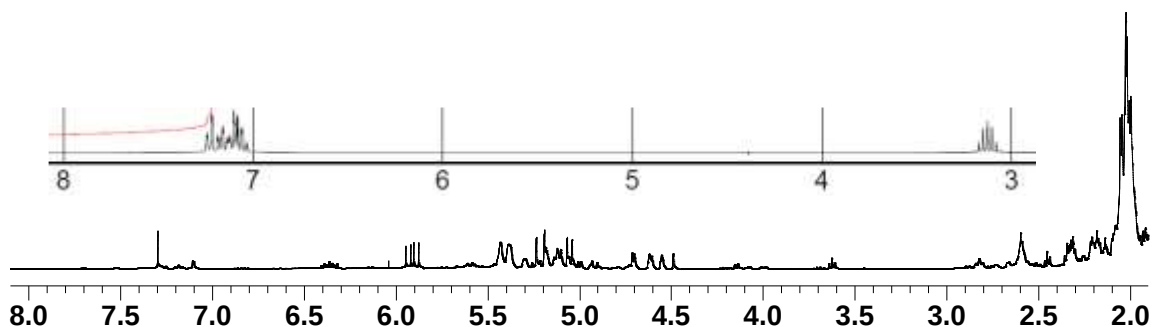


Figura 18. Expansiones de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN- ^1H 400 MHz, CDCl_3 , TMS) del aceite esencial de El Nopalillo, Epazoyucan, Hidalgo (trazo inferior), y del publicado por la empresa Sigma-Aldrich, (RMN- ^1H 300 MHz, CDCl_3 , TMS) para o-cimeno **1**, (Trazo superior).

5.3. Capacidad Antioxidante de laurel aromático

En este estudio se emplearon dos tipos de ensayos para determinar la capacidad antioxidante (CA) en aceite esencial de laurel aromático.

La capacidad antioxidante analizado por el método ABTS se encuentra entre $12.89 \pm 0.273 \mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$ y $4.99 \pm 0.031 \mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$, mientras que la capacidad antioxidante medida con el método FRAP oscila entre los 0.17149 a 0.00682 $\mu\text{mol ET}/\text{mL}$.

Además, en este estudio se analizó una muestra de eucalipto dólal (*Eucalyptus cinérea*) para hacer una comparación en su capacidad antioxidante ya que el 1,8-cineol es uno de los principales componentes reportados en el laurel aromático, se observa que esta muestra es la que presenta la menor capacidad antioxidante en los dos métodos.

Cuadro 11. Capacidad antioxidante del aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*)

ID	Nombre de la muestra	Ensayo ABTS+ CA ($\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$)	Ensayo FRAP CA ($\mu\text{mol ET}/\text{mL}$)
<i>Muestras obtenidas en campo</i>			
1	Zongolica, Veracruz (Hoja-Semilla).	12.89 ± 0.273	0.031 ± 0.0016
2	Zongolica, Veracruz.	10.72 ± 0.373	0.103 ± 0.0062
3	Chignahuapan, Puebla	10.11 ± 0.015	0.010 ± 0.0004
4	San Andrés Metla Edo. Méx	9.08 ± 0.523	0.064 ± 0.0034
5	El Nopalillo Hgo. (Oyamel)	3.72 ± 0.186	0.007 ± 0.0009
6	El Nopalillo Hgo. (Bosque Mixto)	3.58 ± 0.067	0.013 ± 0.0006
7	El Nopalillo Hgo. (Pino-Encino)	3.45 ± 0.220	0.026 ± 0.0003
8	Eucalipto Dep. Preparatoria Agrícola	1.53 ± 0.019	-----
<i>Muestras obtenidas en tiendas y centros comerciales</i>			
9	Centro comercial "Soriana"	10.95 ± 0.229	0.171 ± 0.0035
10	Tienda Naturista "Los Cedros"	10.67 ± 0.351	0.060 ± 0.0003
11	Mercado "Salitrería, Texcoco "	8.01 ± 0.042	0.051 ± 0.0031
12	Mercado "Texcoco Centro"	7.58 ± 0.096	0.045 ± 0.0017
13	Tienda Naturista "La Antigüita"	4.99 ± 0.031	0.018 ± 0.0011

Fuente: Elaboración propia

Las muestras analizadas del ejido "El Nopalillo" presentan valores similares con el ensayo ABTS+, ya que los valores se encuentran entre 3.454 a 3.722 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$, sin embargo, estas muestras se colectaron en diferentes estratos de vegetación (Pino-encino, Oyamel y Bosque Mixto), en donde los factores de intensidad de luz, densidad de vegetación y niveles altitudinales marcan una ligera diferencia en los valores de CA.

La literatura menciona que dentro de los principales componentes del laurel aromático se encuentran 1,8-cineol con 22% (López et al., 1995), sin embargo, Lee, S. J., 2005 menciona que el 1,8-cineol no se distingue como principales antioxidantes, por lo que se puede explicar que la muestra del aceite esencial de eucalipto no tiene esta capacidad antioxidante.

Los resultados indican que 12 de los 13 aceites evaluados presentan capacidad antioxidante, independientemente de la técnica utilizada para medir la capacidad antioxidante. Algunos autores asocian esta actividad biológica al contenido de fenoles presentes en los aceites esenciales (Arango et al., 2012), Sánchez et al., (2020), mencionan que también los componentes de tipo terpenos pueden influir en esta actividad

En un estudio realizado por Politeo, O. 2006, menciona que la capacidad antioxidante en aceites esenciales de laurel se debe al contenido alto metil-eugenol con 13.5%.

5.4. Determinación de la citotoxicidad del aceite esencial

El resultado de la evaluación de la concentración letal media (CL₅₀) para las muestras de aceite esencial de *Litsea glaucescens* realizada con el bioensayo de *Artemia salina*, presentó una CL₅₀ de 53.8 µg/mL a 451.6 µg/mL, respectivamente.

De acuerdo con la clasificación descrita por Meyer et al. (1982). y la clasificación de toxicidad según CYTED (2014), los resultados obtenidos del CL₅₀ en este trabajo se encuentran con un valor II (10-100 µg/ mL) y II (100-500 µg/ mL), las muestras que presentaron una moderada toxicidad se encuentran en un rango de 175.5 µg/mL a 451.6 µg/mL, mientras que los de una alta toxicidad se encuentran entre 53.8 µg/mL a 94.8 µg/mL. La muestra analizada de aceite esencial de eucalipto mostró un valor de 683 µg/mL, que lo clasifica como ligeramente toxico.

Cuadro 12. Evaluación de la toxicidad (CL50) de extractos *Litsea glaucescens* mediante el modelo de *Artemia salina*

Extractos	Porcentaje de muertes en 24 horas concentraciones evaluadas en $\mu\text{g/ml}$					Límites al 95%*		
	10000	1000	100	10	1	CL50 ($\mu\text{g/mL}$)	LI	LS
Centro comercial "Soriana"	100	60	50	36	30	53.8	2.4	110.0
Zongolica, Ver. (hojas)	100	56	50	36	23	59.0	5.7	123.6
San Andrés Metla, Mex.	100	53	43	40	30	73.7	22.4	169.7
Zongolica, Ver. (HOJAS-Semilla)	100	56	46	33	26	86.4	3.7	176.5
Nopalillo, Hgo. (Mixto)	100	50	46	33	23	94.8	27.4	216.9
Chignahuapan, Pue.	100	46	36	33	26	175.5	66.9	418.0
Tienda Naturista "Los cedros"	100	46	36	30	26	198.9	61.6	459.3
Mercado Texcoco (centro)	100	46	36	30	26	198.9	61.6	459.3
Texcoco "Salitrería"	100	56	33	26	23	202.8	9.1	414.7
Nopalillo, Hgo. (Pino-Encino)	100	46	36	33	16	223.9	36.7	484.4
Tienda Naturista "La antigüita"	100	46	33	30	16	283.1	26.4	592.5
Nopalillo, Hgo. (Oyamel)	100	43	26	23	23	451.6	95.0	998.2
Eucalipto	97	34	30	26	16	683.0	188.4	1309.6

Fuente: Elaboración propia

El potencial citotóxico de los aceites extraídos también se observa en otras especies de la familia laurácea (Cuadro 12), además se han hecho estudios de los posibles beneficios que poseen este grupo de plantas, (De et al. 2009) realizó estudios de aceite esencial de *L. canella* y *A. canelilla*, las cuales presentaron niveles altos de bencenoides (benzoato de bencilo y 1-nitro-2-feniletano, respectivamente), también realizó una prueba contra *Leishmania amazonensis*

donde *L. canella* resulto ser más activo. (Uddin et al. 2020) menciona que además cuentan con efectos antidiarreicos significativos, junto con efectos antioxidantes y efectos trombolíticos ligeros.

En los estudios realizados por (Agius et al., 2007) evaluaron la citotoxicidad in vitro contra células MCF-7; e inhibición de la cisteína proteasa cruzina, donde los aceites de *C. paratrilinerve* y *O. endresiana* fueron notablemente citotóxicos en las células MCF-7 (> 97 % de muerte a 100 µg/ml), además el aceite de *O. endresiana* mostró inhibición de la cruzina (IC50 <20 µg/ml).

(Schmidt et al. 2007)realizo estudios en *Cinnamomum tonduzii*, *Nectandra membranacea* y *Ocotea floribunda* las cual mostraron 2.9, 23.4 y 34.7 % de destrucción contra MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama con receptor de estrógeno negativo), *Nectandra membranacea* y *Ocotea floribunda* mostraron bioactividad de 23.4 y 34.7% en MCF-7 (adenocarcinoma de mama con receptor de estrógeno positivo), *Cinnamomum tonduzii* y *Nectandra membranacea* obtuvieron 8.5 y 99 % de efectividad en SK-Mel-28 (melanoma maligno), *Nectandra membranacea* también mostro 7.8% de efectividad en PC-3 (carcinoma prostático).Estas especies de igual forma presentaron actividad antibacteriana contra *B. cereus* y *S. aureus*.

En estudios de *Litsea angulata*, demostraron que el aceite esencial es no toxico, pero podría considerarse como un agente antimicrobiano potencial contra patógenos orales como *S. mutans* y *S. sobrinus* (Kuspradini et al., 2020.)

Por otro lado (Hammid and Ahmad, 2015.) realizaron estudios en aceite esencial de *litsea cubeba*, los resultados en los ensayos con *Artemia salina* demostrado una alta toxicidad, además se observó un amplio espectro de inhibición (19,5 y 46,7 mm) contra microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en cuanto a levaduras y hongos su alcance fue de 10.5 y 90.0 mm.

Estos estudios nos indican la importancia que la familia laurácea presenta en el ámbito bioquímico y los posibles usos a desarrollar. La comparación con los

resultados en este trabajo posibilita la realización en estudios avanzados y específicos en el área de la bioquímica.

Cuadro 13. Estudios citotóxicos con el ensayo de *Artemia salina* en especies de la familia laurácea

Especie	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	Autor
<i>Actinodaphne angustifolia</i>	---	424.16	(Uddin et al. 2020)
<i>Aniba canelilla</i>	Aceite esencial	68.37	(De et al. 2009)
<i>Beilschmiedia brenesii</i>	Aceite esencial	9.05	(Agius et al., 2007)
<i>Cinnamomum paratriplinerve</i>	Aceite esencial	8.07	(Agius et al., 2007)
<i>Cinnamomum tonduzii</i>	Aceite esencial	37.9	(Schmidt et al. 2007)
<i>Licaria cannella</i>	Aceite esencial	5.25	(De et al. 2009)
<i>Litsea angulata</i>	Aceite esencial	784.24	(Kuspradini et al., 2020.)
<i>Litsea cubeba</i>	Aceite esencial	25.1 – 30.9	(Hamid and Ahmad, 2015.)
<i>Litsea monopetala</i>	extracto metanólico	41.05	(Hossain et al.,2017)
<i>Nectandra membranacea</i>	Aceite esencial	3.7	(Schmidt et al. 2007)
<i>Ocotea bicolor</i>	Aceite esencial	40.10	(Damasceno et al. 2017)
<i>Ocotea endresiana</i>	Aceite esencial	6.93	(Agius et al., 2007)
<i>Ocotea floribunda</i>	Aceite esencial	3.7	(Schmidt et al. 2007)
<i>Ocotea notata</i>	Aceite esencial	2.73	(Garrett et al. 2010)
<i>Ocotea nutans</i>	Aceite esencial	71,70	(Betim et al. 2019)
<i>Ocotea paranaensis</i>	Aceite esencial	147.91	(Gribner et al. 2020)
<i>Persea americana</i>	Hexano	2370	(Jaime et al. 2009.)

Fuente: Elaboración propia

En el aspecto del análisis de citotoxicidad el modelo de *Artemia salina* es una prueba que se ha usado para medir la toxicidad de extractos desde hace tiempo (Budaraga et al., 2016) y con este método se puede determinar de manera preliminar la toxicidad de una gran diversidad de especies vegetales en todo el mundo (Fernández Calienes et al., 2009; Hamidi et al., 2014; Aranda Ventura et al., 2018), por lo que este modelo tiene una gran importancia en investigaciones

de carácter bioquímico para explicar la actividad biológica de algunas especies que en México por su gran diversidad y su cultura en el uso de plantas medicinales son usadas para tratar algunos padecimientos.

5.4. Análisis por Cromatografía de gases acoplado a masas

Las muestras del aceite esencial de laurel aromático mostraron una presencia predominante de los siguientes compuestos: 34.99 % de Eucaliptol (1,8-cineol), 7.45% de 1R- α -Pineno, 6.51% de L-Limoneno, 5.26 % de trans-dihidrocarvona, 4.62% de (-)- β -Pineno, 4.46 % de acetato de bormilo, 4.11 % de trans-4-Tujanol, 3.85 % de Canfeno, 3.06 % de γ -terpineno y 2.91% de Cariofileno (Cuadro 14).

Sin embargo, una de las muestras analizadas presentó una diferencia en sus compuestos (Cuadro 15). La muestra de Zongolica Ver., presentó una variación notable en su cromatografía de gases, los principales componentes de la muestra fueron: 51.60 % de β -ocimeno, 24.20 % de β -linalol, 5.07 % de (-)-limoneno, 3.99 % de β -trans-ocimeno y 1.25 % de Cariofileno.

Estos compuestos también se encuentran disponibles en otras especies de la familia Laurácea como: *Ocotea bicolor* (Damasceno et al. 2017), *Ocotea notata* (Garrett et al. 2010), *litsea cubeba* (Hamid y Ahmad, 2015.), *Litsea angulata* (Kuspradini et al., 2020), *Licaria canella* y *Aniba canelilla* (De et al. 2009).

Guzmán Gutiérrez et al, 2012, menciona que en análisis de aceite esenciales de laurel aromático obtenidos de Veracruz se observó la siguiente presencia de compuestos o-cimeno (25.86%), eucaliptol (26.06%), terpinen-4-ol (5.08%) y s-carvona (1.85%), sin embargo la muestra de Zongolica, Ver., se observa solo el compuesto β -ocimeno, como compuesto predominante.

Por otro lado, Jiménez Pérez et al. 2011, en un estudio con *Litsea spp* reportaron principalmente compuestos de monoterpenos, eucaliptol, linalol, α - y β -pineno, terpinen-4-ol, β -cimeno, α -terpineol, Cariofileno y óxido de Cariofileno como principales compuestos predominantes.

Lozcano. et al (2019), también realiza un estudio del perfil aromático de *Litsea glaucescens* en donde se observa que los principales componentes son linalool, γ -terpineno, β -cimeno, 2-norpineno, (-)-terpinen-4-ol y (-)- β -pineno.

Algunos estudios realizados en el compuesto eucaliptol han mostrado eficacia en alivio de problemas estomacales, efectos antiespasmódicos y como miorrelajante intestinal (Magalhaes et al. 1998). También Santos y Rao 2001, informaron una protección gástrica en ratas, lo que sugiere un posible efecto antioxidante.

De los compuestos presentes en este estudio, el compuesto eucaliptol y al terpinen-4-ol se le han atribuido efectos inflamatorios (Santos y Rao 2000).

Un compuesto también importante es linalool, presente en *L. guatemalenses*, la cual se encuentra en varias especies de plantas aromáticas y este monoterpeno cuenta con efectos antiinflamatorios antisépticos, sedantes y antinociceptivos (Sugawara et al. 1998; Mazzanti et al. 1998; Peana et al. 2002)

Algunos estudios sobre aceites esenciales de origen vegetal muestran que el contenido de monoterpenos favorece el uso como antimicrobianos y antifúngicos (Garcia et al., 2008; Marchese et al., 2017; Tardugno et al. 2017).

De igual forma autores mencionan que la presencia de compuestos α - y β -pinenos en la familia laurácea muestran mayor letalidad en *Artemia salina* (Schmidt et al. 2007)

En cuanto al uso condimentario, Jiménez Pérez et al. 2011 menciona que las especies de *Litsea* con presencia de 1,8-cineol (eucaliptol) son las más usadas y este compuesto es el asociado al olor agradable y el sabor astringente.

Finalmente, en este análisis se puede observar que existe una diferencia en los compuestos de aceites esenciales, Ghasemi et al., 2013 indica que algunos factores como la altitud, el manejo agronómico y las condiciones ambientales influyen en la composición del aceite esencial. Acevedo et al., 2013, también refiere que el hábitat influye y modifica el contenido en los aceites esenciales.

Estudios demuestran que las diferencias en el estrés abiótico o estrés hídrico, provoca cambios en la emisión y acumulación de compuestos orgánicos volátiles en las plantas (Wink,.2003; Edreva et al, 2008 y Bistgani et al, 2017).

Esto podría justificar la diferencia en compuestos ya que las muestras de laurel del Cuadro 13 fueron obtenidas en un medio natural con una altitud de 2954msnm a 3031 msnm, cuenta con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura entre los 12°C a 18°C y precipitación de 500 mm a 1100 mm (INEGI, 2010).

Mientras que los resultados del cuadro 14., fueron obtenidas en la zona de Zongolica donde presentan condiciones de 2000 msnm, con un clima semicálido húmedo con lluvias todo el año, temperatura entre los 14°C a 26°C y una precipitación de 2400 mm a 3100mm (SEFIPLAN,2016).

Cuadro 14. Composición de aceites esenciales de laurel aromático (*Litsea glaucescens*)

Compuesto	Tiempo de retención	% V/V	IK calculado	IK teórico
<i>Thujene</i>	5.503	0.96	925.75	925
<i>1R-α-Pinene</i>	5.749	7.31	934.69	922
<i>Camphene</i>	6.226	3.85	952.04	967
<i>Sabinen</i>	6.829	1.23	973.96	967
<i>(-)-β-Pinene</i>	7.048	4.62	981.93	965
<i>Nopinen</i>	7.226	1.49	988.40	980
<i>α-Phellandrene</i>	7.929	0.0025	1009.33	1006
<i>Bornene</i>	8.304	1.53	1018.44	932
<i>o-Cymene</i>	8.59	2.25	1025.39	1042
<i>L-Limonene</i>	8.784	6.01	1030.11	1018
<i>Eucalyptol</i>	8.955	34.99	1034.26	1059
<i>cis-β-Ocimene</i>	9.337	0.78	1043.55	1053

<i>γ</i> -Terpinene	9.927	3.06	1057.89	1051
<i>trans</i> -sabine hydroxido	10.447	0.43	1070.52	1041
Terpinolene	11.135	0.71	1087.24	1081
<i>α</i> -Ocimene	11.696	0.48	1100.69	1041
<i>L</i> -Limonene	11.871	0.50	1104.02	933
<i>β</i> -Terpinene	13.008	0.23	1125.66	1051
Limona ketone	13.339	0.14	1131.96	1131.2
1 <i>R</i> - <i>α</i> -pinene	13.909	0.14	1142.81	922
<i>α</i> -Terpineol	15.399	0.07	1171.16	1193
<i>endo</i> -Borneol	15.535	0.04	1173.75	1199
<i>trans</i> -4- <i>Thujanol</i>	15.978	4.11	1182.19	1075
<i>L</i> - <i>α</i> -Terpineol	16.763	0.35	1197.13	1143
<i>trans</i> -Dihydrocarvone	16.947	2.76	1200.56	1200
<i>trans</i> -Dihydrocarvone	17.315	2.50	1206.84	1200
Carveol	18.095	0.45	1220.13	1206
Carveol	18.851	0.52	1233.02	1206
(-) Carvone	19.552	0.15	1244.97	1190
Bormyl acetato	21.872	4.46	1284.52	1269
4-terpinenyl acetato	22.558	0.38	1296.22	1332
Isolimonene	23.067	0.26	1306.33	990
(+)-Camphene	23.575	0.46	1317.53	943
Myrtenyl acetato	24.751	0.62	1343.46	1314
(+)-(E)-Limonene oxide	25.101	0.14	1351.18	
<i>D</i> -Limonene	25.504	1.24	1360.07	118
carveol	26.03	0.83	1371.66	1206
caryophyllene	27.806	2.91	1425.51	1493
<i>α</i> -Bergamotene	28.081	0.34	1439.79	1407
humulene	28.55	0.38	1464.16	1579
Germacrene D	29.009	0.19	1488.00	1515
<i>γ</i> -Gurjunene	29.257	0.30	1501.31	1469
pulegon	29.461	1.51	1517.03	1212

<i>γ-Cadinene</i>	29.578	0.25	1526.04	1514
<i>hemulene</i>	29.854	0.77	1547.30	
<i>(-)-carvone</i>	30.169	0.20	1571.57	
<i>Caryophyllene oxide</i>	30.482	0.20	1595.69	1507
<i>1,8-Cyclopentadecadiyne</i>	30.695	0.18	1615.48	
<i>(Z)-α-trans- Bergamotol</i>	31.12	0.53	1657.40	1673

Cuadro 15. Composición de aceites esenciales de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) en muestra Zongolica Ver.

Compuesto	Tiempo de retención	% V/V	IK calculado	IK teórico
<i>1R-α-Pinene</i>	5.746	0.591	934.6	948
<i>Camphene</i>	6.222	0.33	951.9	958
<i>Sulcatone</i>	7.068	0.284	982.7	990
<i>(-)-β-Pinene</i>	7.232	0.138	988.6	980
<i>α-Phellandrene</i>	9.69	0.091	1009.1	969
<i>o-cymnene</i>	10.42	0.13	1025.4	1042
<i>(-)-Limonene</i>	10.18	5.073	1030.0	1018
<i>β-trans-Ocimene</i>	10.34	3.99	1033.1	1034
<i>β-Ocimene</i>	10.41	51.6	1044.8	1041
<i>2-Isopropenyl-5-methylhex-4-enal</i>	10.46	0.239	1070.9	1092
<i>Terpinolene</i>	11.14	0.064	1087.4	1052
<i>L-Verbenone</i>	11.34	0.126	1092.3	1119
<i>β-Linalool</i>	11.75	24.198	1101.8	1082
<i>3-Methyl-3-butenyl isovalerate</i>	12.23	0.359	1110.8	1015
<i>(4E, 6Z)-allo-ocimene</i>	13.11	0.3	1127.6	1131

<i>(3Z,5Z)-2,7-Dimethyl-3,5-octadiene</i>	13.43	0.267	1133.7	903
<i>7-Methyl-3,4-octadiene</i>	13.67	0.704	1138.2	
<i>α-Terpineol</i>	16.74	0.519	1196.8	1143
<i>1-(1,3-Dimethyl-3-cyclohexen-1-yl) ethanone</i>	17.917	0.1	1217.1	1161
<i>Ylangene</i>	26.40	0.095	1379.9	1345
<i>Copaene</i>	26.61	0.271	1384.5	1397
<i>(-)-Aristolene</i>	26.86	0.063	1389.9	1403
<i>Caryophyllene</i>	27.81	1.246	1425.5	1494
<i>Humulene</i>	28.55	0.345	1464.3	1456
<i>Muurolene</i>	28.89	0.752	1481.8	1435
<i>α-Guaiene</i>	29.15	0.42	1495.2	1436
<i>Azulene</i>	29.26	0.687	1501.1	1469
<i>Y-Muurolene</i>	29.51	0.392	1520.8	1494
<i>Naphthalene</i>	29.57	1.053	1525.6	1514
<i>α-Farnesene</i>	30.10	0.768	1566.1	1486
<i>Caryophyllene oxide</i>	30.48	0.78	1595.8	1507
<i>Ledene oxide-(II)</i>	30.81	0.224	1527.2	1682
<i>2-Naphthalenemethanol</i>	31.03	0.386	1548.8	1627
<i>α-Muurolene</i>	31.12	0.243	1557.5	1490
<i>β-Eudesmene</i>	31.30	0.811	1575.3	1478
<i>(Z)-β-Farnesene</i>	31.75	0.071	1723.1	1440
<i>geranyl-α-terpinene</i>	33.27	0.016	1900.3	1962

6. CONCLUSIONES

El laurel aromático se ha usado en muchas partes de México y por mucho tiempo como medicina tradicional, en ceremonias y actualmente como condimento, por lo que su importancia en el país es alta, sin embargo, se encuentra dominada como una especie en peligro de extinción en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2019, por lo que se necesita de programas de manejo para lograr un aprovechamiento sostenible.

En este trabajo se analizó el rendimiento del aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) recolectado en varias accesiones. Existe una variación de rendimiento de 0.267% a 1.433%, donde el rendimiento más bajo lo presenta el sitio de Zongolica, Veracruz (Hoja- Semilla), sin embargo, esta muestra es la que presenta un valor alto de capacidad antioxidante con el método ABTS+ con 12.89 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$.

Todos los aceites esenciales de laurel presentan actividad antioxidante de 3.45 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$ a 12.89 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$ analizado con el método ABTS+, por lo que esta especie forestal no maderable proporciona una opción de aprovechamiento en el ámbito industrial.

El laurel aromático del ejido el Nopalillo cuenta con una capacidad antioxidante promedio de 3.5 $\mu\text{mol ET}/\mu\text{L}$, lo que indica que no existe diferencias significativas entre ellas a pesar de estar en diferentes tipos de vegetación.

El potencial citotóxico de los aceites analizados presenta un valor de alta toxicidad (CL50: 53.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a CL50: 94.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y moderada toxicidad (175.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 451.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo que hace que sea de importancia farmacológica para posteriores estudios.

Las muestras señalan al eucaliptol (1,8-cineol) como compuesto predominante en el aceite esencial de laurel, sin embargo, existen diferencias entre muestras, principalmente grado de presencia y en algunos casos cambia significativamente su composición.

Es posible considerar que el aceite esencial de *L. glaucescens* podría utilizarse como aditivo antimicrobiano, antiinflamatorios, antiespasmódico y se deben de realizar estudios sobre células cancerígenas in vitro ya que los compuestos presentes en la muestra cuentan con propiedades benéficas.

La capacidad antioxidante, actividad citotóxica y presencia de compuestos de las muestras recolectadas en diferentes sitios presenta diferencias significativas, por lo que se debe de realizar estudios de comparación entre factores geobotánicas, técnicas de cultivo y manejo postcosecha.

7. LITERATURA CITADA

- Acevedo, D., Navarro, M., Monroy, L. (2013). Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). Información tecnológica. 24:43-48
- Agius BR, Setzer MC, Stokes SL, Walker TM, Haber WA, Setzer WN. (2007). Composition and bioactivity of essential oils of Lauraceae from Monteverde, Costa Rica. *Int J Essent. Oil Ther.*;1:167-171.
- Allen C.K. (1945). Studies in the *Lauraceae* VI. Preliminary survey of the Mexican and Central American species. *Journal of the Arnold Arboretum* 26:280-434
- Almaguer González José Alejandro. (2009). Ley Marco en Materia de Medicina Tradicional. Propuesta elaborada para el Parlamento Latinoamericano. Rescatado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/38477/LeyMarcoMedicinaTradicional.pdf>
- Andreatta, E. A., Longo, B. M., Utrera, C., Saavedra, M. y Foco, G. (2012). Caracterización de Aceites Esenciales del Departamento San Justo (Córdoba). Jornadas de Ciencia y Tecnología. Universidad Tecnológica Nacional de Villa María, Córdoba, Argentina.
- Annan, K., & Houghton, P. J. (2008). Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. *Journal of ethnopharmacology*, 119(1), 141–144. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.017>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- Aranda Ventura, J., Villacrés Vallejo, J., Núñez Tuesta, L., Marín Sisley, P., Nonato Ramírez, L., González-Aspajo, G. (2018). Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de *Artemia salina*. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* 3 (3):132-137. DOI: <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2018.33.93>
- Arango, O. A., Pantoja, D., Santacruz, L, Hurtado A. (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* HBK) del Alto Patía, Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 10 (2), 79-86.
- Arcanjo, D.D.R., Albuquerque, A.C.M., Melo-Neto, B., Santana, L.C.L.R., Medeiros, M.G.F., Citó, A. M. G. L. (2012). Bioactivity evaluation against *Artemia salina*

- Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology* 72(3):505-509. DOI: 10.1590/S1519-69842012000300013
- Argueta, A., L. Cano y M. Rodarte. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 3:883-884. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F.
- Barragán Solís, Anabella. (2006). "La práctica de la autoatención por fitoterapia en un grupo de familias mexicanas", en *Archivos en Medicina Familiar*, vol. 8, pp. 155-162.
- Benzie, I, F.F, y Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power". *The FRAP Assay Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Betim, Fernando Cesar Martins, Camila Freitas de Oliveira, Angela Maria de Souza, Ellis Marina Szabo, Sandra Maria Warumby Zanin, Obdulio Gomes Miguel, Marilis Dallarmi Miguel, and Josiane de Fátima Gaspari Dias. (2019). "Ocotea Nutans (Nees) Mez (Lauraceae): Chemical Composition, Antioxidant Capacity and Biological Properties of Essential Oil." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 55. doi: 10.1590/s2175-97902019000118284
- Bezerra, J.W.A., Costa, A.R., da Silva, M.A.P., Rocha, M.I., Boligon, A.A., da Rocha, J.B.T., Barros, L.M., Kamdem, J.P. (2017). Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. *South African Journal of Botany* 113:437–442. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.003>.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2014). *Litsea glaucescens*. Laurel silvestre. Página electrónica UNAM Biodiversitas 12:1-7
- Bistgani, Z. E; Siadat, S. A.; Bakhshandeh, A.; Pirbalouti, A G.; Hashemi, M. (2017). Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenesis* Celak. *The Crop Journal*, 5(5):407-415
- Blumenthal, M. (1998). "The complete German Commission E Monographs", Ed. American Botanical Council, Texas.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. Segunda Edición. Acribia. Zaragoza
- Budaraga, I.K., Arnim, Y. M., Bulanin, U. (2016). Toxicity of liquid smoke cinnamon (*Cinnamomum Burmannii*) production of ways for purification and different concentration. *International Journal of Scientific and Research Publications* 6(7):13-21.

- Calienes, V.A.F, Mendiola, M.J., Monzote, F.L., García, P.M., Sariego, R.I., Acuña, R.D., Scull, L. R., Gutiérrez, G.Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 61(3):254-258.
- Calixto, J. B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 179-189.
- Camacho P, Cáceres A, Rodríguez J. (2011). Extracción de aceite esencial de eucalipto. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/48247006/Extraccion-de-aceites-esenciales-informe>
- Camou G., A., G. Reyes, V. M. Martínez R., and A. Casas (2008) Knowledge and Use Value of Plant Species in a Rarámuri Community: A Gender Perspective for Conservation. *Human Ecology* 36:259-272
- Cañigual Salvador, Dellacassa Eduardo y Baldoni Arnaldo L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?, *Acta Farm. Bonaerense* 22 (3): 265-78
- Cañigual, S. & R. Vila. (1998). "Fitoterapia: concepto y límites. Fuente de información", en "Fitoterapia: Vademécum de prescripción" (A. Arteche, ed.), 3ª Edición, Masson, Barcelona, págs. 23-30.
- Cañigual, S. & R. Vila. (2001). "Principios de la Fitoterapia", en "Plantas medicinales y Fitoterapia", Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, Vol 1, págs. 173- 193.
- Cañigual, S. (2002). "La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio?". *Real Academia de Farmacia de Catalunya*.
- Cañigual, S., R. Vila & M. Wichtl (Eds.). (1998). "Plantas Medicinales y drogas vegetales", Ed. OEMF, Milán.
- Comisión de Salud del Parlamento Latinoamericano. (2009). Ley marco en materia de medicina tradicional -Propuesta elaborada para el Parlamento Latinoamericano. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/38477/LeyMarcoMedicinaTradicional.pdf> Consultado en:10/12/20
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2010). Catálogo de recursos forestales maderables y no maderables, áridos, tropicales y templados. Semarnat. http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Catalogo_de_recursos_forestales_M_y_N.pdf

- CONABIO. (1998). La Diversidad Biológica de México: Estudio de País. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Casa Libertad, Iztapalapa, México D.F. *Generations* 23:75-80.
- CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. (2014). Recuperado de: <http://www.cytel.org>.
- Damasceno, Carolina Sette Barbosa, Letícia Freire de Oliveira, Ellis Marina Szabo, Ângela Maria Souza, Josiane Fatima Gaspari Dias, Marilis Dalarmi Miguel, and Obdúlio Gomes Miguel. (2017). "Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activity of *Ocotea Bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE) Essential Oil." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 53(4). doi: 10.1590/s2175-97902017000417298.
- Dávila, C.A., F. Flores, J. Morales, R. Clark y E. Molphe. (2009). Abundancia y explotación del laurel silvestre *Litsea glaucescens* Kunth en Aguascalientes, México. III Simposio Nacional de Ecología: Manejo y Conservación de los Ecosistemas de Montaña en México.
- Dávila-Figueroa, C.A. (2011). Estatus poblacional y niveles de aprovechamiento del laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) en Aguascalientes. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2(4):47-60.
- De, Jefferson R., A. Silva, Dominique F. M. do Carmo, Érika M. Reis, Gérzia M. C. Machado, Leonor L. Leon, Bianca O. da Silva, José Luiz, P. Ferreira, Ana Claudia, and F. Amaral. (2009). *Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils with Economic Value from Lauraceae Species*. Vol. 20.
- Domínguez, X. A. y Domínguez X. A. (Jr.). (1982). Química Orgánica Experimental, Editorial Limusa, pág. 97-112, México.
- Dominguez, X. A. (1985). Métodos de Investigación Fitoquímica, Editorial limusa, México.
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnorn, S., GüreL, A., Aktas, L. & Gesheva. (2008). Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *General and Applied Plant Physiology*, 34:67-78.
- Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA*. Nov 11;280(18):1569–1575.
- Esteyneffer, J. 1978. (1712). Florilegio medicinal. Edición, estudio preliminar, notas, glosario e índice analítico por MC Anzures y Bolaños. 2 tomos. Academia Nacional de Medicina, México.

- FAO. (2007). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. <http://www.fao.org/docrep/009/a0773s00.htm>
- FAO. (2008). Productos forestales no maderables. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [disponible En: www.fao.org/forestry/site/6388/es].
- Fernández Calienes, V.A., Mendiola, M.J., Monzote, F.L., García, P.M., Sariego, R.I., Acuña, R.D., Scull, L. R., Gutiérrez, G.Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Revista Cubana de Medicina Tropical 61(3):254-258.
- Fuentes Cervantes, M.A. (2013). Plantas medicinales de Omitlán, Hidalgo, México. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas 2:129-132.
- Garcia, R., Alves, E.S.S., Santos, M.P., Aquije, G.M.F.V., Fernandes, A.A.R., dos Santos, R.B., Ventura, J.A., Fernandes, P.M.B. (2008). Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. Braz. J. Microbiol. 39: 163–168.
- Garrett, Rafael, Rodrigo A. S. Cruz, Leandro Rocha, Marcelo G. Santos, and Antonio Jorge R. da Silva. (2010). "Chemical Composition and Toxicity of Ocotea Notata (Nees) Mez Essential Oil." *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 13(4):455–59. doi: 10.1080/0972060X.2010.10643849
- Ghasemi. P., Hashemi. M., Ghahfarokhi. M. (2013). Essential oils and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. Industrial. Crops and Products. 48:43-48
- Gribner, Caroline, Paula Francislaine Moura, Andressa Veiga, Larissa Junqueira Gatto, Nayana Cristina da Silva Santos, Francisco de Assis Marques, Ingrid Zattoni, Glaucio Valdameri, Josiane de Fatima Gaspari Dias, Obdulio Gomes Miguel, and Sandra Maria Warumby Zanin. (2020). "Chemical Constituents of Ocotea Paranaensis (Lauraceae) Essential Oil and Their Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties." *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* 19(5):495–507. doi: 10.37360/blacpma.20.19.5.34.
- Gutiérrez Bouzán M. Carmen Y Droguet Marta. (2002). "La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". Boletín INTEXTER (U.P.C.) N° 122. Consultado: 27/04/2021. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Guzmán Gutiérrez, S. L., Gómez- Cansino, R., Gracia- Zebadúa, J. C., Jiménez- Pere, N. C., y Reyes- Chilpa, R. (2012). Atidepressant activity and Linalool as active principales. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 673- 679.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887-1892.
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., Kadifkova, P.T. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 60(1):9-18.
- Hamid, Syaliza Abdul, y Fasihuddin Ahmad. (2015). Chemotype of *Litsea Cubeba* Essential Oil and Its Bioactivity. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1301–1304.
- Hernández Flores, S. D., & Vargas Licona, G. (2020). El laurel silvestre (*Litsea glaucescens*) especie en peligro de extinción con alto valor de uso. *Uno Sapiens Boletín Científico De La Escuela Preparatoria No. 1*, 2(4), 25-29. Recuperado a partir de <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/prepa1/article/view/5125>
- Hernández T, M Canales, J Caballero, A Durán, R Liras. (2005). Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Interciencia* 30:17–2
- Hernandez T., Garcia A.M., Serrano R., Ávila G., Cervantes H, Peñasola I., Flores C. M., y Lira R. (2015). Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2015000200116 Consultado en:10/11/20.
- Hossain Shohel Md., Tarek Aziz Mohammad, Akter-uz-zaman Sumon Khondoker Md., Ibrahim Md., Sultana Abida, Gopal Sarker Nane, Das Palash, Masudur Md., Jahirul Islam Md. Y Hasem Babu Mohammad. (2017). A Study on *Litsea monopetala* for Evaluation of Pharmacological Activities. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences* Vol-3, Iss-8 (Aug, 2017):873-880
- Huerta C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. *CONABIO. Ethnopharmacol.* 100(1-2):5-22
- INCMNSZ (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán). (2017). *Medicina Tradicional*. Consultado (26/04/2021). Disponible en:

<https://www.incmnsz.mx/opencms/contenido/investigacion/comiteEtica/medicinaTradicional.html>

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010). Principales resultados por localidad. Rescatado de: https://www.inegi.org.mx/400.html?aspxerrorpath=/sistemas/consulta_resultados/iter2010.aspx

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). (2017). Medicina Tradicional. Generalidades y aspectos éticos. Rescatado de: <https://www.incmnsz.mx/opencms/contenido/investigacion/comiteEtica/medicinaTradicional.html#:~:text=De%20acuerdo%20a%20la%20definici%C3%B3n,salud%2C%20tanto%20f%C3%ADsica%20como%20mental.>

Jaime, João, Giffoni Leite, Érika Helena, Salles Brito, Rossana Aguiar Cordeiro, Raimunda Sâmia, Nogueira Brilhante, José Júlio, Costa Sidrim, Luciana Medeiros Bertini, Selene Maia De Moraes, Marcos Fábio, and Gadelha Rocha. (2009). Chemical Composition, Toxicity and Larvicidal and Antifungal Activities of *Persea americana* (Avocado) Seed Extracts Composição Química, Toxicidade, Atividade Larvicida e Antifúngica de Extratos de Semente de *Persea americana* (Abacate). Vol. 42.

Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: past history and future perspective. *Journal of Herbmед Pharmacology*, 7(1):1- 7.

Jiménez Pérez, N.C., F.C. Lorea Hernández, C.K. Jankowski y R. Reyes Chilpa. (2011). Essential oils in Mexican bays (*Litsea* spp., Lauraceae): taxonomic assortment and ethnobotanical implications. *Economic Botany* 65(2):178-189. DOI:10.1007/s12231-011-9160-5.

Jiménez, G., H. Pérez, L. Soto, J. Nahed, L. Hernández Y J. Carmona. (2007). Livestock, nutritive value and local knowledge of fodder trees in fragment landscapes in Chiapas, Mexico. *Interciencia*, 32(4):274-280.

Jiménez, M.E., M.R. Aguilar, M.L. Zambrano y E. Kolar. (2001). Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Revista de la Sociedad Química de México* 25(2):89-92.

Kuipers, S.E. (1995). "Trade in medicinal plants", en "FAO, Medicinal plants for forest conservation and health care. Non-wood forest products". FAO, Roma, Vol. 11

Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A. y Mancinifilho, J. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología de alimentos* 25(4):1-12.

- Kuspradini harlinda, Sinta Putri Agmi, Sintá, Rita Diana. (2020). Toxicidad, capacidad antioxidante e inhibición de patógenos orales por aceite esencial rico en monoterpenos de *Litsea angulata* Blume. *Agriculture and natural resources*. 54.(2020) 1-6.
- Laurella Sergio Luis. (2016). Resonancia magnética nuclear Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares. Consultado: 27/04/2021. Disponible en: file:///C:/Users/tepix/Dropbox/PC/Documents/TESIS_LAUREL/CITOTOXICIDAD/781-3-2589-1-10-20171128.pdf
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.
- Libralatoa, G., Prato, E., Migliorec, L., Cicero, A.M., Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators* 69: 35–49.
- López, J., W. Barillas, J. Gómez, F. Lin, A. Al, M. Sharaf y P. Schiff. (1995). Flavonoids of *Litsea glaucescens*. *Planta Médica* 61(2):198
- Lorea Hernández, F. G. (2002). La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (71), undefined-undefined. [Consulta: 06/ 05/ 21]. ISSN: 0366-2128. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=577/57707104>.
- Lozcano Torres C.I., Romero López M. del R., Fuentes Jiménez L. y García Zebadúa J.C. (2019). Perfil Aromático del Aceite Esencial de *Litsea glaucescens* y Revisión de la Capacidad Antimicrobiana para Conservación de Alimentos. *REIA Vol. 5*, 5-10, ISSN: 2448-6817
- Lozoya, X. (1994). Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs. In *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wil
- Luna Vega, M. I. (2003). *Litsea glaucescens*. Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana. Herbario FCME, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W025. México. D.F. México. pp. 1-5.
- Macías, V.E. (2009). Actividad biológica (farmacológica) y/o etnomédica; y compuestos fitoquímicos aislados de algunas especies de los géneros: *Persea*, *Laurus*, *Lindera*, *Aniba*, *Phoebe*, *Nectandra*, *Cassytha*, *Cinnamon*, *Licaria*, *Ravensara*,

- Pleurothyrium, Dehaasia, Apollonias y Neolitsea (Lauraceae). Duazary 7(1):130-151.
- Macías, V.E. (2010). Metabolitos secundarios con actividad biológica (farmacológica), aplicación etnobotánica; y fitoquímica de algunas especies de los géneros: Ocotea, Cryptocarya, Litsea, Caryodaphnopsis, Machilus y Actinodaphne (Lauraceae). Duazary 7(1):152-170.
- Magalhaes, P. J. C., D. N. Criddle, R. A. Tavares, E. M. Melo, T. L. Mota, and J. H. Leal-Cardoso. (1998). Intestinal myorelaxant and anti-spasmodic effects of the essential oil of Croton nepetaefolius, and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. Phytotherapy Research 12:172–177.
- Marchese, A., Arciola, C.R., Barbieri, R., et al. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A Particular Focus on p-Cymene. Materials, 10: 947.
- Masten, S. (1999). Toxicological Summary for Terpinolene. Integral Laboratory Sistema. USA, 29 p
- Mazzanti, G., L. Battinelli, and G. Salvator. (1998). Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of Hyssopus officinalis L. var decumbens (Lamiaceae). Flavour and Fragrance Journal 13:289–294.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D. E., Nicols, J. L., McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica. 45(5):31-4. DOI: 10.1055/s-2007-971236
- Michael, A. S., Thompson, C. G., Abramovitz, M. (1956). Artemia salina as a test organism for a bioassay. Science 123: 464.
- Montañez Armenta, M. P. (2006). Proceso de organización social para el aprovechamiento del Laurel silvestre (Litsea glaucescens) en la Sierra del Laurel, Aguascalientes. Tesis Maestría en Ciencias. Instituto en Socioeconomía, Estadística e Informática, Desarrollo Rural. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. México. 110 p
- Montañez Armenta, M. P., E. Valtierra-Pacheco y S. M. Medina-Torres. (2011). Aprovechamiento tradicional de una especie protegida (*Litsea glaucescens* kunth) en “Sierra del Laurel”, Aguascalientes, México. Ra Ximhai 7:155-172.
- Monteiro JA, Ferreira Júnior JM, Oliveira IR, Batista FLA, Pinto CCC, Silva AAS. (2018). Bioactivity and Toxicity of Senna cana and Senna pendula Extracts. Biochem Res Int Consultado: 24/01/22 Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2018/8074306/>

- Montoya Cadavid G. de J. (2010). Aceites esenciales. Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. I.S.B.N 958-8280-26-4
- Moreno, J.; López, G.; Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria* 1(2): 147-154
- Nathan Pedro Joseph. (1967). Resonancia magnética nuclear de hidrogeno-1 y de carbono-13. Número 9 de Serie de Química. Monografía / OEA. ISBN: 0827015194, 9780827015197. Pag.164
- Newman, D. J., G. M. Cragg & K. M. Snader. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *Journal of Natural Products* 66: 1022-1037.
- Noriega Cisneros R, Ortiz-Ávila O, Esquivel-Gutiérrez E, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Salgado-Garciglia R, Cortés-Rojó C, Boldogh I, Saavedra-Molina A. (2012). Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Res. Int.* 2012:1-5
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2019. (2019). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- OMS. (1978). The Promotion and Development of Traditional Medicine, Ed. WHO, Technical Report Series, No. 622, Ginebra.
- OMS. (1999). "WHO Monographs on Selected Medicinal Plants", Ed. WHO, Vol. 1, Ginebra
- Ortega M. D., Pulido S. M. T, Costa de A. J. y Da Silva C. J. (2019). Ethnobotanical Study of the Mexican Laurel in El Chico National Park, Mexico: A Quantitative Perspective. *Ethnobiology Letters*. DOI 10.14237 / ebl.10.1.2019.1427
- Osuna, L., M.E Tapia y A. Aguilar. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio 33 etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. España. Universidad de Barcelona. 173p.
- Peana, A. T., P. S. D'Aquila, F. Panin, G. Serra, P. Pippia, and M. D. Moretti. (2002). Antiinflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 9:721–726.
- Politeo, O., Jukić, M., & Miloš, M. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica chemica acta*, 79(4), 545-552.

- PROFEPA, Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. (2017). Prensa. Asegura profepa 477 kilos de laurel silvestre en Aguascalientes, especie en peligro de extinción. Disponible en: <https://www.gob.mx/profepa/prensa/asegura-profepa-477-kilos-de-laurel-silvestre-en-aguascalientes-especie-en-peligro-de-extincion>
- PROFEPA, Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. (2017). Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, Delegación Hidalgo Exp. PFPA / 20.3 / 8C.17.5 / 0001 -17.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Prolegente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*: 26 (9/10), 1231-1237.
- Rios T. N., Márquez, Y. R., Mendoza, R. X., Rojas, F. L., Velasco, C. J., Días, T. Mora, V. F., Yáñez, C. C., Meléndez, G. P. (2015). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) de los llanos venezolanos. *Revista Peruana de Biología* 22(1):103-107.
- Root R.B. (1967). The niche exploration pattern of the blue- grey gnatcatcher. *Ecological Monographs*, 37:317-350
- Ros Tonen, M. A. F. (Ed.). (1999). Seminar proceedings: NTFP research in the Tropenbos Programme: results and perspectives, 28 January 1999.
- Rzedowski J., y Calderón de R., G. (1998). Dos especies de *Ambrosia* (Compositae, Heliantheae) adventicias en el centro de México. *Acta Botánica Mexicana* 43: 57-66.
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores. (2010). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- Sánchez Yañez M. T., Rojas Molina R., Wong Paz J.E. y Muñiz Márquez D.B. (2020). Estudio del potencial antioxidante de aceites esenciales de laurel, orégano y damiana pretratados con ultrasonido. Tecnológico Nacional de México Campus Ciudad Valles. *Revista de divulgación científica y tecnológica*. ISSN: 2444-4944. Vol. 7 No. 1
- Sandermann H. JR, Ernest D., Heller W. Y Langebartels C. (1998). Ozone an abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends in Plants Science*, 3:47-50.
- Santos, F. A. and V. S. Rao. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research* 14:240–244.

- Saranraj, P., Sivasakthi, S., Deepa, M.S. (2016). Phytochemistry of pharmacologically important medicinal plants – a review. *International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 3(11):56-66.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Yoga, L. L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from
- SCBD. (2001). Sustainable Management of Non-Timber Forest Resources. CBD Technical Series 6. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Montreal. Pg. 30. <http://www.cbd.int/doc/puplications/cbd-ts-06.pdf>.
- Schmidt Werka, Jennifer, Amelia K. Boehme, and William N. Setzer. (2007). Biological Activities of Essential Oils from Monteverde, Costa Rica. <https://doi.org/10.1177/1934578X0700201204>
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2019). NORMA Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Jueves 30 de diciembre 2010.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2019). NORMA Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2019, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Jueves 30 de diciembre 2010.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2014). Anuario Estadístico de la Producción Forestal 2013. Semarnat. http://www.SEMARNAT.gob.mx/sites/default/files/documentos/forestal/anuarios/anuario_2013.pdf (9 de junio de 2015)
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (SEMARNAT). (2006). *Litsea glaucescens* Kunth, 1817. <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/LitseaGlaucescens.html>
- SEFIPLAN. Secretaria de Finanzas y Planeación del estado de Veracruz. (2016) Zongolica. cuadernillos municipales. Subsecretaría de Planeación. Recuperado de: <http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2016/05/Zongolica.pdf>
- Shahidi, F., y Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.

- Sharapin, Nikolai. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Publicado por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED. Bogotá,
- Soejarto DD, Fonga HHS, Tana GT, Zhang HJ, MA CY, Franzblau SG. (2005). Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benetsharing.
- Stashenko, E.E., Ferreira, C., Sequeda, G., Mateus, A., Cervantes, M. & Martínez, J.R. (1997). "Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales", Arte y Ciencia Cosmética 12: 20-27
- Sugawara, Y., C. Hara, K. Tamura, T. Fujii, K. Nakamura, T. Masujima, and T. Aoki. (1998). Sedative effect on humans of inhalation of essentials oils of linalool: Sensory evaluation and physiological measurement using optically active linalools. *Analytica Chimica Acta* 365:293–299.
- Tapia Tapia, E. C y Reyes Chilpa, R. (2008). Productos forestales no maderables en México: Aspectos económicos para el desarrollo sustentable. Consultado: 05/05/2021. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712008000300005#:~:text=Las%20categor%C3%ADas%20reconocidas%20son%3A%201,ejemplo%2C%20candelilla%20\(Euphorbia%20antisiphylitica\)](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712008000300005#:~:text=Las%20categor%C3%ADas%20reconocidas%20son%3A%201,ejemplo%2C%20candelilla%20(Euphorbia%20antisiphylitica))
- Tardugno, R., Pellati, F., Iseppi, R., Bondi, M., Bruzzesi, G., Benvenuti, S. (2017). Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. *Nat. Prod. Res.* 32: 1–8.
- Tucker, A.O., M.J. Maciarello Y M. Hill. (1992). *Litsea glaucescens* Humb., Bonpl. et Kunth var. *glaucescens* (Lauraceae): a Mexican bay. *Economic Botany* 46(1):21-24.
- Uangbaoje, O. F., Abosede, W.O., Jide, A. A. (2016). Research article toxicity assessment of different solvent extracts of the medicinal plant, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle on brine shrimp (*Artemia salina*). *International Journal of Pharmacology* 12 (7):701-710.
- Uddin, Mohammad Najim, Towsif Alam, Muhammad Azharul Islam, Tawhidul Amin Khan, Raihan Uz Zaman, Shofiul Azam, A. T. M. Mostafa Kamal, and Md Jakaria. (2020). "Evaluation of Carbon Tetrachloride Fraction of *Actinodaphne angustifolia* Nees (Lauraceae) Leaf Extract for Antioxidant, Cytotoxic, Thrombolytic and Antidiarrheal Properties." *Bioscience Reports* 40(6). doi: 10.1042/BSR20201110.

- Uma, M., Suresh, M., Thulasiraman, K., Lakshmidhevi, E., Kalaiselvi, P. (2013). Chronic toxicity studies of aqueous leaf extract of Indian traditional medicinal plant *Ocimum tenuiflorum* (Linn.) in rats. *European Journal of Experimental Biology* 3(5):240-247.
- UNAM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2014). *Litsea glaucescens*. Laurel silvestre. Página electrónica UNAM. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Hyptis_suaveolens&id=7152
- Valdés, J. and H. Flores. (1985). Comentarios a la historia de las plantas de la nueva España. In: *Obras completas de Francisco Hernández*, Tomo VII, 179. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Valverde, J. (1984). El herbario azteca de 1552. Martín de la Cruz' "Libellus de medicinalibus indorum herbis"; contexto de las fuentes sobre nahuatl materia médica. *Veroentlichungen der Internationalen Gesellschaft fur Geschichte der Pharmazie*, 53:9-30
- Van der Werff H. (1987). Six new species of neotropical Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74:401-412.
- Van der Werff H. (1988). Eight new species and one new combination of neotropical Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75:402-419.
- Van der Werff, H., y Lorea Francisco. (1997). Flora del Bajío y de Regiones adyacentes: Familia Lauraceae. Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Ver. México. Fascículo 56. pp. 25-31.
- Vander, A. (2008). Plantas medicinales, las enfermedades y su tratamiento por las plantas. Editorial y Librería Sintet, Barcelona, España, 253.
- Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. (1981). Proposal for a short term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Env Safety*; 5:382-87
- Vásquez Cortez V. F. (2016). Índices de Valor importancia ecológica (IVIE). Colegio de posgraduados. Montecillo, Texcoco Edo de México.
- Vásquez, O.; Alva, A.; Marreros, J. (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria* 1(1): 38-42.

- Wink M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.
- World Health Organization (WHO). (1993). Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Geneva. Pg. 57
- Yan, X.H., F.X. Zhang, H.H. Xie Y X.Y. Wei. (2000). A review of the studies on chemicals constituents from *Litsea* Lam. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 8(2):171-176.

8. APÈNDICES



Figura A 1. Oficinas ejidales del núcleo agrario El Nopalillo, Epazoyucan, Hgo.



Figura A 2. Área de muestreo, bosque de pino del ejido El Nopalillo.



Figura A 3. Hoja de laurel aromático presente en el ejido El Nopalillo.



Figura A 4. Extracción de aceite esencial con equipo Clevenger.

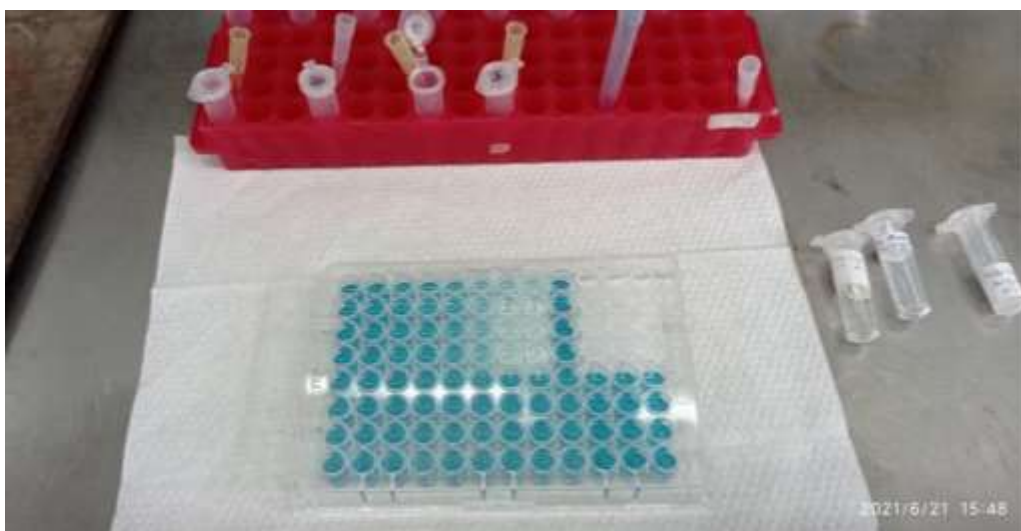


Figura A 5. Microplaca de 96 pozos para ensayo ABTS



Figura A 6. Lector de microplacas: Marca BioTek para medidas de actividad lumínica.



Figura A 7. Viales para el proceso de citotoxicidad con prueba de *Artemia salina*

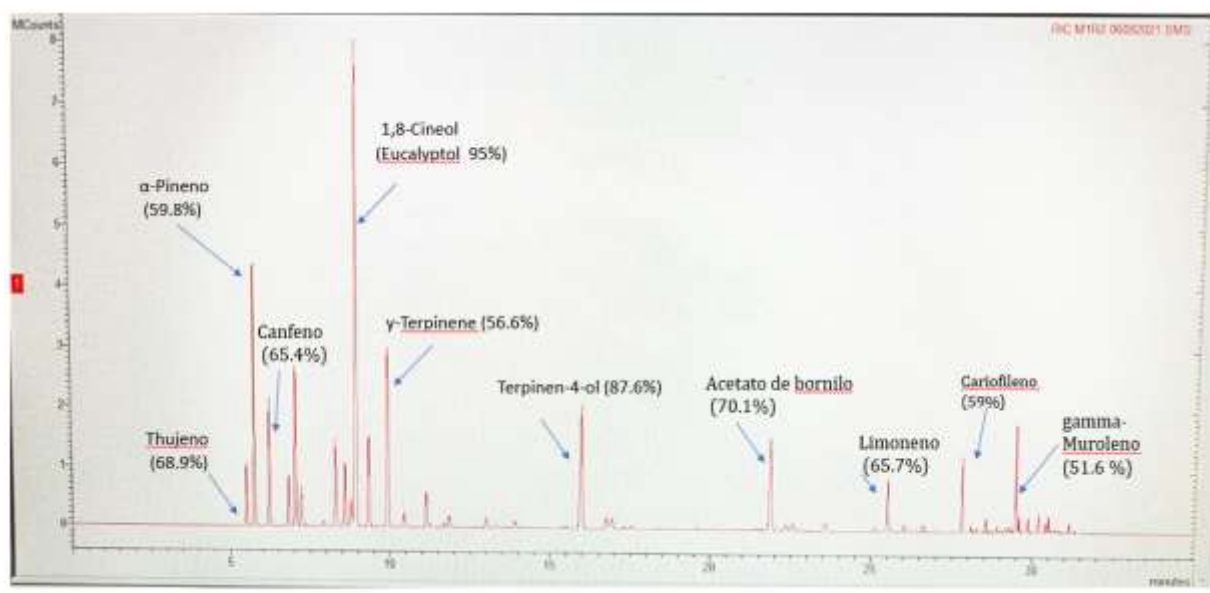


Figura A 8. Espectro de cromatografía de muestra de aceite esencial de Chignahuapan, Puebla.

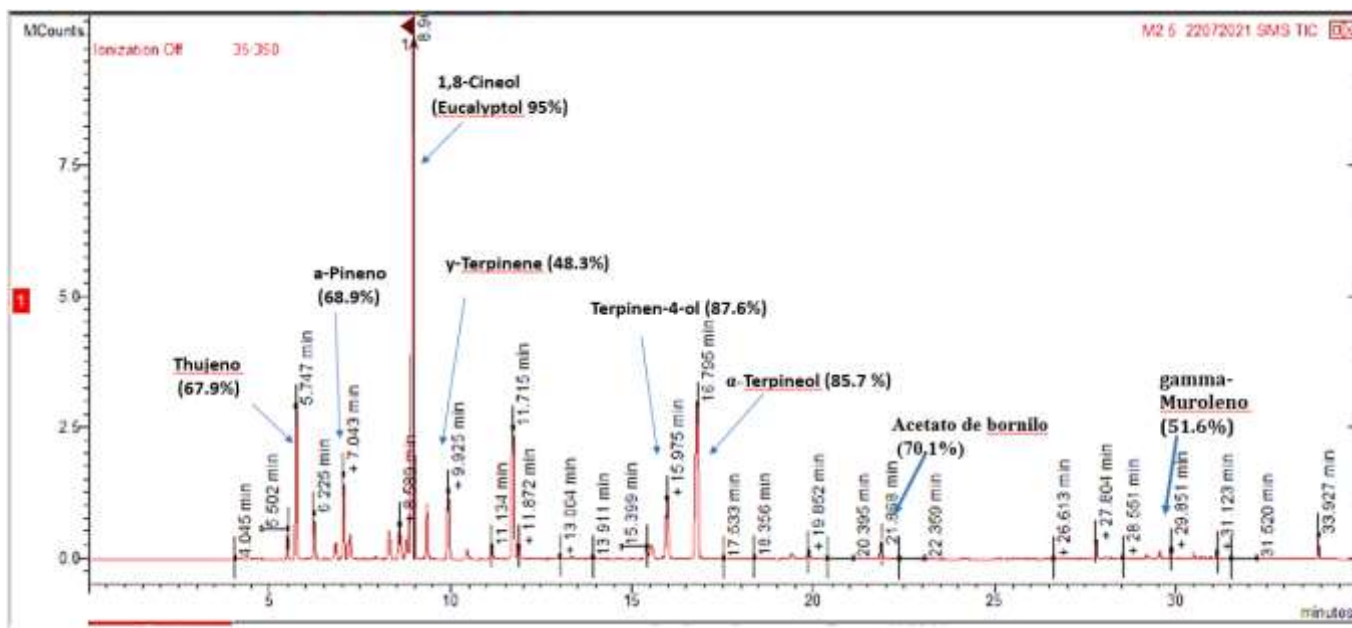


Figura A 10. Espectro de cromatografía de muestra de aceite esencial de Ejido “El Nopalillo (Pino-Encino).

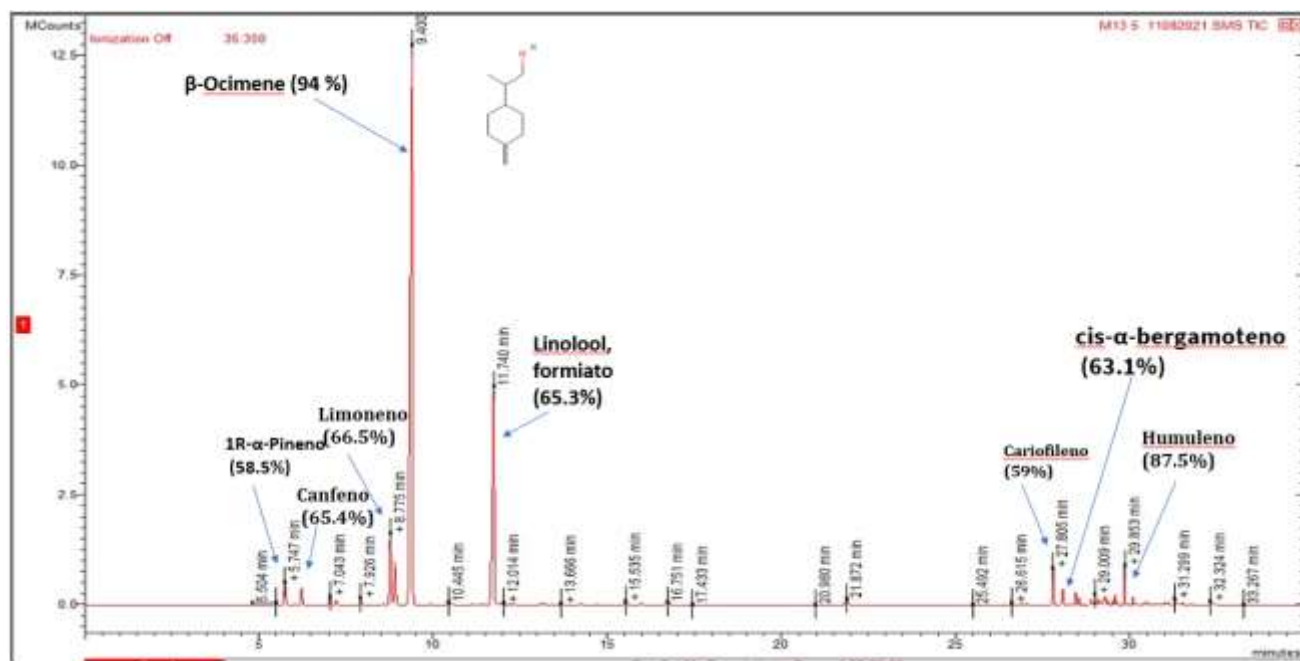


Figura A 9. Espectro de cromatografía de muestra de aceite esencial de Zongolica, Ver.