



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* H.B.K. EN DOS ZONAS DE  
ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**Martha Alvarado Hernández**

**Bajo la Asesoría y Dirección de:  
Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. México**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Contra cada padecimiento crece una planta....*

*Paracelso, siglo XVI*

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis esta dedicada a todas aquellas personas que son parte fundamental en mi vida:

Gracias Dios, por que me has dado la dicha de llegar a este mundo en la familia perfecta y con las circunstancias precisas para lograr todas mis metas.

A mis padres y hermanos que son el pilar de mi vida y el motor que me impulsa para salir adelante día a día:

Mamá gracias por entregarme tu amor, pero sobre todo por darme las fuerzas y el coraje para llevar una vida llena de alegría y de éxitos; Papá por darme toda una vida de alegría y por amarme aún sin merecerlo. A ti Javier, que siempre has sido un gran ejemplo en mi vida; Tisha a ti te dedico este trabajo por que siempre te has mantenido firme a mi lado para hacerme aprender de mis errores y aciertos, pero sobre todo por ser mi hermana fiel; César, mi hermanito, porque siempre me haces ver la vida de otra manera.

Les estoy especialmente agradecida a mis padrinos Maco y Victor por apoyarme en esta hermosa etapa de mi vida y por brindarme su amor incondicional.

Mi equipo de trabajo en el laboratorio de fitoquímica fue sin duda alguna uno de los cimientos importantes que dieron forma y fuerza a este trabajo:

Dra. Tzasna, le estoy profundamente agradecida por que usted me ayudo a descubrir la belleza de una disciplina en donde el amor al trabajo es lo más importante, pero sobre todo por el apoyo brindado, no solo en el aspecto técnico y profesional sino también en el personal. Infinitas gracias.

Dra. Margarita, gracias por permitirme conocer a ese maravilloso ángel que es usted. Mi respeto y admiración son poco para agradecerle el tiempo proporcionado y por todos y cada uno de los consejos que me brindó durante mi estancia en el laboratorio, siempre le estaré eternamente agradecida.

Le estoy especialmente agradecida a la M. en C. Ana María Bores, porque sus clases de método científico fueron un motivo de inspiración que me impulso a inclinarme por esta área, de igual forma le agradezco sus recomendaciones y el tiempo dedicado a este trabajo.

También quiero expresar mis agradecimientos al Doctor Avila por el tiempo dedicado a este trabajo y por las recomendaciones que lo enriquecieron, al Doctor Rafael Lira por el tiempo brindado durante el proceso de redacción, así como al M. en C. Ángel Durán por apoyarme en la parte estadística del proyecto.

A Chio, Ary, Bárbara e Iveth, quiero agradecerles el apoyo incondicional que me han brindado pero sobre todo, por todos y cada uno de los comentarios que enriquecieron este su trabajo, mil gracias por todo.

Con respecto al resto del mundo estoy en deuda con un gran círculo de amigos: Cinthya “mi amiga fiel”, Jessy, Norma, Irais, Ma. Teresa, Edgar y a todos aquellos que estuvieron a mi lado durante la carrera profesional.

Finalmente, quiero hacer hincapié en que siempre estaré en deuda con todos ustedes por su apoyo y su amistad.

MARTHA



## ÍNDICE GENERAL.

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
Metabolitos secundarios y sus funciones .....	4
Antimicrobianos de origen vegetal .....	5
Aceites esenciales y terpenos .....	6
Factores de variabilidad de los aceites esenciales .....	7
Importancia de los aceites esenciales .....	9
JUSTIFICACIÓN .....	9
ANTECEDENTES .....	10
OBJETIVOS .....	14
DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA .....	15
ÁREA DE ESTUDIO .....	18
METODOLOGÍA .....	22
Colecta .....	22
Extracción del aceite esencial .....	22
Identificación de los compuestos .....	22
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana .....	23
Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana .....	23
Curvas de supervivencia .....	24
Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica .....	24
Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica .....	24
Análisis estadístico .....	24
RESULTADOS .....	25
DISCUSIÓN .....	40
CONCLUSIONES .....	47
PERSPECTIVAS .....	48
APÉNDICE I .....	49
Extracción por arrastre de vapor de aceites esenciales	
APÉNDICE II .....	50
Método de difusión en agar de Kirby-Baüer	
APÉNDICE III .....	52
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida Mínima	
APÉNDICE IV .....	53
Curva letal	
APÉNDICE V .....	54
Método cualitativo del crecimiento radial	
APÉNDICE VI .....	55
Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial	
APÉNDICE VII .....	56
Espectros de masas de los compuestos identificados	
BIBLIOGRAFÍA .....	63



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Lippia graveolens</i> H.B.K. (Orégano) .....	15
<b>Figura 2.</b>	Distribución de <i>Lippia graveolens</i> H.B.K. (Orégano) .....	17
<b>Figura 3.</b>	Localización geográfica del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla .....	18
<b>Figura 4.</b>	Cromatograma del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de la zona A .....	25
<b>Figura 5.</b>	Cromatograma del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de la zona B .....	26
<b>Figura 6.</b>	Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de las zonas A y B .....	30
<b>Figura 7.</b>	Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de las zonas A y B en bacterias Gram positivas y Gram negativas .....	31
<b>Figura 8.</b>	Efecto del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> sobre la curva de crecimiento de <i>S. lutea</i> , en la zona A .....	33
<b>Figura 9.</b>	Efecto del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> sobre la curva de crecimiento de <i>S. lutea</i> , en la zona B .....	33
<b>Figura 10.</b>	Efecto del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> c.c, en la zona A .....	34
<b>Figura 11.</b>	Efecto del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> c.c. en la zona B .....	34
<b>Figura 12.</b>	Inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> , en ambas zonas .....	38



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Composición porcentual del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de ambas zonas .....	27
<b>Cuadro 2.</b>	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de las zonas A y B .....	29
<b>Cuadro 3.</b>	Determinación de la CMI y de la CBM del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de las zonas A y B .....	32
<b>Cuadro 4.</b>	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de la zona A .....	36
<b>Cuadro 5.</b>	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> de la zona B .....	37
<b>Cuadro 6.</b>	CF <sub>50</sub> y CFM del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> .....	39



---

## INTRODUCCIÓN

La naturaleza ha dado al ser humano infinidad de recursos para satisfacer sus necesidades de habitación, vestimenta, alimentación y salud. Las plantas medicinales han, sido sin duda alguna, uno de los recursos de mayor importancia en la historia del hombre para la curación de sus males y dolencias (Palacios, 2005).

Muchas plantas medicinales, aromáticas y especies como el hinojo, anís y amapola se usaban desde 4000 años a.C. en rituales religiosos. Tratamientos curativos basados en canela, tomillo, hierbabuena y mejorana fueron descritos por el padre de la medicina, Hipócrates. En la misma época Caratebas, famoso herborista, escribió un manual en el que detallaba cuatrocientas plantas con sus aplicaciones (Palacios, 2005).

En los siglos XV y XVI el descubrimiento del nuevo mundo, trajo el conocimiento de nuevas plantas medicinales y aromáticas, mientras que los siglos XVII y XVIII marcaron el apogeo del uso de plantas con fines curativos (Muñoz, 2000).

En América, la información sobre plantas medicinales fue adquirida por misioneros y viajeros españoles (Hamburguer y Hostetmann, 1991), siendo ellos quienes plasmaron todo ese conocimiento en obras como las de Bernadino de Sahagún, quien realizó una compilación de fuentes Náhuatl, registrado en el Códice Florentino (Ortiz, 1986), “Tesoro de la medicina o de las plantas medicinales de la Nueva España” de Gregorio López (1850) y el “*Libellus de Medicinalibus Indorum herbis*” escrito por Martín de la Cruz (Gutiérrez, 1989).

En México, el conocimiento etnomédico ha sido de gran importancia ya que el país junto con mesoamérica conforman un área reconocida como las más ricas en flora, siendo una de las zonas más importantes a nivel global (Lira, 1998) determinada principalmente por la diversidad biológica y cultural que se funden



---

en un crisol de conocimientos y prácticas populares rescatadas por las culturas y que han preservado y difundido formas y procedimientos eficaces para resolver importantes problemas de salud en la población (Gómez-Pompa, 1982; Aguilar *et al.*, 1994).

Según estimaciones de Caballero (1978), en México existen cerca de 5000 a 7000 especies de plantas y una incalculable variabilidad intra-específica que pueden emplearse potencialmente con diferentes fines (Rosas, 2003), como el de curar enfermedades, sin embargo, se conocen registros donde mencionan que de las 260,000 especies de plantas medicinales que existen a nivel mundial (Aguilar *et al.*, 1994), México cuenta con 2130 especies, las cuales son principalmente utilizadas en el medio rural (Cervantes y Valdés, 1990).

Estudios demográficos de diversos gobiernos y de organizaciones intergubernamentales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación (FAO), indican que entre un 75% a un 90% de la población rural del mundo utilizan la herbolaria para tratar los problemas de la salud (FAO-Org, 2005). Por lo que la OMS recomienda que las políticas del país deben incidir en programas dedicados a la investigación y realización de trabajos regionales, lo que permita la integración del conocimiento sobre el tema, así como el desarrollo de investigaciones a niveles más complejos que contemplen el manejo de material botánico de interés en los campos médico y farmacéutico.

Por lo anterior, es conveniente recalcar que la importancia de los estudios actuales sobre las plantas medicinales, radica en que éstas presentan ventajas indiscutibles con relación a medicamentos alópatas o fármacos sintéticos, ya que estos provocan efectos negativos colaterales, lo cual, hace que cada vez sean más las personas que regresen a la utilización de alternativas naturales, en especial para enfermedades comunes como las gastrointestinales y respiratorias (Palacios, 2005).

Los estudios a los que son sometidas las plantas medicinales para verificar su efectividad son de tipo fitoquímico y farmacológico, los cuales han demostrado



que algunas de las plantas presentan propiedades farmacéuticas (Cowan, 1999), gracias a una de las características típicas de las plantas, ya que presentan una vasta y diversa producción de compuestos orgánicos conocidos comúnmente como metabolitos secundarios (Buchanan *et al.*, 2000).

### **Metabolitos secundarios y sus funciones.**

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos, algunos de los cuales participan directamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas. (Buchanan *et al.*, 2000). Estos metabolitos incluyen muchas sustancias libres de nitrógeno (terpenos, saponinas y poliacetilenos) y compuestos que contienen nitrógeno (alcaloides, aminos, aminoácidos no proteínicos y glucosinolatos) (Wink, 1999).

Los metabolitos secundarios son sintetizados a través de vías metabólicas específicas. Un rasgo particular de estos compuestos, es que difieren en concentración y composición de órgano a órgano, algunas veces entre individuos y regularmente entre especies, además de que son acumulados y almacenados en diferentes concentraciones, por ejemplo en algunas de las plantas la concentración es de 1-3% de su peso seco. Los sitios de síntesis no son necesariamente los sitios de almacenamiento, ya que son transportados en largas distancias por xilema, floema o vía apoplastos. En general los compuestos hidrofílicos son almacenados en las vacuolas, mientras que las sustancias lipofílicas son depositadas en ductos de resina, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

Varios metabolitos secundarios, son sintetizados como defensa ante patógenos (virus, bacterias y hongos) y algunos depredadores (moluscos, artrópodos y vertebrados). Así como para atraer animales para la polinización y dispersión de semillas. A veces parecen tener acción teletóxica sobre las germinaciones. También les confieren diversas propiedades útiles para el hombre como poder antiséptico, espasmolíticos, sedantes, expectorantes y antimicrobianos (Bruneton, 1991).



En muchas plantas, la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios son regulados en tiempo y espacio. Según la Teoría de la defensa óptima, los tejidos vulnerables o jóvenes son defendidos más que los tejidos en senescencia. Por ejemplo, usualmente se ha observado que las semillas, las yemas foliares y otros tejidos jóvenes secuestran gran cantidad de un compuesto o lo sintetizan activamente (Wink, 1999).

### **Antimicrobianos de origen vegetal.**

Los antimicrobianos de origen vegetal se dividen en varias categorías: compuestos fenólicos (fenoles simples, fenoles ácidos, quinonas, flavonas, taninos, cumarinas, etc.), terpenos, alcaloides, lectinas, polipéptidos y poliacetatos (Cowan, 1999).

Las quinonas son anillos aromáticos conocidos por formar complejos irreversibles con proteínas, inhibiendo sus funciones, por esta razón el efecto antimicrobiano es debido a que actúan a nivel de superficie de la célula microbiana, en donde se exponen adhesinas y enzimas unidas a la membrana, alterando de esa forma su función (Cowan, 1999).

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Su actividad frente a los organismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana (Cowan, 1999; Fukai *et al.*, (2002) citado por Domingo y López-Brea, 2003).

Los taninos son un grupo de sustancias fenólicas, cuyo modo de acción antimicrobiano se debe a que probablemente actúen contra adhesinas, enzimas y proteínas de transporte en la envoltura celular de la bacteria (Cowan, 1999).

Las cumarinas son sustancias fenólicas hechas por la fusión de benceno y anillos alfa pirona; su efecto antimicrobiano corresponde a que interaccionan con el ADN eucariótico (Cowan, 1999).



Los alcaloides son compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo la morfina, la heroína y la cocaína. El mecanismo de acción parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo y López-Brea, 2003).

Los terpenos son compuestos derivados del isopreno. Su mecanismo de acción se da cuando las bacterias son lisadas por los compuestos lipofílicos, aumentando así la hidrofiliidad de diterpenoides por la adición de un grupo metil, dejando salir los constituyentes intracelulares vitales o deteriorando los sistemas enzimáticos (Kabara, 1981; Cowan, 1999).

### **Aceites esenciales.**

Los aceites esenciales son mezclas más o menos complejas, en cuya composición entra una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que responden a la fórmula  $(C_5H_8)_n$  (monoterpenos,  $n=2$ ; sesquiterpenos,  $n=3$ ; diterpenos,  $n=4$ ; etc.), dentro de los cuales podemos encontrar terpenos oxigenados (borneol, geraniol, linalol, nerol, mentol, terpineol, etc.) o en forma de ésteres o de aldehídos (cinámico, benzaldehído, neral, citral, geranial, citronelal, salicílico, etc.), cetonas (alcanfor, carvona, fenchona, mentona, tuyona, etc.), fenoles (carvacrol, eugenol, isoeugenol, timol, etc.), ácidos libres (acético, benzoico, cianhídrico, cinámico, propiónico, valerianico, etc.) en pequeñas cantidades o en forma de ésteres o éteres (Bruneton, 1991; Gil y Sáez, 2005).

Los monoterpenos, que son la clase más simple de isoprenoides (Bruneton, 1991), sirven para atraer insectos a las flores, pero al mismo tiempo son insecticidas y antimicrobianos (Wink, 1999).

Los aceites esenciales se encuentran muy difundidos en el reino vegetal, especialmente en las fanerógamas, en las cuales se hallan repartidas en unas sesenta familias (Asteraceae, Labiatae, Verbenaceae, Mirtáceae, Rosáceae, Umbelíferae, etc.). Estos compuestos se pueden encontrar localizados en diferentes partes de la planta, por ejemplo: en las hojas (orégano, mejorana,



menta, romero, salvia, etc.), en las raíces (cálamo, valeriana, etc.), en la corteza (canela, cedro, sándalo, etc.), en las flores (jazmín, rosa, ylang-ylang, etc.), en la cáscara del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.) o en los frutos (anís, cardamomo, hinojo, etc.) (Gil y Sáez, 2005).

En ocasiones las diferentes partes de la misma planta suministran esencias distintas en su composición como, por ejemplo, los aceites extraídos de la raíz, el tallo y las hojas del hinojo. La canela de Ceilán encierra en la corteza una esencia rica en el aldehído cinámico, mientras que en sus hojas y en las raíces predominan el eugenol y el alcanfor, respectivamente (Gil y Sáez, 2005). La cantidad y composición del aceite varía de una especie a otra, y dentro de los mismos géneros de la planta (Wink, 1999), debido a que estos pueden ser afectados por factores físicos, químicos y biológicos que rodean el ambiente en el que se desarrollan las plantas.

### **Factores de variabilidad de los aceites esenciales.**

**Condiciones ambientales.** Las condiciones climáticas y la naturaleza del suelo, influyen directamente en la producción del aceite esencial (Bruneton, 1991).

- **Factores climáticos.-** Estos incluyen temperatura, intensidad de luz, humedad y efectos estacionales (Harborne, 1988).
- **Factores hídricos.-** Las especies vegetales sometidas a estrés hídrico tienden a elevar la proporción de material metabólico, y en este, se pueden encontrar compuestos con funciones protectoras para la planta (Harborne, 1988), ejemplo de ello, son los monoterpenos los cuales son elaborados por las plantas para inhibir la germinación y, en caso de que esto suceda, retardar el crecimiento de las plantas vecinas; de esta manera eliminan la competencia por el agua (Romo de Vivar, 1985).



- **Ciclo vegetativo.-** La proporción de los diferentes constituyentes del aceite esencial, puede variar de manera importante a lo largo de su desarrollo. Así, en la menta y en el orégano, estos pueden predominar al comienzo del período de floración, disminuyendo posteriormente (Bruneton, 1991).
- **Competencia con otras plantas.-** Dentro de una comunidad de vegetación existe competencia por minerales, agua, espacio, etc., entre las plantas de la misma especie o con diferentes plantas de diferente forma de vida (Harborne, 1988), lo cual, hace que las plantas produzcan sustancias químicas (monoterpenos) que dañen al competidor afectando su germinación, desarrollo o crecimiento (Romo de Vivar, 1985; Harborne y Tomas- Barberan, 1991).

Otros factores que contribuyen a la presencia y concentración del aceite esencial en las plantas son los siguientes:

- **Invasión microbiana.-** Algunos de los metabolitos secundarios como los aceites esenciales (terpenos) resultan, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales (Dixon (2001) citado por Domingo y López-Brea, 2003), desencadenando una cadena de procesos metabólicos para producir un grupo de compuestos con propiedades defensivas (Boller, 1995) como son las fitoalexinas cuya presencia aumenta en forma considerable en respuesta a la invasión microbiana (Harborne y Tomas-Barberan, 1991).
- **Quimiotipos.-** En drogas esenciales, son muy frecuentes las razas químicas, por ejemplo, el tomillo (*Tomillo vulgaris* L) presenta siete quimiotipos productores de: timol, carvacrol, geraniol, linalol,  $\alpha$ -terpineol, 4-*trans*-tuyanol y 8-*cis*-mircenol (Bruneton, 1991; Viljoen *et al.*, 2004).



---

## Importancia de los aceites esenciales.

En general, los aceites esenciales son de gran interés para diversas ciencias como son: bioquímica, química, farmacología, medicina, ecología y biotecnología por mencionar algunas, ya que han sido utilizados por el hombre durante miles de años para obtener tintes, saborizantes, fragancias, estimulantes, insecticidas, agentes terapéuticos, etc. (Wink, 1999).

Los aceites esenciales actualmente tienen un gran valor comercial, sobre todo dentro de la industria farmacéutica (Arizio y Curioni, 2003), ya que les han sido atribuidas propiedades medicinales debido a la gran variedad de componentes presentes en ellos, mismos a los que les han sido realizados diversos estudios que han verificado sus diversas actividades. Por ejemplo, el género *Lippia* ha sido uno de los más estudiados, ya que son varias las plantas pertenecientes a éste, las que son utilizadas en la medicina tradicional indígena (Compadre *et al.*, 1987, Juven *et al.*, 1994, Pascual *et al.*, 2001; Bassole *et al.*, 2003; Hernández, 2004).

Los estudios fitoquímicos de los aceites esenciales han determinado los compuestos activos que presentan algunas de las plantas pertenecientes a dicho género, entre los que figuran el timol, carvacrol, cimeno, isocariofileno, entre otros, que han mostrado actividad antibacteriana, antifúngica e insecticida, por mencionar algunas (Compadre *et al.*, 1987, Juven *et al.*, 1994, Pascual *et al.*, 2001; Bassole *et al.*, 2003; Hernández, 2004). Sin embargo son pocos los estudios que tienen como fin, explicar la relación que existe entre la composición de los aceites esenciales y su medio (ya sea físico o biológico).

Debido a lo anterior, surge la necesidad de conocer si las condiciones de un lugar influyen para que la planta produzca o no ciertos compuestos con actividad antimicrobiana, por lo que el presente trabajo tiene como fin evaluar la correlación que existe entre la composición y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia graveolens*, correspondiente a dos zonas de estudio que presentan diferentes patrones de degradación.



---

## COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* H.B.K. EN DOS ZONAS DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA.

### RESUMEN

Las plantas suelen presentar propiedades biológicas, que les son conferidas por la producción de metabolitos secundarios cuya composición y cantidad depende del medio ambiente. El presente estudio tiene como objetivo determinar si existe variación en la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia graveolens* en dos zonas con diferentes patrones de degradación ambiental pertenecientes a Zapotitlán Salinas, Puebla (zona A y zona B). Mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor se obtuvo el aceite esencial. La identificación de los compuestos del aceite se realizó mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. La actividad antibacteriana y antifúngica del mismo, se determinó mediante la técnica de difusión en agar (de Kirby Baüer) contra trece cepas bacterianas (cuatro Gram positivas y nueve Gram negativas) y cinco cepas de hongos (4 fitopatógenos y uno dermatofito). La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida Mínima (CBM) se determinó mediante la técnica de dilución en agar; mientras que la Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>) y la Fungicida Mínima (CFM) se determinaron mediante la técnica de inhibición del crecimiento radial del micelio. De los aceites esenciales obtenidos en la zona A se identificaron seis compuestos y en la zona B cinco, de los cuales el 98.23% y el 96% corresponde a monoterpenos respectivamente, siendo timol el componente mayoritario para las dos zonas. Los aceites esenciales presentaron actividad antimicrobiana en todos los microorganismos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las cepas bacterianas y entre las zonas; así mismo entre las cepas de hongos, entre concentraciones y entre las zonas, lo que sugiere que las condiciones ambientales dadas en ambas zonas podrían influir en la composición y actividad de los aceites esenciales, por otro lado, el timol podría ser uno de los principales componentes que actúan contra los microorganismos provocando la inhibición de su crecimiento.



## ANTECEDENTES

En varios países en desarrollo las enfermedades diarreicas representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político. México es una de las naciones que registran a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos (Kumate, 1988), siendo muy elevado el costo en vidas humanas.

De acuerdo a la Secretaría de Salud (Ssa) las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupan la decimocuarta causa de fallecimientos a nivel nacional y los estados con mayor incidencia son Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y el Distrito Federal.

Debido a lo anterior es importante retomar lo significativo que pueden ser algunos metabolitos secundarios con poder antiséptico (y no antibiótico), como el de los aceites esenciales de algunas plantas, que se manifiestan frente a bacterias patógenas que incluyen ciertas cepas antibioresistentes. Algunos aceites esenciales, también son activos frente a hongos inferiores responsables de micosis, e incluso, frente a levaduras (*Candida*) (Bruneton, 1991).

Por otro lado, a nivel mundial, la historia agrícola y forestal indican que a través del tiempo el número de organismos patógenos de cultivos se ha incrementado y con ellos los costos de manejo de plagas. Los hongos causantes de enfermedades en cultivos de importancia económica, siguen siendo una limitante en la producción, por lo que es necesario encontrar herramientas que se adecuen a las estrategias de manejo integral de las enfermedades y plagas en los cultivos (Agrios, 1988).

Los aceites esenciales de plantas representan una alternativa para la protección de los cultivos contra plagas, ya que sus componentes poseen un amplio espectro de actividad contra insectos, ácaros, hongos y nemátodos, así como a plagas que atacan granos almacenados (Arcina-Lozano *et al.*, 2004).



---

Con lo anterior, se hace evidente la importancia que tienen los aceites esenciales en varios de campos de estudio. A continuación se mencionan algunos de los estudios realizados a los aceites esenciales de la familia Verbenaceae y de algunos géneros de *Lippia*, incluyendo *L. graveolens*.

---

Referencia	Estudios
Garcilazo, 2003	Reporta que los compuestos carvacrol, isocariofileno y $\alpha$ -bisabolol, están presentes en el aceite esencial de <i>Lantana achyranthifolia</i> , especie perteneciente a la familia Verbenaceae. De igual forma, menciona que estos terpenos presentan actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y negativas.
Pascual <i>et al.</i> , 2001	Realizan una revisión sobre la composición química, actividad farmacológica y los usos tradicionales de 52 especies pertenecientes al género <i>Lippia</i> , reportando que los aceites esenciales son los responsables de la actividad antimicrobiana. Los usos más frecuentes son para tratamientos de enfermedades gastrointestinales y respiratorias.
Bassole <i>et al.</i> , 2003	Reportan que los compuestos timol, $p$ -cimeno, 2 feniletilpropano y quimiotipos de acetato de timil, son parte de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>L. chevalieri</i> y <i>L. multiflora</i> . De igual forma encontraron actividad antibacteriana, siendo las bacterias Gram negativas las de mayor sensibilidad a los aceites.

---



---

Referencia	Estudios
Viljoen <i>et al.</i> , 2004	Indican que en la química de los aceites esenciales en una población natural de <i>L. javanica</i> puede existir variación por la presencia de quimiotipos. Esta especie es utilizada para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos.
Domínguez <i>et al.</i> , 1989	Identificaron en las ramas y la raíz de <i>L. graveolens</i> los flavonoides naringenina y pinocebrina; así como el compuesto lapachenole.
Compadre <i>et al.</i> , 1987	Reportan a <i>p</i> -cymeno, 1,8-cineol, timol y carvacrol como parte de los compuestos principales del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> .
Juven <i>et al.</i> , 1994	Mecanismo de acción del timol; el cual atraviesa la pared bacteriana, interactúa con las enzimas periplasmáticas y después de penetrar en el interior rico en lípidos de la membrana citoplasmática, interactúa con las proteínas de la membrana causando reentraflujo de protones a través de la membrana afectando metabolismo energético de la bacteria.

---



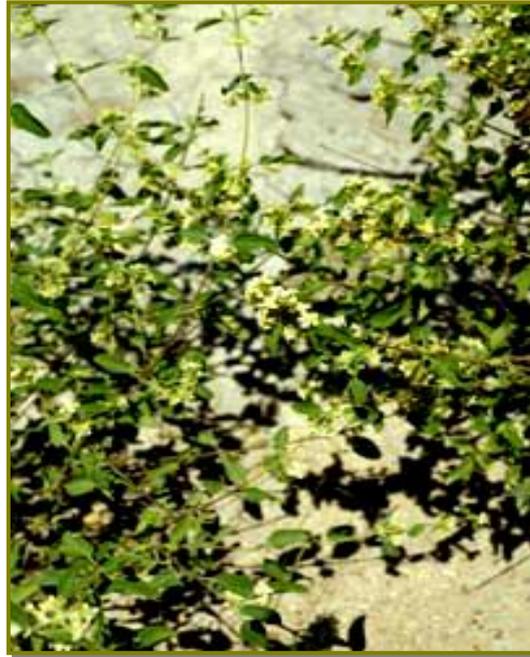
---

Referencia	Estudios
González <i>et al.</i> , 1999	Realizan un estudio en el que reportan que el aceite esencial de <i>L. graveolens</i> (timol) causa letalidad y repelencia en hembras adultas de <i>Varroa jacobsoni</i> , la cual afecta seriamente al área apícola.
Hernández <i>et al.</i> , 2003	Mencionan que <i>L. graveolens</i> es la planta más utilizadas en la medicina tradicional de Zapotitlán Salinas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.
Arcina-Lozano <i>et al.</i> , 2004	Reporta que las especies de orégano: <i>Oreganum vulgare</i> y <i>L. graveolens</i> , son utilizados no solamente con fines culinarios, sino también para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, debido a la presencia de flavonoides y compuestos terpénicos como el timol.
Hernández, 2004	Proporciona datos en los que revela que el carvacrol (37.86%), acetato de terpine-4-ol (22.35%) y <i>m</i> -cimeno (20.42%), son los principales componentes de <i>L. graveolens</i> . Además, reporta que estos tienen un amplio espectro de actividad ya que actuaron sobre trece cepas bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas, siendo en estas últimas donde se encontró la mayor sensibilidad.

---



## DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA.



**Figura 1. *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano).**

**Reino:** Vegetal

**División:** Antophyta

**Clase:** Dicotiledónea

**Orden:** Tubiloflorales

**Familia:** Verbenaceae

**Género:** *Lippia*

**Especie:** *graveolens*

**Nombre técnico:** *Lippia graveolens* H.B.K.

**Nombres comunes:** orégano, orégano de monte, hierba dulce, mejorana, cachachica, canelilla, orégano del país, oreganón y salvia de castilla.



**Descripción botánica:** *Lippia graveolens* (orégano) es un arbusto delgado del alrededor de 2 m de alto; con ramas cortamente pilosas. Las hojas con lámina oblonga a elíptica u ovado-oblonga, por lo general 2-4 cm de largo, el haz es denso y suavemente piloso, el envés es glandular y densamente tomentoso a piloso, el margen es finamente crenado, el ápice es generalmente obtuso o redondeado, la base es redondeada a subcordada, los pecíolos miden de 5-10 mm de largo, las espinas son subglobosas de 4-12 mm de largo. Las brácteas son comúnmente en 4 hileras, ovadas o lanceoladas, glandulares y densamente pilosas. El cáliz mide de 1-2 mm de largo (alberga a los frutos), es glandular y veloso. La corola es blanca de alrededor de 3mm de largo (Figura 1) (PROCYMAF-SEMARNAP, 2003).

**Distribución y hábitat:** *L. graveolens* es originaria de América boreal y austral, presente en climas cálido, semicálido y templado desde el nivel del mar hasta los 2200 m.s.n.m. Se encuentra distribuida desde Estados Unidos, México, Guatemala, Nicaragua y Honduras.

En México, en su mayoría crece en zonas semiáridas del norte (Chihuahua y Coahuila), sin embargo también la podemos encontrar en estados como Veracruz, Jalisco, Oaxaca, Michoacán, entre otros (Figura 2).

Esta especie se distribuye sobre lomeríos de origen sedimentario, donde existe una pequeña capa de suelo, generalmente sobre terrenos pedregosos y con afloramiento de rocas calizas; formando parte del estrato inferior del tipo de vegetación Matorral. *Lippia sp* es cultivada en huertos familiares y asociada a bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino (PROCYMAF-SEMARNAP, 2003).



**Figura 2. Distribución de *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano)**

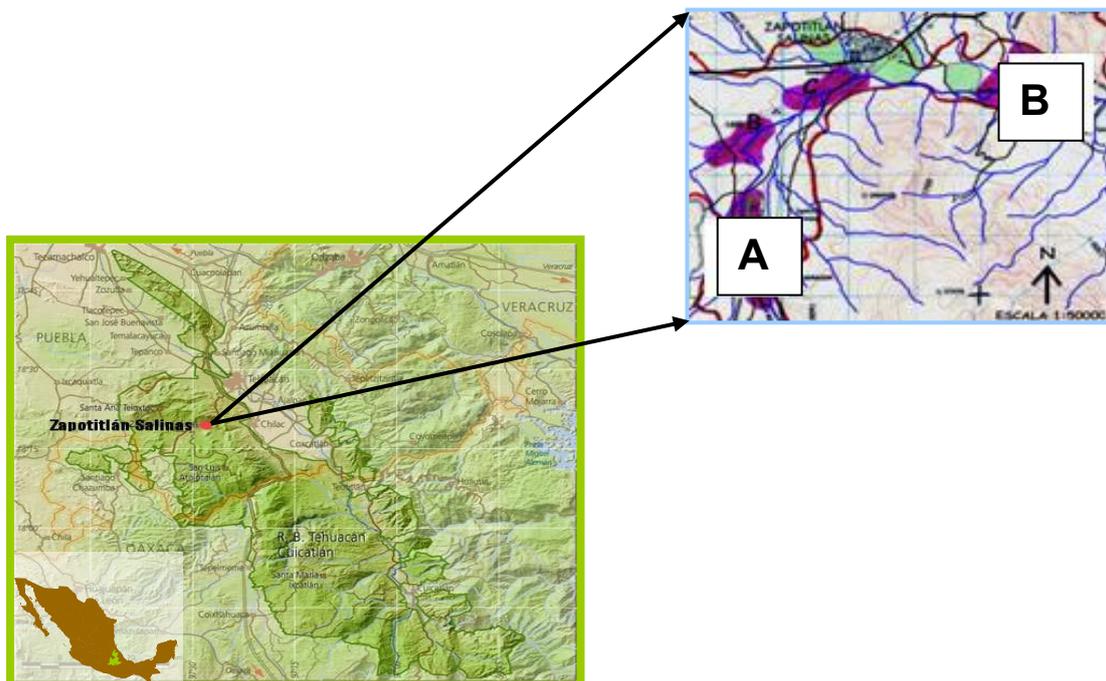
**Usos:** Esta especie es utilizada para aliviar enfermedades como la tos, tanto en los estados del Pacífico como Michoacán y Nayarit, así como en el estado de Tlaxcala. Otros padecimientos de carácter respiratorio en los que se utiliza son para el catarro y la bronquitis. También se utiliza como expectorante y en enfermedades gastrointestinales como en el tratamiento de cólicos estomacales, diarrea y para la digestión (Pascual *et al.*, 2001).

Las ramas con hojas y flores, se emplean en forma de té para la tos, el cual es ingerido en ayunas. Se toma sólo una vez si se tienen molestias causadas por la fiebre. En cambio como agua de tiempo se le utiliza como abortivo. El cocimiento de las hojas se ocupa como emanagogo para que baje la regla. Si se le agregan más hojas, agua y un poco de alcohol se puede usar para dar baños de asiento cuando hay comezón en la vagina. La hoja soasada se pone en heridas y granos. El jugo de las hojas soasadas, puesto en forma de gotas o tomado en aceite de cocina sirve para el dolor de oídos (Argueta y Cano, 1994).



## AREA DE ESTUDIO

El municipio de Zapotitlán Salinas se localiza al sureste del Estado de Puebla y se encuentra dentro de la provincia florística de Tehuacán-Cuicatlán (Villaseñor *et al.*, 1990) (Figura 3). Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 07' 18" y 18° 26' 00" latitud norte y 97° 19' 24" y 97° 39' 06" longitud oeste.



**Figura 3. Localización geográfica del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. A, Terrazas del Jardín botánico y B, Las Granjas.**

El valle de Zapotitlán, pertenece a la provincia de la Alta Mixteca-Oaxaqueña y al sistema geográfico Sierra de Zapotitlán, a una altitud de 1500 a 2300 m.s.n.m. (Valiente-Banuet *et al.*, 2000). Sus colindancias son: al norte con Tehuacán, al sur con Caltepec, al oriente con San Gabriel Chilac, San José Huiahuatlán y Altepexi y al poniente con Atexcal y el estado de Oaxaca. Tiene una superficie de 484.77 m<sup>2</sup> (Secretaría de Gobierno, Puebla, 1999).



El clima del valle de Zapotitlán Salinas corresponde a la clasificación de Köppen modificada por García (1998): Bsohw (w)(e)g, el cual corresponde a un clima seco con régimen de lluvias en verano, con dos máximos de lluvias, separados por dos estaciones secas. Presenta una temperatura media anual de 19.8 °C con una canícula bien definida a la mitad del período de lluvias y una precipitación media anual de 542 mm (Dávila *et al.*, 2002).

De acuerdo con Rzedowski (1978), el municipio presenta la mayor parte de su territorio cubierto por vegetación característica del clima seco. Destacan las grandes áreas de matorral crasicaule, generalmente asociado con cardonales, y ocasionalmente con vegetación secundaria arbustiva; es la vegetación dominante, presentando en algunas áreas erosión.

Desde el punto de vista edáfico, en la mayor parte del área los suelos son someros, pedregosos y muestran diferentes niveles de alcalinidad y salinidad, producto de la influencia de los diferentes sustratos geológicos presentes en el sitio. Las principales unidades de suelos reportados son: litosoles, cambisoles cálcicos y xerosoles cálcicos derivados de evaporizas del cretácico inferior y medio, complementados con regosoles y fluvisoles calcáricos formados por materiales transportados derivados de sedimentos aluviales.

Dentro del Valle de Zapotitlán, existe gran variedad y riqueza de comunidades vegetales, atribuidas principalmente a las transformaciones ocurridas a finales del cuaternario, específicamente por procesos de erosión remontante (Oliveros, 2000; Valiente-Banuet *et al.*, 2000). Estos procesos permitieron, que en las cimas planas de los cerros se presenten calizas como roca madre, mientras que en las zonas de laderas, se observan afloramientos de roca lutita. Finalmente, a lo largo del cauce del río “El Salado” se presentan zonas de depositación aluvial, las cuales han dado pie a la formación de terrazas, constituidos de sedimentos transportados de diferentes orígenes que han rellenado las partes bajas del Valle, formando así suelos profundos que sirven



de soporte para el desarrollo de comunidades vegetales conocidas como mezquiales (Oliveros, 2000).

Las terrazas aluviales presentan suelos jóvenes de origen calcáreo y profundidad variable, predominando los fluvisoles y regozoles calcáreos. En la zona se presentan dos series de suelos; la primera es la serie Zapotitlán, que se encuentra distribuida en la mayoría de las terrazas, presenta suelos formados por sedimentos fluviales muy ricos en carbonato de calcio, color gris y textura franco y franco arcillosa. La segunda serie es la denominada Granjas, en ella los suelos son de color pardo o pardo amarillento, son de textura franco arenosa con moderado contenido de carbonatos, presentan minerales de hierro y tienen de pobres a moderados contenidos de materia orgánica (Oliveros, 2000).

Las terrazas, han sido un punto de partida para llevar a cabo el diagnóstico físico y biológico del lugar dentro del proyecto general de la UBIPRO, ya que en la última década, la zona ha sido aprovechada para llevar a cabo diferentes actividades productivas como la agricultura de temporal, ganadería extensiva y extracción de leña. Lo anterior ha contribuido a que estos sistemas se observen más fragmentados (Oliveros, 2000).

En la actualidad el Valle cuenta con una división de 5 zonas por el grado de deterioro (de la más conservada a la más deteriorada), que si bien no esta bien definido, no se puede negar que los factores ambientales o bien la mano del hombre han afectado al lugar, presentando así una problemática ambiental que supone existencia de baja productividad, desertificación, alteración de los sistemas naturales, desequilibrio en los procesos e interacciones ecológicas, disminución y pérdida de biodiversidad (Oliveros, 2000).

Las características físico-bióticas de las zonas de estudio son las siguientes:

**Zona A (Terrazas del Jardín botánico).** En esta zona se observan altos niveles de deterioro, producidos en su mayor proporción por el cambio en el



uso de suelo. Actualmente, los terrenos se trabajan en parcelas que por la pérdida de fertilidad natural y escasa precipitación no permiten la obtención de una buena producción, lo que ocasiona su abandono. El subsuelo presenta un proceso de colapsamiento y la fragmentación de la terraza se encuentra en su máximo nivel, donde se observa la formación de pináculos creados por erosión, deslizamiento y derrumbes de grandes masas de sedimentos, formación de agrietamientos, fosas y depresiones. El suelo original ya no existe y se observan afloramientos de los materiales geológicos originales, formados en su mayoría por sedimentos arcillosos derivados de lutitas y calizas (Oliveros, 2000).

En la zona se observan cambios físicos que alteran el relieve formando montículos separados a manera de “islas” y en la época de lluvias se desarrolla una serie de canales que favorecen el drenaje superficial, pero limitan la infiltración, incrementando el proceso de deterioro físico y químico hasta formar los paisajes conocidos como “tierras malas”. En cuanto a la vegetación, en esta zona se han registrado 17 familias y 28 especies creciendo en toda una gama de condiciones que incluye parches con vegetación más o menos conservada, otros más perturbados y otros tantos prácticamente sin vegetación (Oliveros, 2000).

**Zona B (“Las Granjas”).** En esta zona la vegetación está bien conservada y dominan las condiciones naturales de selva baja perennifolia con espinas laterales. No existen evidencias claras de deterioro y los sistemas de vegetación presentan sus elementos y procesos en situación normal; es decir presentan la vegetación original del lugar. Los materiales geológicos (sedimentos aluviales) aún conservan sus estructuras primarias con nula o poca alteración; presenta suelos arenosos con una morfología completa y con horizontes superficiales en buenas condiciones. La vegetación muestra una estructura fisonómica bien definida, con una mayor diversidad y riqueza específica, constituida por 28 familias y 44 especies. El tipo de vegetación dominante es matorral espinoso (Oliveros, 2000).



---

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- ∅ Comparar la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia graveolens* H.B.K. en dos zonas de Zapotitlán Salinas, Puebla.

### Objetivos particulares

- ∅ Determinar los principales componentes del aceite esencial de *Lippia graveolens* en ambas zonas.
- ∅ Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de ambas zonas.
- ∅ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM), la Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) del aceite esencial de ambas zonas.
- ∅ Evaluar la correlación entre la composición química y la actividad biológica del aceite esencial de *Lippia graveolens* correspondiente a las dos zonas de estudio.



---

## METODOLOGÍA

### Colecta

La parte aérea de *Lippia graveolens* (Orégano) fue recolectada en dos zonas de la comunidad de Zapotitlán Salinas, Puebla durante el mes de Septiembre de 2005. Las zonas trabajadas fueron: las terrazas del Jardín botánico y las Granjas, estas fueron identificadas como la zona A y B, respectivamente. Los ejemplares fueron depositados en el herbario IZTA de la FES-Iztacala, UNAM con el número de registro: IZTA 41683 y fueron identificados por la curadora del mismo, Bióloga Edith López Villafranco.

### Extracción del aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial, se sometieron 945 g (zona A) y 851 g (zona B) de material fresco y fragmentado mediante destilación por arrastre de vapor (Domínguez, 1973) (Apéndice I).

### Identificación de los compuestos constituyentes del aceite esencial.

La identificación de los compuestos del aceite esencial de *L. graveolens* se realizó en el Instituto de Química, UNAM, mediante un análisis en cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5809 serie II conectado a un espectrómetro de masas Jeol AX505H, utilizando una columna de 30 cm por 0.2 mm y con un diámetro interno de 0.25 mm.

Las condiciones de separación fueron: temperatura del horno del inyector 80-220 °C (aumentando gradualmente la temperatura a razón de 8 °C por minuto del inyector 225 °C). El de gas de acarreo fue He con una presión de 134 Kpa (19 Psi) y con una velocidad lineal de 20 cm/s. La cantidad de muestra empleada fue de 1.0 µl. La energía de ionización fue de 70 ev. Los nombres comunes de los compuestos fueron identificados con el Phytochemical Dictionary presente en la memoria de la computadora (Herbert & Baxter, 1993).



---

## **Evaluación de la actividad antibacteriana.**

### **Cepas bacterianas.**

Los microorganismos empleados para evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales fueron: *Vibrio cholerae* No.01, *Vibrio cholerae* INDRE 206, *V. cholerae* aislada de un caso clínico, correspondiente al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor, *V. cholerae* CDC V 12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Enterobacter aerogenes* y *Bacillus subtilis* (donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán), *Yersinia enterocolitica* (donada por el laboratorio de Análisis clínicos de la CUSI de la FES-Iztacala). *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis* y *Sarcina lutea* (donadas por la FES-Cuautitlán).

### **Evaluación cualitativa**

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Van den Berghe & Vlietink, 1991). Los sensidiscos fueron impregnados con 5 µl de aceite esencial. Como control positivo se utilizaron sensidiscos de cloramfenicol (25 µg) y como control negativo se utilizaron sensidiscos con aceite de oliva estéril. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice II).

### **Evaluación cuantitativa**

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se utilizó el método modificado de dilución en agar (Jones *et al.*, 1987, citado y modificado por Ávila, 1996). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015 y 0.007 mg/ml del aceite. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice III).



---

### **Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento bacteriano.**

El estudio se determinó de acuerdo al método propuesto por Kubo y colaboradores (Kubo *et al.*, 1993; citado en Avila, 1996). Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Sarcina lutea* (Gram +) y *Vibrio cholerae* c.c. (Gram -). Las concentraciones empleadas fueron ½ CMI, CMI Y CBM (Apéndice IV).

### **Evaluación de la actividad antifúngica.**

#### **Microorganismos utilizados.**

Las especies de los hongos utilizados para evaluar la actividad antifúngica fueron: *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum* ATCCNRL 3299, *Trichophyton moniliforme* y *Rhizoctonia solani*, donadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala.

#### **Determinación cualitativa**

Para evaluar la actividad antifúngica, se utilizaron sensidiscos impregnados con 5 µl de aceite esencial (Wang & Bun, 2002). Como control positivo se utilizaron sensidiscos de ketoconazol (56 µg). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice V).

#### **Determinación cuantitativa.**

Para determinar la Concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) y la Concentración fungicida mínima (CFM) se utilizó el método modificado de dilución en agar (Wang & Bun, 2002). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015 y 0.007 mg/ml. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice VI).

#### **Análisis estadístico**

A los datos obtenidos de la actividad antibacteriana se les realizó un análisis de varianza bifactorial, en donde los factores fueron las bacterias y las zonas; mientras que para la actividad antifúngica el análisis fue multifactorial siendo los factores las cepas de hongos, la concentración y las zonas.



## RESULTADOS

### Extracción del Aceite Esencial.

El rendimiento obtenido del aceite esencial fue de 2.26 g con una densidad de 0.93 g/ml para la zona A, mientras que para la zona B fue de 1.83 g con una densidad de 0.90 g/ml.

### Composición del aceite esencial.

En los cromatogramas de las zonas A (Figura 4) y B (Figura 5) se observan diferentes picos, los cuales por el tiempo de retención y por sus patrones de fragmentación se identificó la presencia de seis compuestos para la zona A y cinco para la zona B (Ver cuadro 1). Del cien por ciento de los compuestos, el 96 % y el 98 % corresponden a monoterpenos, respectivamente, mientras que el resto son sesquiterpenos.

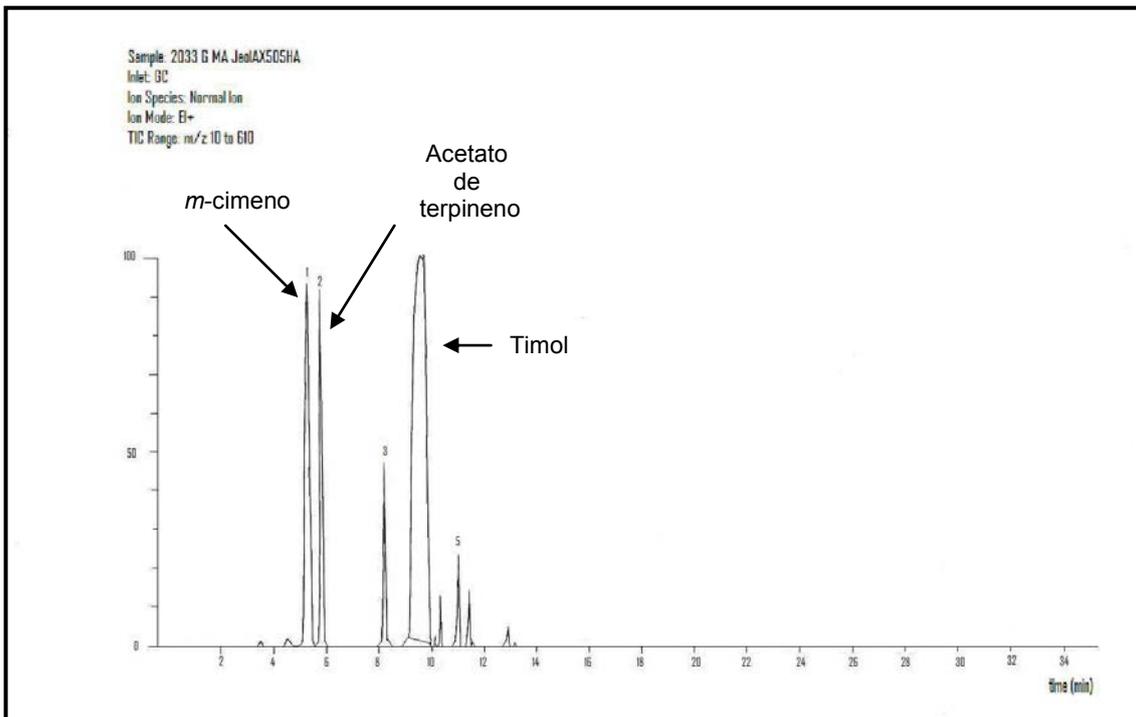


Figura 4. Cromatograma del aceite esencial de *L. graveolens* de la zona A.

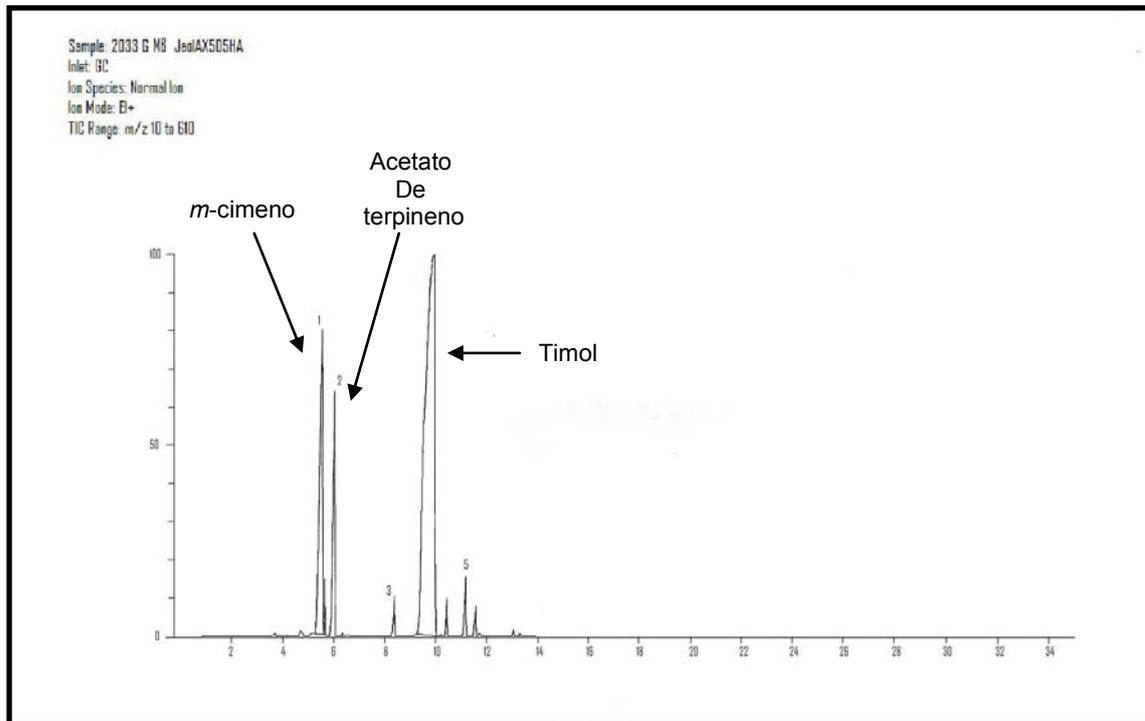
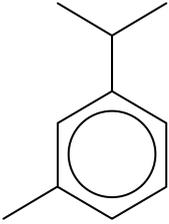
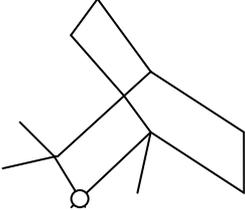
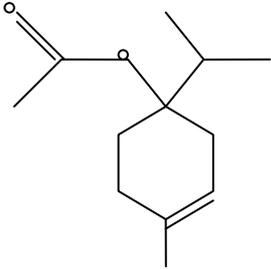


Figura 5. Cromatograma del aceite esencial de *L. graveolens* de la zona B.

En el cuadro 1 se muestran los componentes del aceite esencial de ambas zonas, en el se puede observar que los componentes principales de *Lippia graveolens* fueron timol (61.64 y 70.52 %) y *m*-cimeno (20.30 y 17.85 %) para ambas zonas. A diferencia de lo anterior se detectaron el humuleno y 1, hidroxil, 2 terbutil 4 metil benceno en la zona A y el 1,8-cineol en la zona B.

Cuadro 1. Composición del aceite esencial de *L. graveolens* en ambas zonas.

Compuesto	Fórmula	Estructura	PM	Zona A (%)	Zona B (%)
<i>m</i> -cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>		134	20.30	17.85
1,8-cineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		154	-	0.65
acetato de terpineno	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>		196	10.82	9.21



Compuesto	Fórmula	Estructura	PM	Zona A (%)	Zona B (%)
1, hidroxi, 2 terbutil 4 metil benceno	$C_{11}H_{16}O$		184	4.24	-
timol	$C_{10}H_{14}O$		150	61.64	70.52
isocariofileno	$C_{15}H_{24}$		204	2.09	1.77
humuleno	$C_{15}H_{24}$		204	0.91	-

Simbología: PM, peso molecular; %, porcentaje de presencia; - no se detecto.



## Evaluación de la actividad antibacteriana

### Evaluación cualitativa.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens* se muestran en el cuadro 2.

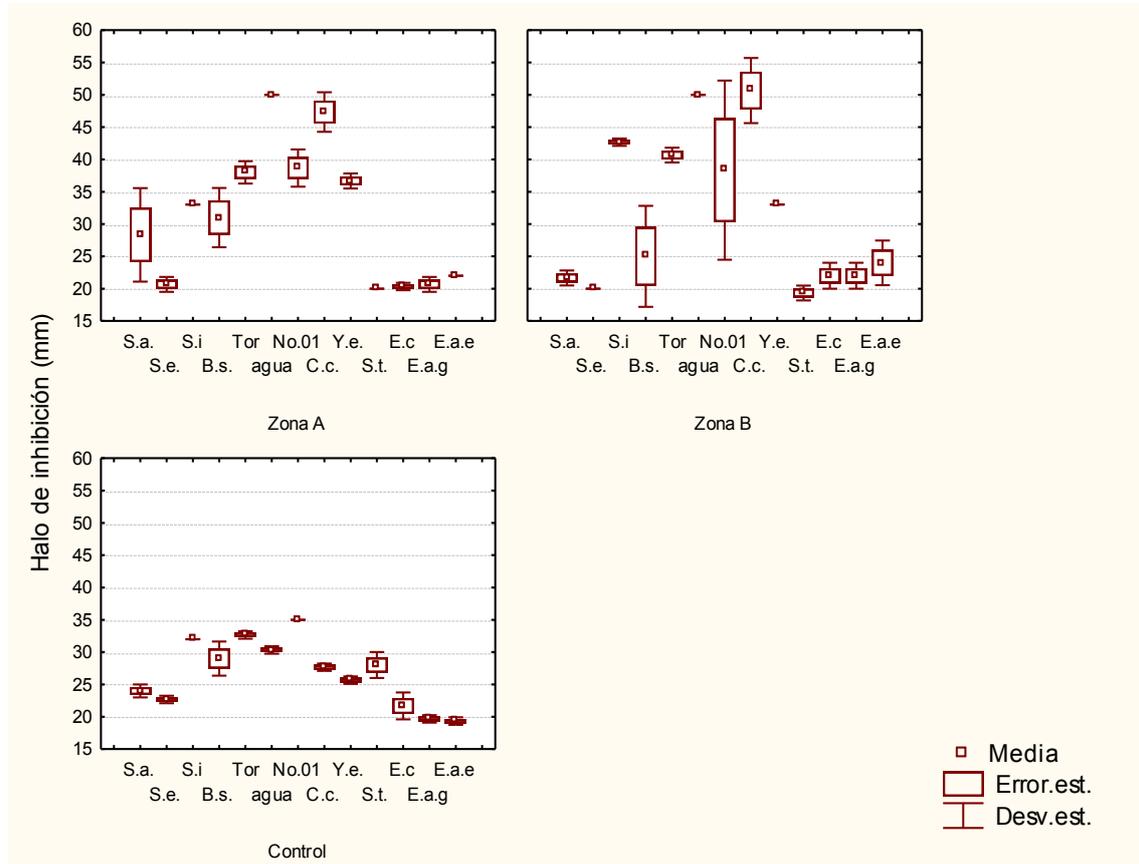
**Cuadro 2. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens* de las zonas A y B.**

Bacteria	Halos de inhibición (mm)		
	Cloramfenicol	Aceite de <i>L. graveolens</i>	
		Zona A	Zona B
S.a.	24.00 ± 1.00	28.33 ± 7.23	21.66 ± 1.15
S.e.	22.55 ± 0.57	20.66 ± 1.15	20.00 ± 0.00
S.l.	32.00 ± 0.00	33.00 ± 0.00	42.66 ± 0.57
B.s.	29.00 ± 2.64	31.00 ± 4.58	25.00 ± 7.81
Tor.	32.64 ± 0.57	38.00 ± 0.00	40.66 ± 1.15
Agua.	30.33 ± 0.57	36.00 ± 3.00	36.00 ± 3.00
No.01	35.00 ± 0.00	38.66 ± 2.88	38.33 ± 13.8
C.c.	27.66 ± 0.57	47.33 ± 3.05	50.66 ± 5.03
Y.e.	25.66 ± 0.57	36.66 ± 2.88	11.0 ± 19.05
S.t.	28.00 ± 2.00	20.00 ± 0.00	19.33 ± 1.15
E.c.	21.66 ± 2.08	20.33 ± 0.57	22.00 ± 2.00
E.ag.	19.66 ± 0.57	20.66 ± 1.15	22.00 ± 2.00
E.ae.	19.33 ± 0.57	22.00 ± 0.00	24.00 ± 3.46

Simbología: S.a. *Staphylococcus aureus*, S.e. *Staphylococcus epidermidis*, S.l. *Sarcina lutea*, B.s. *Bacillus subtilis*, Tor. *Vibrio cholerae* CDC V 12, Agua. *Vibrio cholerae* INDRE 206, No.01 *Vibrio cholerae* No-01, C.c. *Vibrio cholerae* caso clínico, Y.e. *Yersinia enterocolitica*, S.t. *Salmonella typhi*, E.c. *Escherichia coli*, E.ag. *Enterobacter agglomerans*, E.ae. *Enterobacter aerogenes*. Para los bioensayos se utilizaron 5µl de aceite esencial por disco. El control positivo (cloramfenicol) consistió en sensibilizados de 25µg.

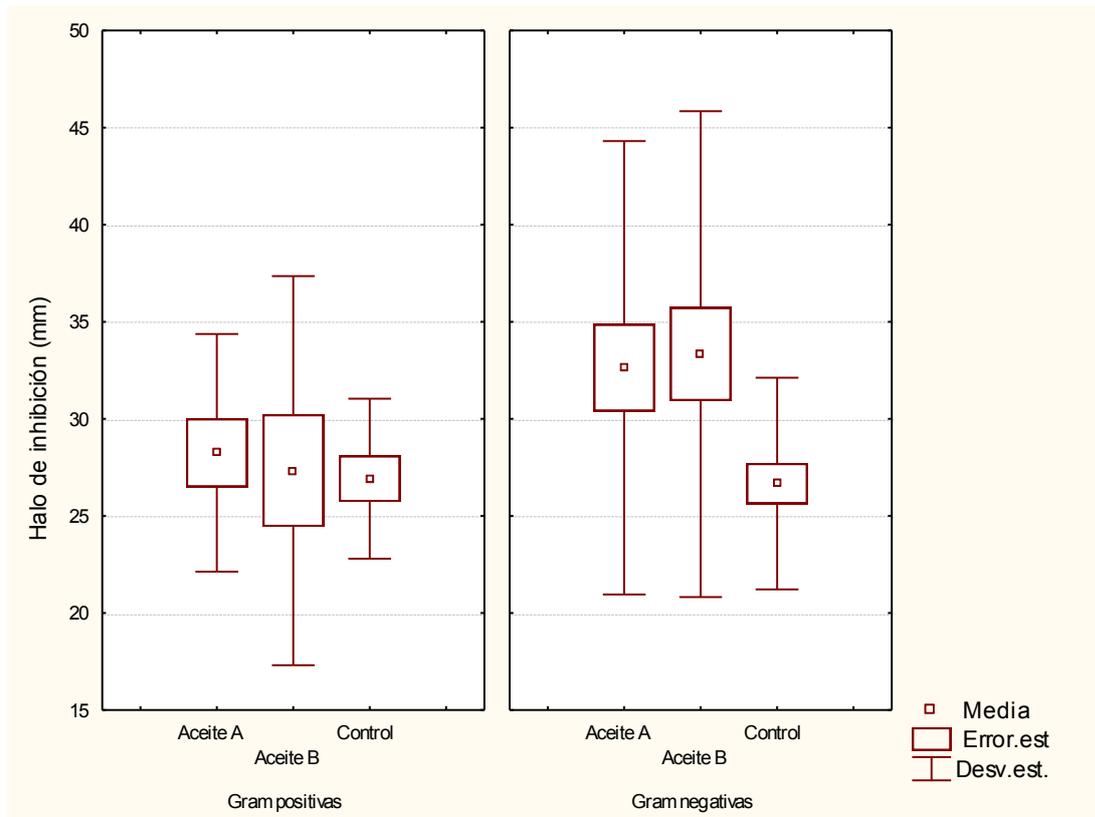


Se observa que tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas fueron sensibles al aceite esencial.



**Figura 6. Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens* de las zonas A y B.**

La figura 6 muestra que el aceite esencial de *L. graveolens* de ambas zonas presentó una mayor actividad en las trece cepas bacterianas que el control (cloramfenicol), en algunos casos con halos de inhibición de más de 35mm. También se aprecia que las bacterias Gram negativas fueron las que mostraron los mayores halos de inhibición, sobre todo las cuatro cepas de *V. cholerae* en ambas zonas. *Y. enterocolitica* mostró mayores halos de inhibición en la zona A que en la zona B y *Sarcina lutea* en la zona B que en A. Se encontraron diferencias significativas ( $F=59.825$ ,  $P<0.001$ ) entre el efecto del aceite y las cepas bacterianas así como entre zonas ( $F=26.039$ ,  $P<0.001$ ), siendo el aceite esencial de la zona B el más activo.



**Figura 7. Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens* de las zonas A y B en bacterias Gram positivas y Gram negativas.**

En la figura 7 se aprecia que tanto las bacterias Gram positivas ( $\bar{X}$  =28.25 (A), 27.33 (B)) como las Gram negativas ( $\bar{X}$  =31.07 (A), 29.33 (B)) fueron sensibles, sin embargo no existe una diferencia significativa entre ellas ( $F=3.1246$ ,  $>0.05$ ).

### Evaluación cuantitativa.

Los resultados de la determinación de la CMI y de la CBM se muestran en el cuadro 3; en el cual se puede apreciar que las cepas más sensibles fueron *Y. enterocolitica* para la zona A y *S. lutea*, así como las cuatro cepas de *Vibrio cholerae* para las dos zonas. En todas se requieren de concentraciones de 0.125 mg/ml de aceite esencial para inhibir su crecimiento, sin embargo, *Vibrio cholerae* No.01 es la excepción, ya que esta requirió de 0.06 mg/ml para inhibir su crecimiento en la zona A.

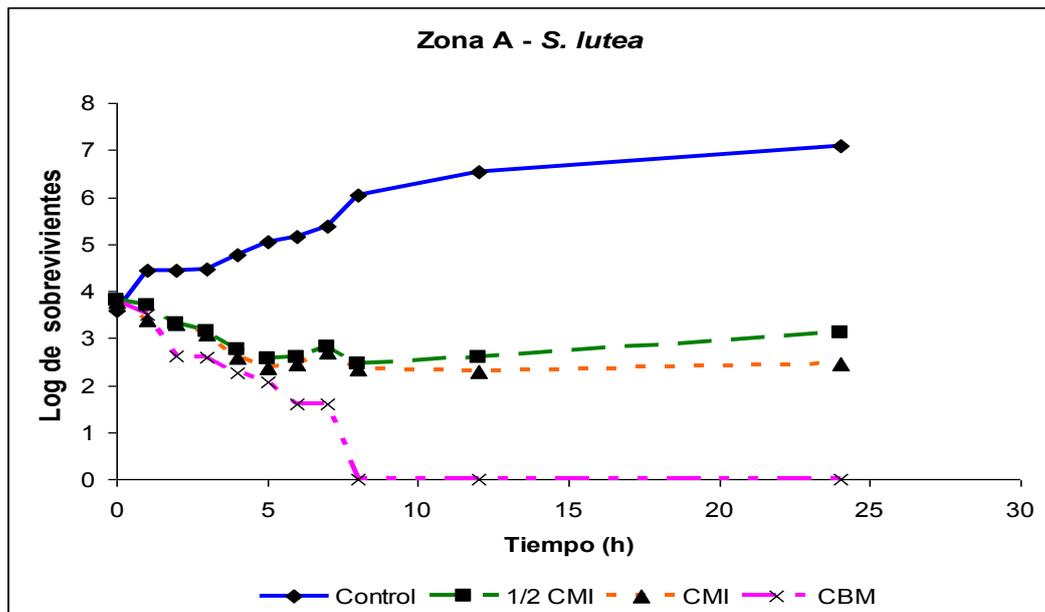


**Cuadro 3. Determinación de la CMI y de la CBM del aceite esencial de *L. graveolens* de las zonas A y B.**

Bacteria	Cloramfenicol		Aceite esencial mg/ml			
	mg/ml		Zona A		Zona B	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S.a.</i>	0.001	0.002	0.25	0.5	0.25	0.5
<i>S.e.</i>	0.002	0.004	0.5	0.75	0.25	0.5
<i>S.l.</i>	0.001	0.002	0.125	0.25	0.125	0.25
<i>B.s.</i>	0.002	0.004	0.25	0.5	0.25	0.5
<i>Tor</i>	0.001	0.002	0.125	0.25	0.125	0.25
<i>Agua</i>	0.001	0.002	0.125	0.25	0.125	0.25
No.01	0.001	0.002	0.06	0.125	0.125	0.25
<i>C.c.</i>	0.001	0.002	0.125	0.25	0.125	0.25
<i>Y.e.</i>	0.001	0.002	0.125	0.25	0.25	0.5
<i>S.t.</i>	0.002	0.004	0.25	0.5	0.25	0.5
<i>E.c.</i>	0.004	0.006	0.25	0.5	0.25	0.5
<i>E.ag.</i>	0.001	0.002	0.25	0.5	0.5	0.75
<i>E.ae.</i>	0.002	0.004	0.25	0.5	0.5	0.75

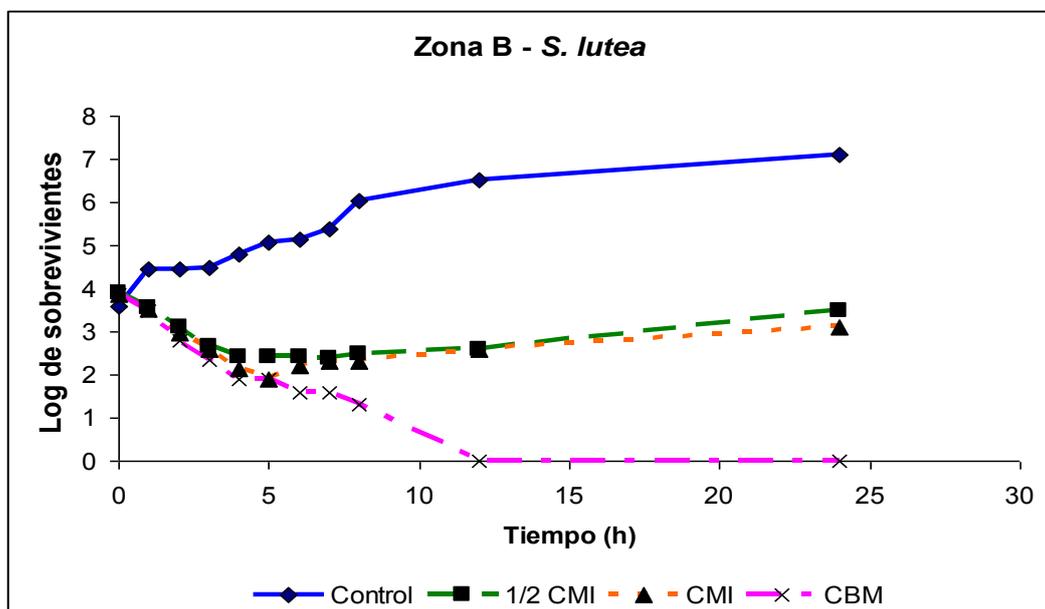
Simbología: *S.a.* *Staphylococcus aureus*, *S.e.* *Staphylococcus epidermidis*, *S.l.* *Sarcina lutea*, *B.s.* *Bacillus subtilis*, *Tor.* *Vibrio cholerae* CDC V 12, *Agua.* *Vibrio cholerae* INDRE 206, No.01 *Vibrio cholerae* No-01, *C.c.* *Vibrio cholerae* caso clínico, *Y.e.* *Yersinia enterocolitica*, *S.t.* *Salmonella typhi*, *E.c.* *Escherichia coli*, *E.ag.* *Enterobacter agglomerans*, *E.ae.* *Enterobacter aerogenes*. CMI. Concentración mínima inhibitoria, CBM. Concentración bactericida media.

El efecto del aceite esencial de *L. graveolens* de cada una de las zonas sobre el crecimiento de una bacteria Gram positiva (*S. lutea*) y una Gram negativa (*V. cholerae* aislada de un caso clínico) se muestran en las figuras 8, 9, 10 y 11.



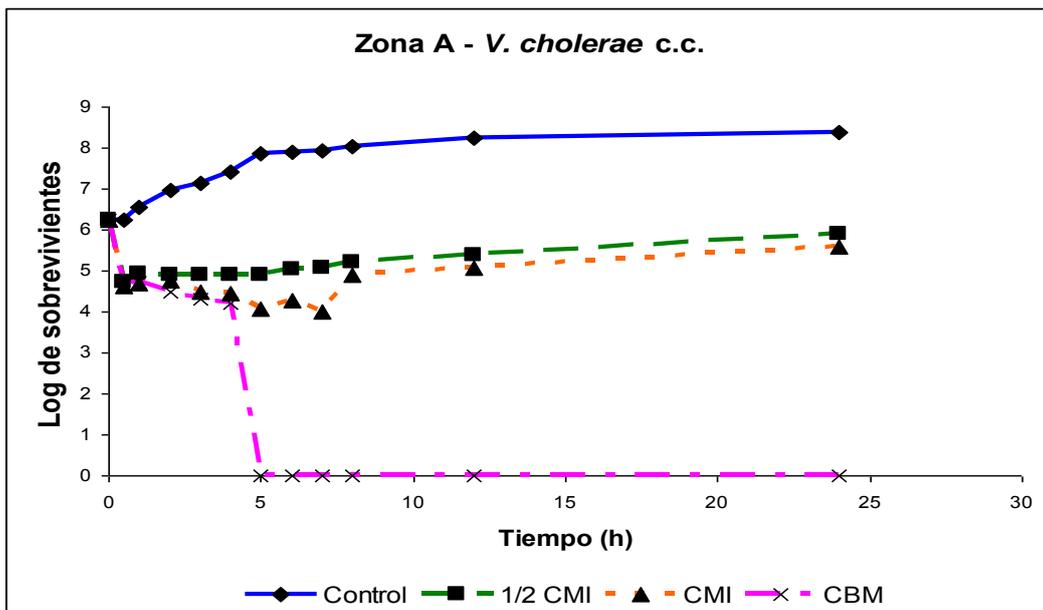
**Figura 8. Efecto del aceite esencial de *L. graveolens* sobre la sobrevivencia de *S. lutea*, en la zona A.**

Las concentraciones empleadas para *S. lutea* en la zona A fueron: 0.0625mg/ml (1/2 CMI), 0.125mg/ml (CMI) y 0.025mg/ml (CBM).



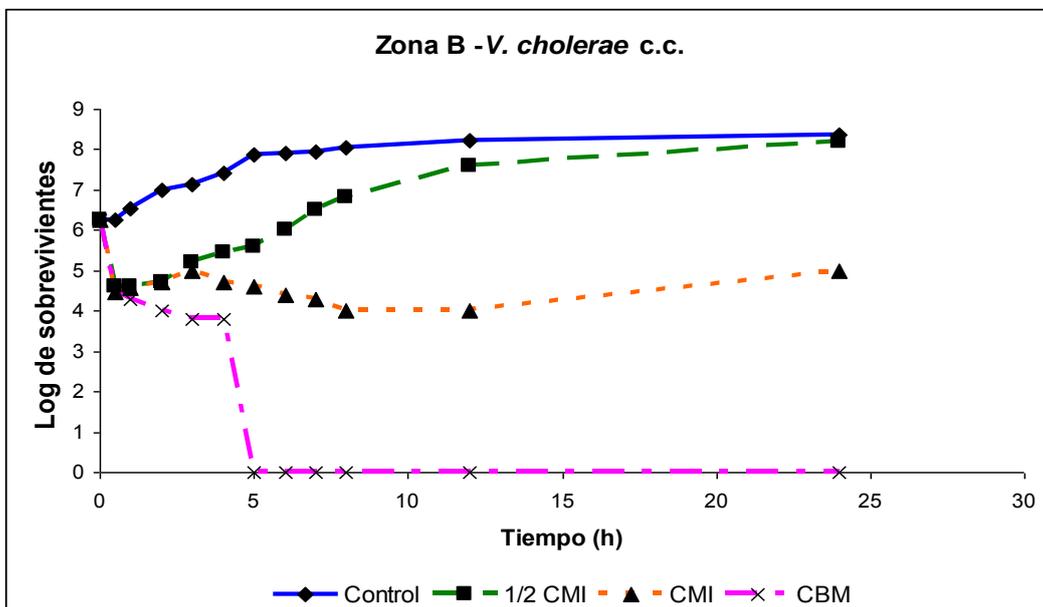
**Fig. 9. Efecto del aceite esencial de *L. graveolens* sobre la sobrevivencia de *S. lutea*, en la zona B.**

Las concentraciones empleadas para *S. lutea* en la zona A fueron: 0.0625mg/ml (1/2 CMI), 0.125mg/ml (CMI) y 0.025mg/ml (CBM).



**Figura 10. Efecto del aceite esencial de *L. graveolens* sobre la sobrevivencia de *V. cholerae* aislada de un caso clínico, en la zona A.**

Las concentraciones empleadas para *V. cholerae* c.c. en la zona A fueron: 0.031mg/ml (1/2 CMI), 0.06mg/ml (CMI) y 0.125mg/ml (CBM),



**Figura 11. Efecto del aceite esencial de *L. graveolens* sobre la sobrevivencia de *V. cholerae* aislada de un caso clínico, en la zona B.**

Las concentraciones empleadas para *V. cholerae* c.c. en la zona B fueron: 0.062mg/ml (1/2 CMI), 0.125mg/ml (CMI) y 0.25 mg/ml (CBM).



---

Como se muestra en las figuras 8, 9, 10 y 11, el efecto del aceite esencial de *L. graveolens* de las zonas A y B sobre la población bacteriana de *S. lutea* y *V. cholerae* c.c. es bacteriostático a dosis iguales o menores a CMI; mientras que la concentración igual a CBM muestran un efecto bactericida.

En la curva de supervivencia correspondiente a *S. lutea*, se puede observar que la muerte celular se apreció desde la primera hora, sin embargo, el aceite esencial de la zona A provocó la muerte celular aproximadamente a las 8 horas (Figura 8). El aceite esencial de la zona B mostró menor actividad, ya que la muerte de *S. lutea* fue aproximadamente a las 12 horas (Figura 9).

El efecto del aceite esencial de *L. graveolens* de las dos zonas de estudio, sobre la sobrevivencia de *V. cholerae* c.c. tuvo el mismo efecto. Desde la primera hora hubo cambios en cuanto al número de sobrevivientes la muerte celular, la cual concluyo aproximadamente a las 5 horas (Figuras 10 y 11), lo cual refleja una curva de supervivencia del tipo de impactos múltiples.



## Evaluación de la actividad antifúngica.

### Evaluación cualitativa.

El aceite esencial de *L. graveolens* presentó actividad contra las cinco cepas desafiadas.

### Evaluación cuantitativa.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento radial para las zonas A y B se muestran en los cuadros 4 y 5.

**Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *L. graveolens* de la zona A.**

Concentración mg/ml	Hongos % (Zona A)				
	Rs	Fs	An	Fm	Tm
0.007	0.00 ± 0.00	15.83 ± 5.20	15.6 ± 0.00	0.86 ± 1.50	3.90 ± 3.85
0.015	10.0 ± 0.00	26.66 ± 2.88	23.73 ± 2.48	12.11 ± 0.49	3.90 ± 3.85
0.03	70.0 ± 0.00	45.83 ± 3.81	42.22 ± 0.00	10.43 ± 2.63	37.25 ± 3.50
0.06	100 ± 0.00	51.66 ± 2.88	45.86 ± 1.27	31.30 ± 0.53	46.65 ± 1.18
0.12	100 ± 0.00	78.33 ± 5.87	68.06 ± 1.27	67.87 ± 7.60	100 ± 0.00
0.25	100 ± 0.00	100 ± 0.00	79.26 ± 1.27	86.84 ± 0.00	100 ± 0.00
0.50	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
0.75	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
1.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00

Simbología: An, *Aspergillus niger*; TM, *Trichophyton mentagrophytes*; Fs, *Fusarium sporotrichum*; Fm, *Fusarium moniliforme* y Rs, *Rhizoctonia solani*.



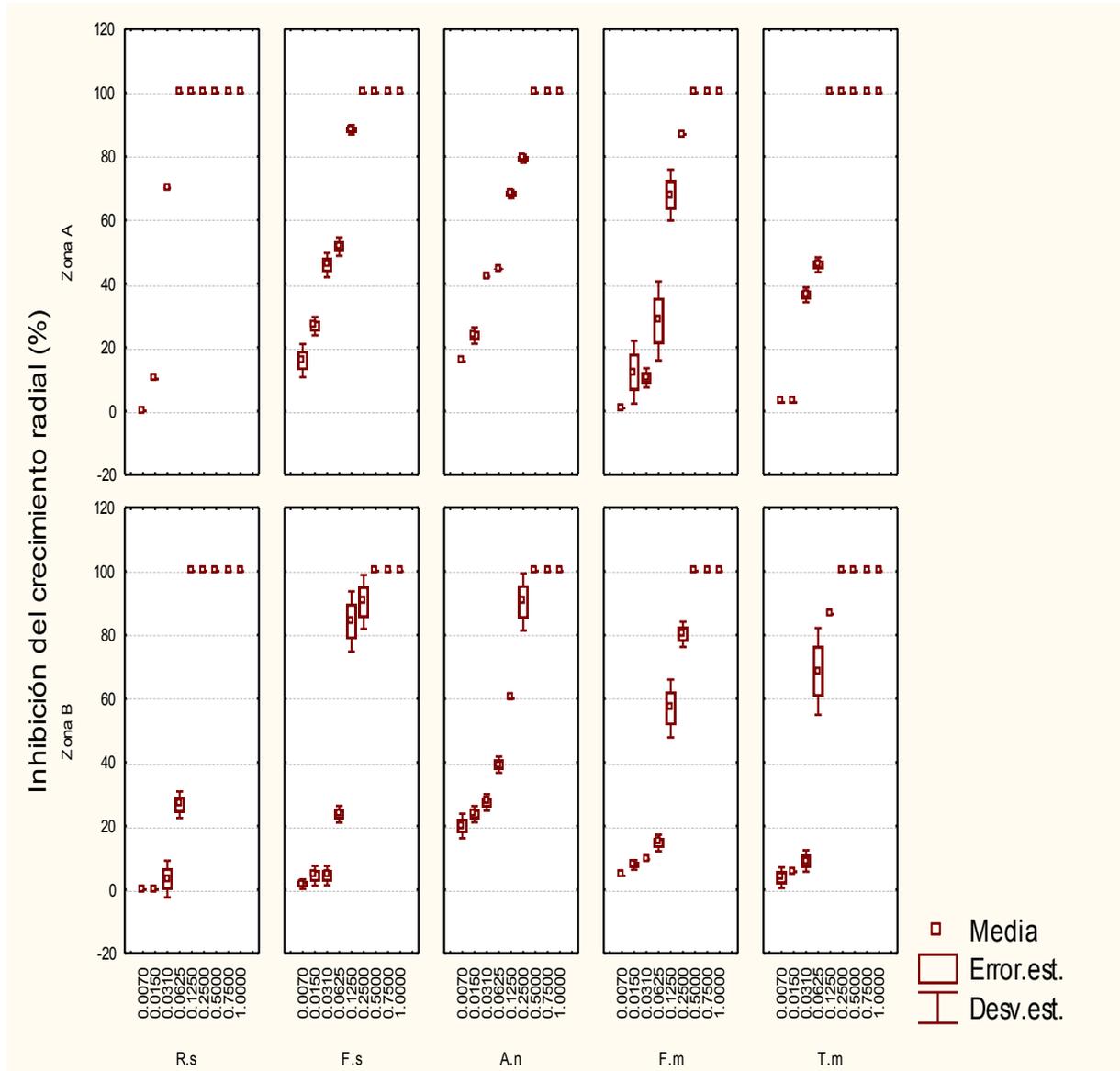
**Cuadro 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *L. graveolens* de la zona B.**

Concentración mg/ml	Hongos % (Zona B)				
	Rs	Fs	An	Fm	Tm
0.007	0.00 ± 0.00	0.85 ± 1.47	20.03 ± 3.86	4.30 ± 2.76	4.46 ± 3.86
0.015	0.00 ± 0.00	5.02 ± 6.60	23.7 ± 2.59	7.63 ± 4.21	6.7 ± 0.00
0.03	3.33 ± 5.77	6.74 ± 5.19	27.4 ± 2.59	9.43 ± 2.65	10.0 ± 3.30
0.06	30.0 ± 2.00	25.65 ± 0.65	39.26 ± 2.54	14.6 ± 3.65	68.9 ± 13.50
0.12	100 ± 0.00	84.56 ± 9.20	60 ± 0.00	56.73 ± 10.12	86.7 ± 0.00
0.25	100 ± 0.00	90.59 ± 8.24	90.36 ± 8.99	80.08 ± 4.46	100 ± 0.00
0.50	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
0.75	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
1.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00

Simbología: An, *Aspergillus niger*; TM, *Trichophyton mentagrophytes*; Fs, *Fusarium sporotrichum*; Fm, *Fusarium moniliforme* y Rs, *Rhizoctonia solani*.

Como se puede observar en los cuadros 4, 5 y figura 12 el aceite esencial de ambas zonas, tuvo actividad en todas las cepas de hongos, alcanzando el 100% de inhibición.

*R. solani* y *T. mentagrophytes* fueron las cepas más sensibles ya que alcanzaron el 100% de inhibición a menores concentraciones (0.12 y 0.25 mg/ml, respectivamente).



**Figura 12. Inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *L. graveolens* en ambas zonas.**

Simbología: An, *Aspergillus niger*; TM, *Trichophyton mentagrophytes*; Fs, *Fusarium sporotrichum*; Fm, *Fusarium moniliforme* y Rs, *Rhizoctonia solani*.

A los resultados de los porcentajes de inhibición, se les aplicó un análisis de varianza de tres factores; encontrando diferencias significativas entre las cepas de hongos ( $F=104.08$ ;  $P<0.001$ ), entre concentraciones ( $F=4041.88$ ;  $P<0.001$ ) y entre zonas ( $F=304.0$ ;  $P<0.001$ ).



Hongos	Ketoconazol ( $\mu\text{g/ml}$ )		Aceite esencial ( $\text{mg/ml}$ )			
	CF <sub>50</sub>	CFM	Zona A		Zona B	
			CF <sub>50</sub>	CFM	CF <sub>50</sub>	CFM
<b>Rs</b>	0.255	7.00	0.030	0.06	0.076	0.12
<b>Fs</b>	0.094	3.50	0.039	0.25	0.084	0.50
<b>An</b>	415.1	2688	0.053	0.50	0.058	0.50
<b>Fm</b>	0.240	28.00	0.088	0.50	0.099	0.50
<b>Tm</b>	0.109	0.88	0.056	0.12	0.061	0.25

**Cuadro 6. CF<sub>50</sub> y CFM del aceite esencial de *L. graveolens*.**

Simbología: An, *Aspergillus niger*; TM, *Trichophyton mentagrophytes*; Fs, *Fusarium sporotrichum*; Fm, *Fusarium moniliforme* y Rs, *Rhizoctonia solani*.

Los resultados obtenidos en la determinación de la CF<sub>50</sub> y CFM de las zonas A y B se muestran en el cuadro 6.

Como se puede observar, *R. solani* y *F. sporotrichum* (CF<sub>50</sub>: 0.030 y 0.039 mg/ml, respectivamente) fueron las cepas más sensibles al efecto del aceite esencial de la zona A, en tanto que *A. niger* y *T. mentagrophytes* (CF<sub>50</sub>: 0.058 y 0.061 mg/ml, respectivamente) lo fueron al aceite esencial de la zona B.

*F. moniliforme* fue la cepa más resistente en las dos zonas, requiriendo concentraciones de 0.088 mg/ml en la zona A y 0.097 mg/ml en la B para inhibir su crecimiento al 50%.



---

## DISCUSION

### **Rendimientos.**

El aceite esencial de *L. graveolens* colectada en la zona A obtuvo un rendimiento de 2.26 g con una densidad de 0.93 g/ml. Esta zona presenta suelos con textura fina (arcilla) (Oliveros, 2000), los cuales son afectados por la erosión, aunado a ello las altas temperaturas y la escasez del agua, provocan que la planta se encuentre con cierto estrés, dando pie a que las plantas produzcan sustancias (aceites esenciales) como una ventaja para responder a los estímulos del entorno (Harborne, 1988). Se sabe que las plantas que presentan estrés hídrico, producen y/o aumentan la concentración de algunos monoterpenos con acción alelopática con el fin de inhibir la germinación y retardar el crecimiento de las plantas vecinas; de esta manera aprovechan la poca agua presente en el suelo (Romo de Vivar, 1985).

El estado de madurez del material vegetal colectado en esta zona era joven probablemente siendo esta una característica que favoreció el rendimiento, ya que se sabe que el estado fenólico de la planta es fundamental en la composición y concentración de los aceites esenciales (González *et al*; 1999).

En la zona B se obtuvo un rendimiento de 1.83 g con una densidad de 0.90 g/ml, siendo menor que el producto de la zona A, lo cual podría deberse a la escasez de agua y a la presencia escasa de nutrientes en el suelo, provocando que las plantas produzcan aceites esenciales, ya sea en composición o concentración para responder a las condiciones ambientales. Por otro lado, la textura arenosa de del terreno da pie a la presencia de nemátodos (Alanis, 1998), los cuales podrían estar afectando las raíces de las plantas, siendo un factor más en la producción de los aceites esenciales. Se sabe que los metabolitos secundarios, provienen de todo un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa frente a los ataques de



microorganismos, insectos y otros animales (Cowan, 1999; Domingo y López-Brea, 2003; Vivas y Miranda, 2004)

### **Composición de aceites esenciales.**

En el aceite esencial de *L. graveolens* de la zona A (Terrazas del jardín botánico) se detectaron seis compuestos, mientras que en la zona B (Terrazas las granjas) solo se encontraron cinco (Cuadro 1), de los cuales más del 95% correspondió a monoterpenos y el resto a sesquiterpenos. Los compuestos timol (61.64 y 70.52%) y *m*-cimeno (20.30 y 17.85%) fueron los principales componentes del aceite esencial de ambas zonas, lo cual concuerda con lo mencionado por González *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2001; Bassole *et al.*, 2003 y Arcina-Lozano, 2004, quienes reportan al timol como uno de los compuestos mayoritarios dentro del patrón de composición de los aceites esenciales del género *Lippia*, así como de varias de sus especies.

En este trabajo no se encontró como componente mayoritario el carvacrol, a diferencia por lo reportado por Hernández (2004); esto podría deberse a que la época de colecta fue diferente y con lo cual se indicaría que probablemente la variación estacional afecta la composición y concentración del aceite esencial de *L. graveolens*. Se sabe por algunos reportes, que la época de colecta y/o cosecha son factores de gran importancia que influyen en la composición y cantidad de metabolitos secundarios (Bruneton, 1991; Arcina-Lozano *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha reportado que el aceite del Orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de timol y carvacrol, sin embargo se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca un decremento en el contenido de carvacrol (Ruso *et al.*; 1998 citado por Arcina-Lozano *et al.*, 2004).

En cuanto al resto de los compuestos del aceite esencial de *L. graveolens* se observó que el humuleno y el 1, hidroxil, 2-terbutil-4-metil-benceno, solo fueron encontrados en la zona A, por lo que probablemente estos hayan sido



sintetizados por la planta en respuesta a un estrés abiótico, ya que dicha zona esta sujeta a altas temperaturas, a la erosión y a la falta de nutrientes, así como a un estrés hídrico, por lo tanto, probablemente la planta elevó la proporción de su material metabólico, en el cual se encontraran compuestos con funciones protectoras (Harborne, 1988).

La erosión eólica a la que está expuesta la zona A, no sólo afecta al suelo sino también pudiera estar afectando a las plantas, ya que las raíces de estas tal vez quedan más expuestas a la superficie y por tanto las deja en una posición vulnerable ante los depredadores como los herbívoros (Arceo *et al.*, 2004), siendo este un factor más, que determinó que el aceite esencial del orégano de esta zona presentara un mayor número de compuestos, además de las pequeñas diferencias en cuanto a la concentración de la mayoría de estos.

Por su parte, el 1,8-cineol sólo se presentó en la zona B. Este compuesto, probablemente pudo haber sido sintetizado por varias razones: la primera, es que las plantas pueden estar propensas a estrés por el ataque de microorganismos y herbívoros, ya que se sabe que el cineol presenta una potente actividad antimicrobiana e insecticida (Pratesa *et al.*, 2003), esta última contra el barrenador de cereales *Rhizopertha dominica* y el escarabajo rojo fosforescente *Tribolium castaneum* (Pratesa *et al.*, 2003). La segunda, pudo deberse a que sirve para llevar a cabo el proceso de la polinización ya que se tienen reportes de que atrae organismos que contribuyen a este proceso (Harborne, 1988), la tercera es que sirven de señal en los cambios de diferenciación en el desarrollo de las flores (Mevy *et al.*, 2006). Lo cual podría explicar que en esta zona, se encontrara un porcentaje de este compuesto, ya que la colecta fue después de la temporada de lluvias, que aunado a las condiciones del lugar pudieron ser factor del principio de floración de la planta colectada. Finalmente, se ha reportado que en las zonas áridas y semiáridas, la falta de agua pone en estrés hídrico a las plantas provocando que estas liberen sustancias químicas que inhiban la germinación, crecimiento y desarrollo de



otras plantas, tal es el caso del 1,8-cineol (Romo de Vivar, 1985; Harborne, 1988).

### **Actividad antibacteriana.**

El aceite esencial de *L. graveolens* de ambas zonas presentó actividad frente a todas las cepas desafiadas (Gram positivas y Gram negativas), nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Hernández (2004), quién evaluó el aceite esencial de *L. graveolens* contra las mismas bacterias encontrando actividad antibacteriana en todas las cepas. Del mismo modo, Bassole *et al.*, (2003) encontraron que el aceite esencial de *L. chevalieri* y *L. multiflora* tienen actividad antibacteriana y el compuesto mayoritario fue el timol, al igual que en el aceite esencial de *L. graveolens*. Por otro lado, Garzilazo (2003) encontró actividad en el aceite esencial de *Lantana achyranthifolia* (Verbenaceae) contra las mismas bacterias. Los compuestos isocariofileno y 1,8-cineol fueron parte de los principales componentes.

El mecanismo de acción del timol consiste en que este compuesto atraviesa la pared bacteriana, interactuando con las enzimas periplasmáticas y después de penetrar en el interior rico en lípidos de la membrana citoplasmática, interactúa con las proteínas de la membrana y causa recontrafujo de protones a través de la membrana afectando el metabolismo energético de la bacteria, el efecto del timol en la membrana es irreversible ya que una vez que actúa, su efecto es definitivo (Juven *et al.*, 1994). Esto podría explicar que los aceites esenciales hayan mostrado un espectro de actividad muy amplio, ya que inhibieron el crecimiento de las trece cepas bacterianas.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens* se presentó tanto en bacterias Gram positivas ( $\bar{X}$  A=28.25;  $\bar{X}$  B=27.33) como en bacterias Gram negativas ( $\bar{X}$  A=31.07;  $\bar{X}$  B=29.33), estas últimas mostraron los mayores halos de inhibición, sobre todo las cuatro cepas de *Vibrio cholerae* para ambas zonas, lo cual concuerda con lo reportado por Hernández (2004).



El análisis estadístico mostró que las cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, no presentaron diferencias significativas, lo cual podría deberse a que los aceites esenciales de ambas zonas probablemente actúan a nivel de membrana, de tal forma que sensibilizan la bicapa de fosfolípidos de esta, causando así un incremento en la permeabilidad ocasionando la pérdida de constituyentes celulares o la destrucción e inactivación del material genético (Kim *et al.*, 1995)

Por otro lado, *Y. enterocolitica* mostró una mayor sensibilidad en la zona A, mientras que *S. lutea* lo fue para ambas zonas. Esto quiere decir que la actividad del aceite esencial depende de la especie de bacteria en particular.

La CMI y CBM, revelaron que las bacterias Gram negativas fueron las más sensibles, sobre todo las cuatro cepas de *Vibrio cholerae* ya que requirieron de concentraciones de 0.125mg/ml de aceite esencial para inhibir su crecimiento. Dentro de estas, *V. cholerae* No.01 fue la más sensible ya que requiere de una concentración más baja (0.06mg/ml) para inhibir su crecimiento, lo anterior podría deberse a que los compuestos activos como el timol, actúan de manera definitiva al interactuar con la membrana bacteriana (Juven *et al.*, 1994).

El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre las zonas ( $F=26.039$ ;  $P<0.001$ ) y las cepas bacterianas ( $F=59.825$ ;  $P<0.001$ ), lo cual, probablemente se deba a que los compuestos y sus concentraciones dentro del aceite esencial de cada una de las zonas varió por las condiciones ambientales del lugar, por otro lado el aceite esencial actúa de forma diferente en cada una de las cepas bacterianas.

Finalmente, el efecto del aceite esencial en la sobrevivencia de la población de *S. lutea* y *V. cholerae* c.c. (Figuras 8-11), se apreciaron cambios significativos en el número de sobrevivientes desde la primera hora, sin embargo la muerte celular de ambas cepas fue diferente.



En la curva de sobrevivencia de *S. lutea* en la zona A la muerte celular fue a las 8 horas mientras que en la zona B fue a las 12 horas. Esto quizá se debió a que en el aceite de la zona A se encontraron más componentes cuya concentración, a excepción del timol, fueron mayores que en la zona B, y posiblemente se haya presentando sinergismo, lo que ayudo a que el efecto del aceite sobre la cepa de *S. lutea* en la zona A fuera más rápido.

En *V. cholerae* c.c. la muerte se apreció a las 5 horas en ambas zonas, posiblemente esto se deba a que los aceites esenciales de *L. graveolens* de ambas zonas afectaron en mayor proporción sus diferentes procesos enzimáticos ya sea afectando la integridad de la capa de fosfolípidos de la membrana celular o aumentando la permeabilidad provocando la pérdida de constituyentes celulares (Kim *et al.*, 1995).

### **Actividad antifúngica.**

El aceite esencial de *Lippia graveolens* de ambas zonas presentó actividad antifúngica en las cinco cepas desafiadas, inhibiendo el crecimiento radial hasta del 100% a concentraciones de 0.06-0.5 mg/ml, lo cual concuerda por lo reportado por Lemos (1990) y Valentin *et al.*, 1995 citados por Pascual *et al.*, 2001, quienes han reportado que los aceites de *L. multiflora* Moldenke, *L. palemeri* S. Wats y *L. sidoides* presentan actividad antifúngica. *L. javanica* es utilizada para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos (Viljoen *et al.*, 2004).

En la actividad antifúngica se encontraron diferencias significativas entre las zonas ( $F=304.0$ ;  $P<0.001$ ), lo cual se reflejó en los resultados, ya que el aceite esencial de la zona A presentó mayor actividad requiriendo de concentraciones más bajas para inhibir el crecimiento de las cepas fúngicas, quizás esto se deba a que algunos de los compuestos inducen alteraciones en la permeabilidad celular por inserción entre las cadenas de acil graso de los fosfolípidos de las membranas, lo que provoca un incremento en la



---

permeabilidad y la fluidez de las mismas. Los grados de variación en fluidez corresponden a la posición de los terpenos dentro de la bicapa lípidica, la cual depende de la hidrofobicidad del compuesto (Hammer *et al.*, 2004; Carson *et al.*, 2006 citados por Serrano, 2006).

Probablemente el mecanismo de acción de los aceites esenciales en los hongos, se deba a que actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol que es un triterpeno presente en la membrana fúngica, interrumpiendo de esta manera la formación de la membrana (Ricci *et al.*, 2003).

Por otro lado, se conoce que en los grandes cultivos de orégano Chihuahua, Durango, Sonora y Oaxaca) perteneciente al género *Lippia* suelen ser susceptible a especies de *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, siendo esta última la más observada; presentando pudrición de tallo y raíz (Alanis, 1998). Lo anterior, podría explicar que en la zona A las cepas más sensibles de esta zona fueron *R. solani* y *F. sporotrichum*, por lo que probablemente el aceite funcione en el medio ambiente como un mecanismo de defensa contra este tipo de hongos.

Como punto final, se recalca el argumento anteriormente mencionado: las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Lippia graveolens* es producto de la combinación de las condiciones ambientales del Valle de Zapotitlán Salinas así como de las diferentes interacciones ecológicas que involucra microorganismos, siendo este el principal aporte del presente trabajo.



---

## CONCLUSIONES

- Existe variación en la composición y concentración del aceite esencial de *Lippia graveolens* de las dos zonas estudiadas.
- De los aceites esenciales se identificaron seis compuestos para la zona A y cinco para la B, de los cuales más del 95% corresponden a monoterpenos, en ambas zonas.
- Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de *L. graveolens* fueron timol y *m*-cimeno tanto en la zona A como en la zona B.
- Las bacterias Gram positivas y Gram negativas fueron sensibles al aceite esencial de *Lippia graveolens*, encontrándose diferencias significativas entre las zonas y las cepas bacterianas.
- El aceite esencial de *L. graveolens* mostró actividad antifúngica en las cinco cepas de hongos, mostrando diferencias significativas entre las zonas y las cepas de hongos.
- El presente trabajo confirma que las diferencias ambientales existentes en ambas zonas de Zapotitlán Salinas afectan tanto en la composición como en la concentración de los componentes del aceite esencial de *L. graveolens*; teniendo consecuencias en la actividad antimicrobiana.



---

## PERSPECTIVAS

- Hacer una comparación de la composición química de los aceites esenciales en diferentes partes de la planta (raíz, tallo, hojas, flores), para verificar si en alguno existe en mayor proporción.
- Realizar estudios ecológicos (Factores bióticos y abióticos).
- Realizar un estudio de toxicidad para demostrar si existe repercusión en el humano por el consumo de *L. graveolens*.
- Realizar estudios sobre el posible uso del aceite como control biológico ante fitopatógenos.
- Estudiar la factibilidad del uso de la especie en una escala comercial.



## Apéndice I

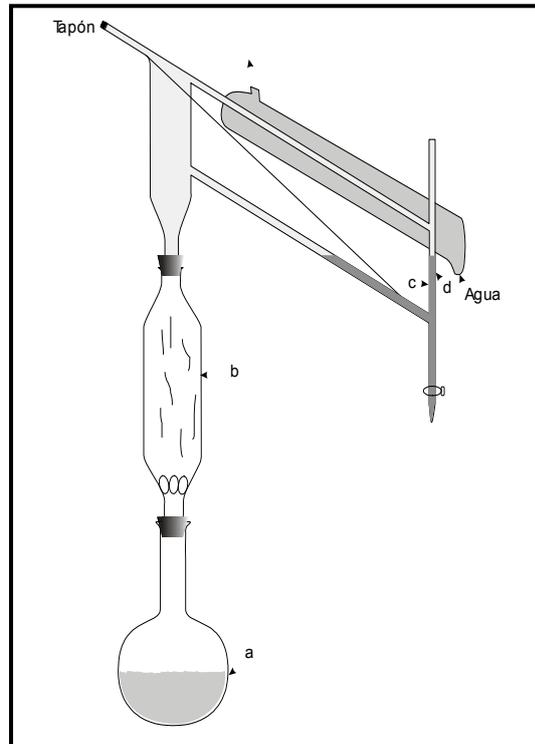
### Extracción por arrastre de vapor de aceites esenciales.

(Domínguez, 1973)

Los aceites esenciales se obtuvieron por la técnica de destilación por arrastre de vapor a partir de material fresco; en este método se utiliza la característica que poseen las esencias de presentar bajas presiones de vapor y por tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. El aparato que se utiliza se muestra en la siguiente figura.

#### Destilador por arrastre de vapor

- a) matraz balón,
- b) alargadera o columna de vidrio,
- c) colector,
- e) refrigerante



Empleando este aparato se pueden destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500g de planta fresca, con un buen rendimiento. En los casos que el rendimiento sea bajo se puede colocar en “d” un poco de éter etílico para obtener los aceites y el destilado. Se colectan los aceites, se refrigera a 0°C por 24 hrs. para separar el éter de la mezcla.



## Apéndice II

### Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.

(Van der Berghe y Vlietnick, 1991).

El método a seguir fue:

**Medio.** Se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Mueller-Hinton, debido a que promueve el desarrollo de la mayoría de aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es recomendable que el agar tenga un espesor uniforme en la placa de 4mm, ya que si este es más fino, el antibiótico tiende a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; y por lo contrario si un agar de más de 4mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

**Inóculo.** Con un asa de siembra estéril se tocaron las superficies conexas de 4 ó 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, etc.). Se sumergió el asa en 10 ml de caldo Mueller-Hinton, se enjuagó bien el líquido para descargar todo el material y luego se retiró el asa de siembra. Se incubó el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio fue equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias /ml.

El estándar 0.5 de MacFarland se preparó añadiendo 0.5 ml de cloruro de bario a 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se pudo efectuar observándolos contra una cartulina blanca, o por medio de un espectrofotómetro a 600 nm.



Si la suspensión de organismos se ve más turbia que el estándar, se le agrega solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Posteriormente se sumerge un segundo hisopo estéril y seco en suspensión bacteriana, antes de retirarlos se elimina el exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se sembró por estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Para realizar la prueba de susceptibilidad, los sensidiscos impregnados con el aceite esencial de cada una de las zonas se colocaron en la superficie del agar, utilizando una pinza estéril: los sensidiscos fueron colocados por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa. Los sensidiscos se presionaron suavemente con la punta de la pinza, tratando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se colocó la concentración de aceite esencial a evaluar (5 µl).

**Control positivo.** Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con un antibiótico sintético (cloramfenicol – 25 µg).

**Incubación.** Ya que las placas con agar estuvieron preparadas para la prueba de susceptibilidad, se colocaron en una incubadora a 35 °C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Esto es importante ya que el CO<sub>2</sub> puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso en el pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual puede provocar una estrechez en la inhibición. Así como también la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones en las zonas de inhibición.

**Interpretación de resultados.** Las zonas de inhibición se midieron con una regla calibrada en mm. En todos los casos, la prueba se realizó por triplicado y los valores promedio se reportaron en mm.



## Apéndice III

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

#### Método modificado en macro dilución en agar.

(Koneman, 1985).

#### 1. Preparación de reactivos y diluciones.

La solución antimicrobiana de trabajo se preparó diluyendo el aceite en el agar Mueller-Hinton a la concentración deseada. La prueba se realizó en cajas de petri. Las concentraciones fueron: 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml. En cada caja se colocaron 3ml de agar con la concentración de aceite correspondiente, cada bioensayo se realizó por triplicado con un control positivo y uno negativo.

#### 2. Inoculación e incubación de los tubos.

Se preparó un inóculo que contenía  $10^5$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml). Se agregó a cada caja 0.1 ml del inóculo. Las cajas se incubaron a 35 °C durante 16 a 20 horas.

#### 3. Interpretación de resultados.

La menor concentración del antimicrobiano que produce una inhibición del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), mientras que en donde el desarrollo del microorganismo disminuye drásticamente y donde no crece es la Concentración Bactericida Mínima (CBM).



## Apéndice IV

### Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento)

(Kubo, 1993; Shoenknecht *et al.*, 1987, citado en Ávila, 1996)

1. Se preparó y rotuló por lo menos un tubo con el aceite esencial problema, para muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de media hora durante los 4 primeros tiempos, después durante dos horas, durante 4 horas y finalmente a las 24 horas.
2. Se preparó y rotuló un tubo sin antídoto que sirvió como control del desarrollo.
3. Se preparó el inóculo, con aproximadamente  $1 \times 10^6$  bacterias/ml en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo Mueller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un período de 12-18 horas de incubación).
4. Se inoculó con ayuda de una micropipeta 0.1ml de la suspensión de bacterias en los tubos que contenían el aceite esencial (este estuvo a una concentración bactericida mínima) y sus múltiplos medios; esto es, la mitad de CMI, la CMI y CBM. La concentración final fue de aproximadamente de  $1 \times 10^6$  bacterias/ml de caldo en cada tubo. Se incubó en una estufa sin presión de  $\text{CO}_2$ .
5. Se muestreó cada media hora, después cada dos horas, posteriormente cada cuatro horas y finalmente hasta las 24 horas. La duración del experimento es de 24 a 36 horas.
6. Se graficó el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las "Y" contra el tiempo de incubación en el eje de las "X", para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la bacteria, se prolongó la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis y Dulbecco, 1996).



---

## **Apéndice V**

### **Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos.**

(Wang y Bun, 2002).

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas petri, que contenían 20 ml de agar Czapek, en el cual se inoculó con 1 mm<sup>2</sup> de micelio del hongo a ensayar. Después que el inóculo se desarrolló se colocaron los sensidiscos impregnados con 5 µl del aceite esencial a una distancia de 5 mm del límite micelial.

#### **Incubación**

Las placas fueron incubadas a 23° C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se había desarrollado.

#### **Control positivo**

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de Ketoconazol de 56 µg/disco.

#### **Interpretación de resultados**

En los casos en que existieron zonas de inhibición el aceite esencial se reportó como activo, en todos los casos esta prueba se realizó por triplicado.



---

## Apéndice VI

### Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos

(Wang y Bun, 2002).

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas petri (60 x 15 mm), que contenían 6 ml de agar Czapek, con las siguientes concentraciones de aceite: 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml, posteriormente se inoculó con 1 mm<sup>2</sup> de micelio del hongo a ensayar.

#### Incubación

Las placas fueron incubadas a 23° C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se había desarrollado.

#### Control positivo

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de ketoconazol a las siguientes concentraciones: 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 14.00, 28.00 µg/ml.

#### Interpretación de resultados

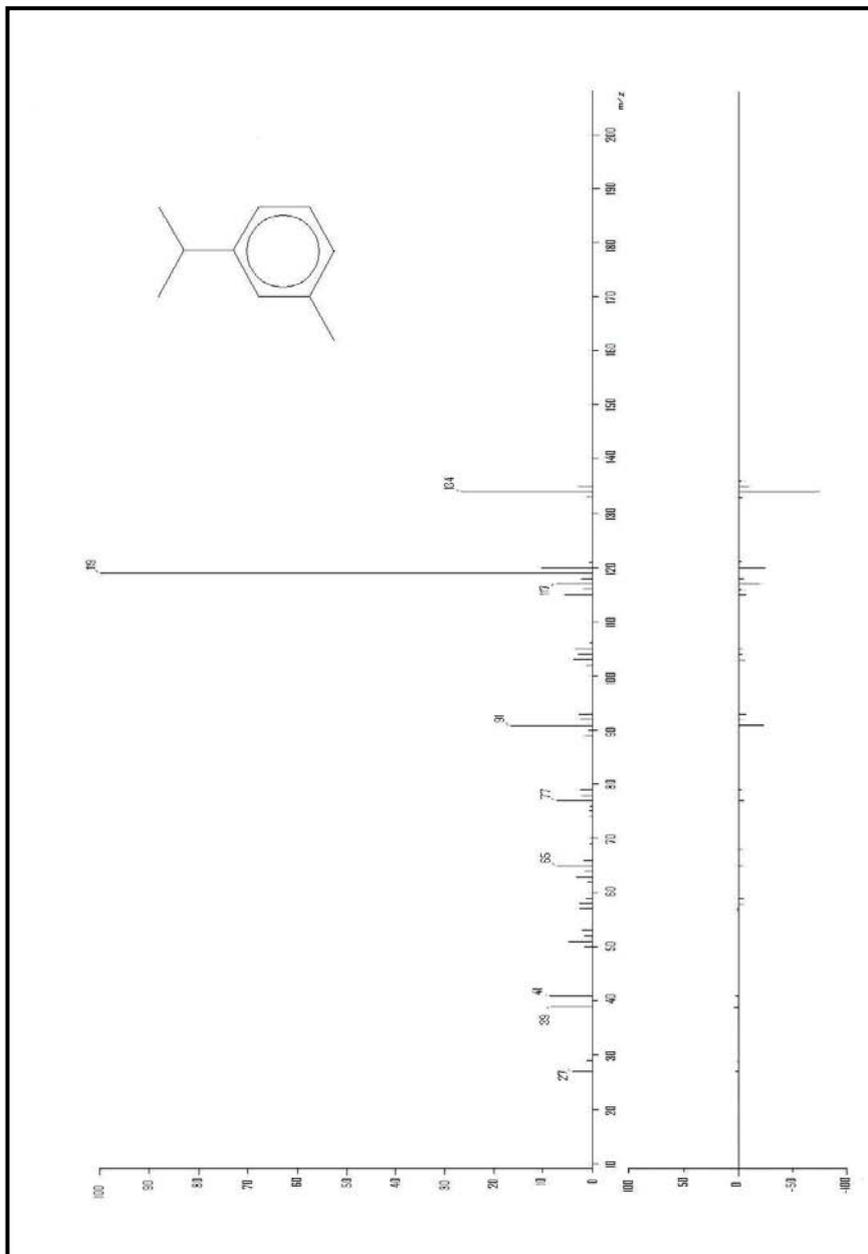
Con una regla se midió el crecimiento del hongo para calcular el porcentaje de crecimiento, posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición. En todos los casos esta se prueba se realizó por triplicado.

## APENDICE VII

### Espectros de masas del aceite esencial de *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano).

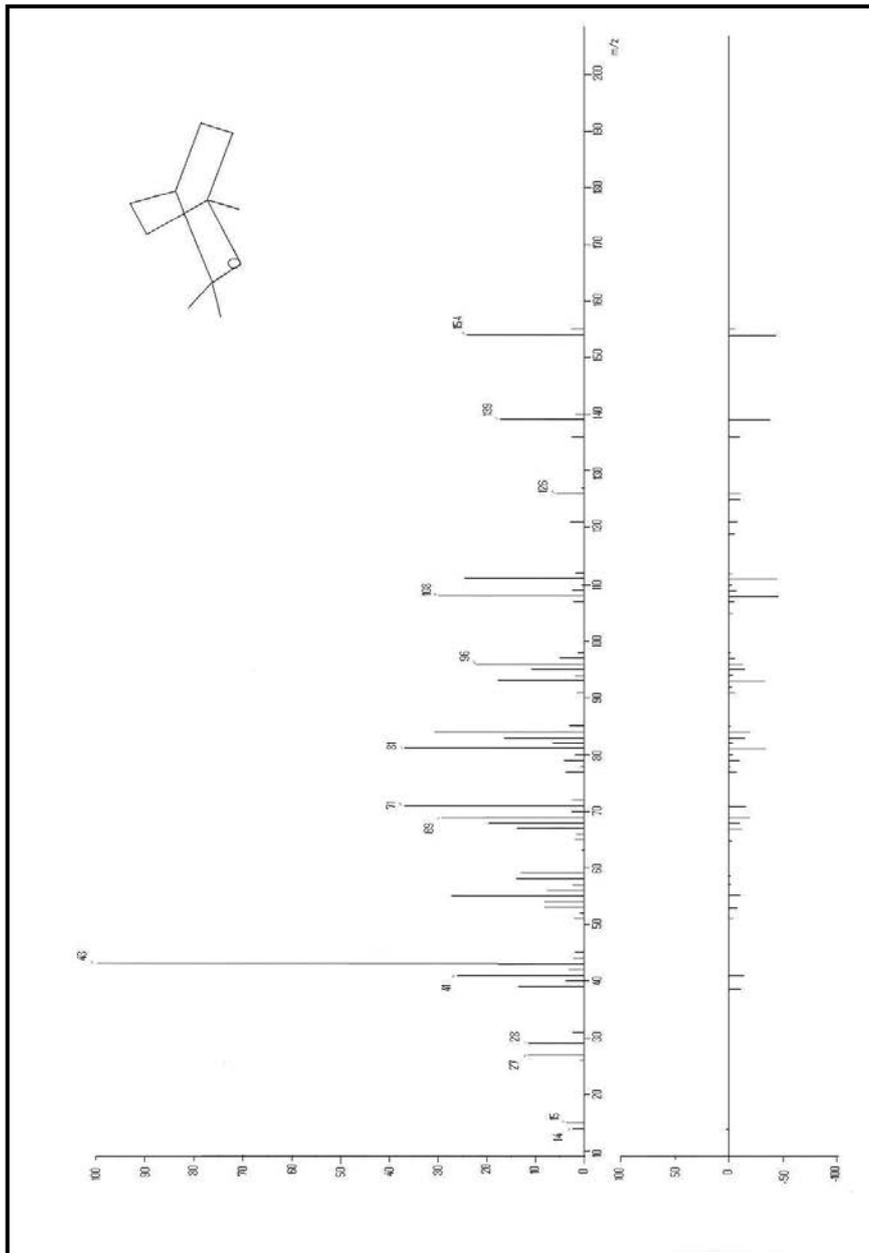
#### Espectro 1: *m*-cimeno (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>)

PM=134 TR (zona A) = 5.43 TR (zona B) = 5.55 20.30% (zona A)  
17.85% (zona B)



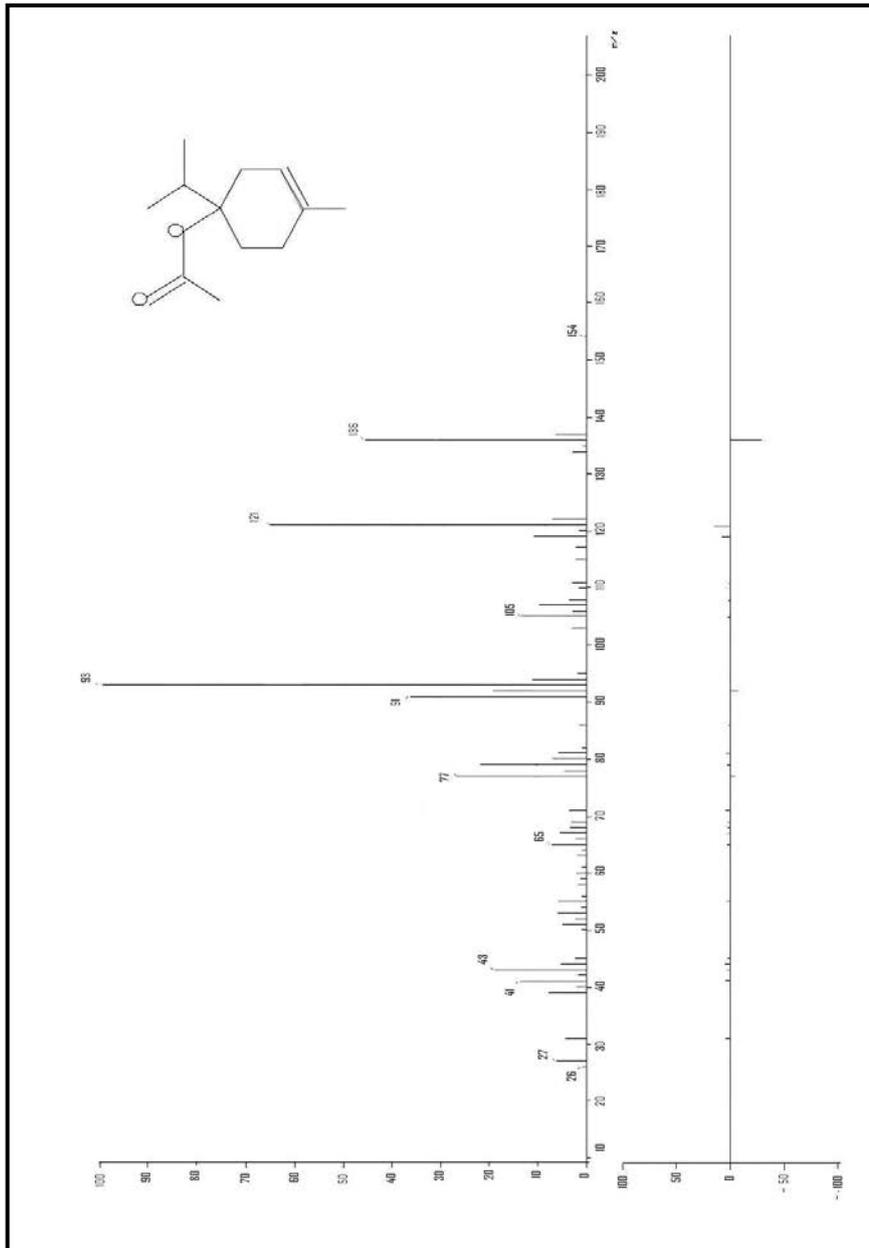
**Espectro 2:** 1,8-cineol ( $C_{10}H_{18}O$ )

PM=154    TR (zona B) = 5.65    0.65% (zona B)



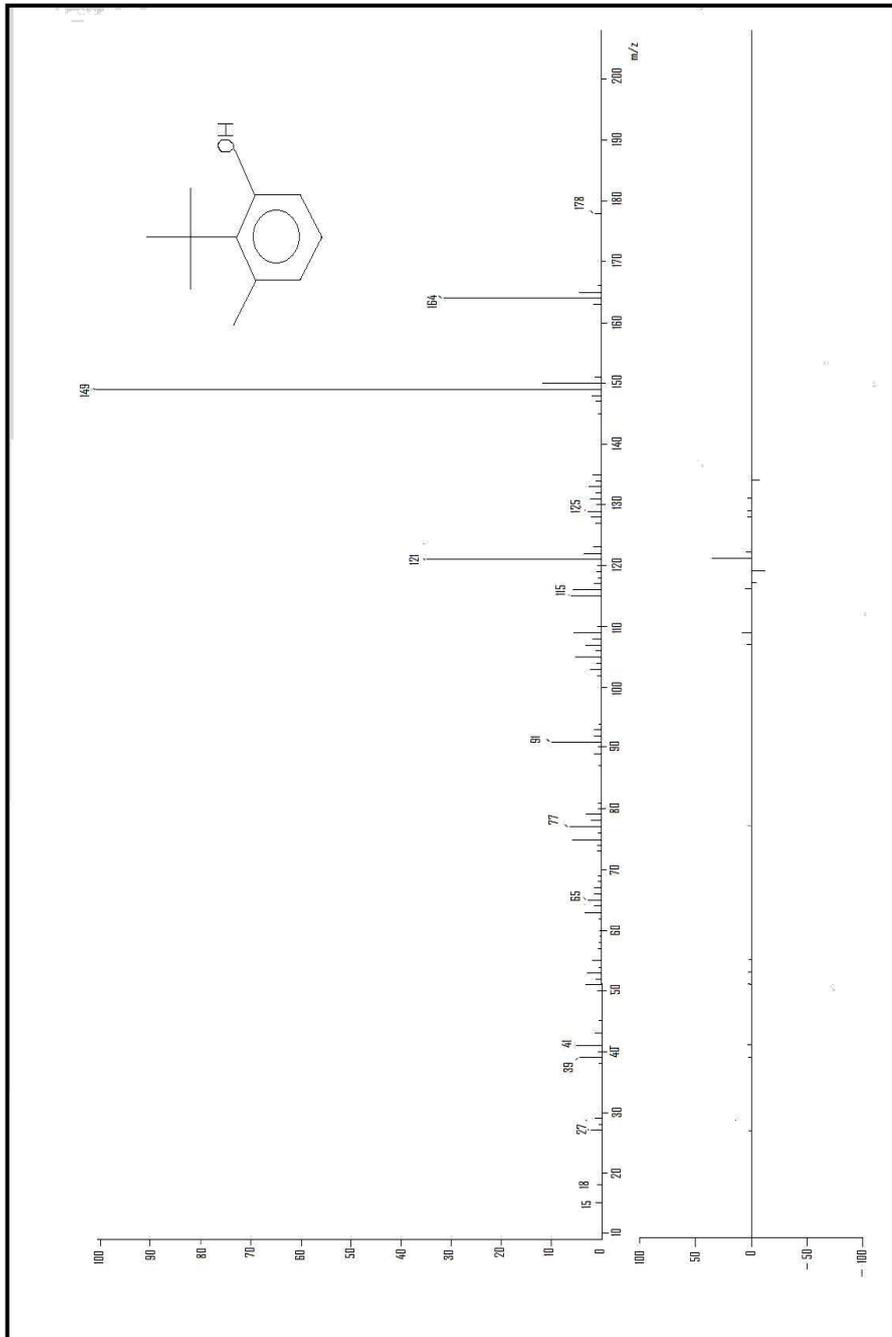
**Espectro 3:** Acetato de terpineno ( $C_{12}H_{20}O_2$ )

PM=196 TR (zona A) = 5.91 TR (zona B) = 6.04 10.82% (zona A)  
9.21% (zona B)



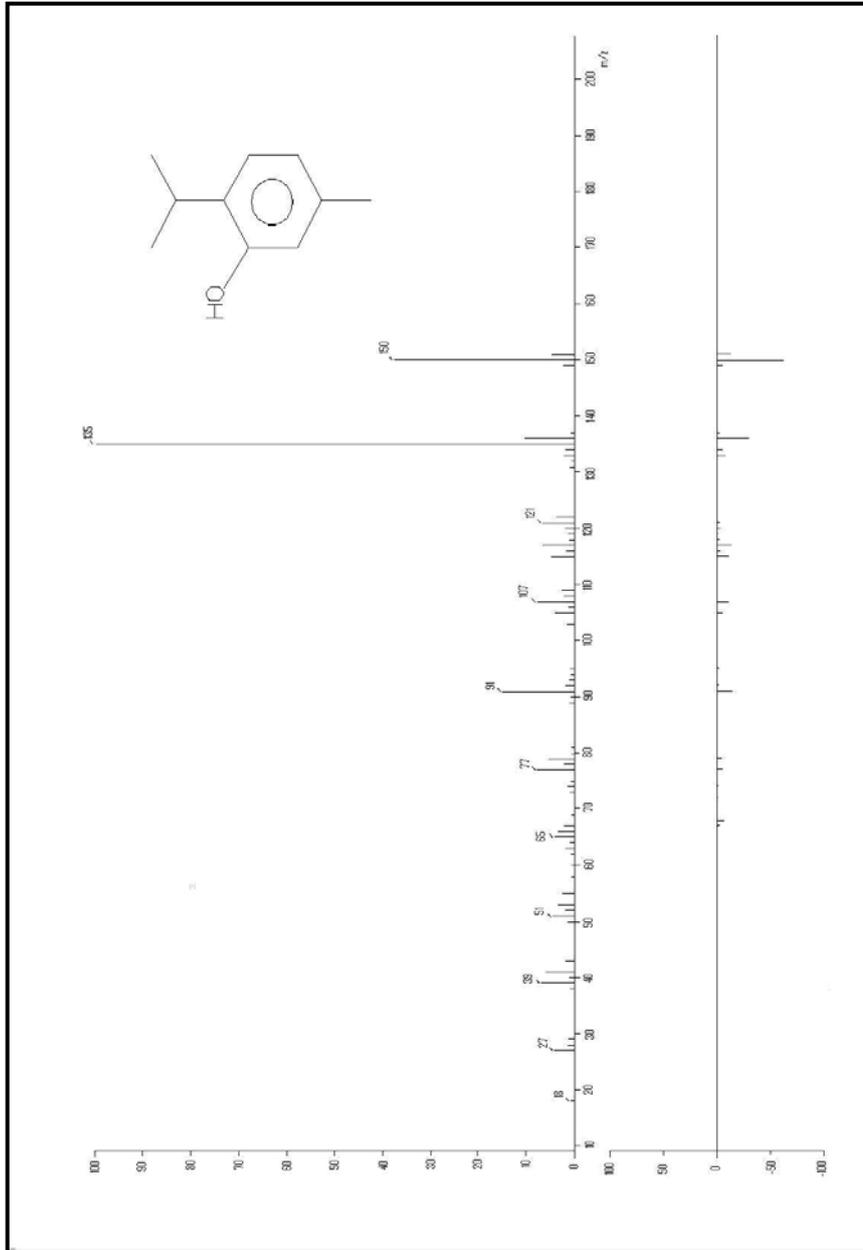
**Espectro 4:** 1, hidroxi, 2 terbutil 4 metil benceno ( $C_{11}H_{16}O$ )

PM=184 TR (zona A) = 8.27 4.24% (zona A)



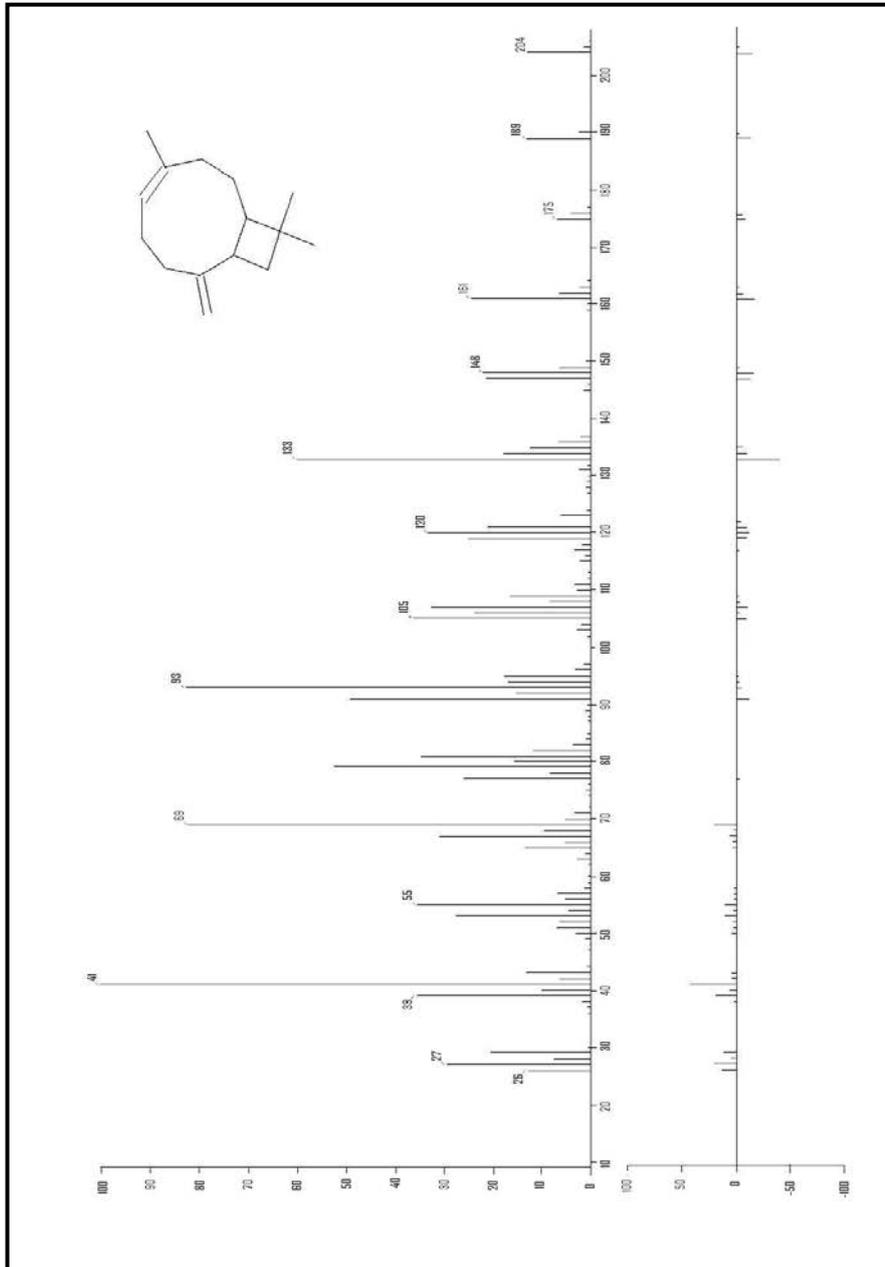
**Espectro 5:** Timol ( $C_{10}H_{14}O$ )

PM = 150    TR (zona A) = 9.90    TR (zona B) = 9.93    61.64% (zona A)  
70.52% (zona B)



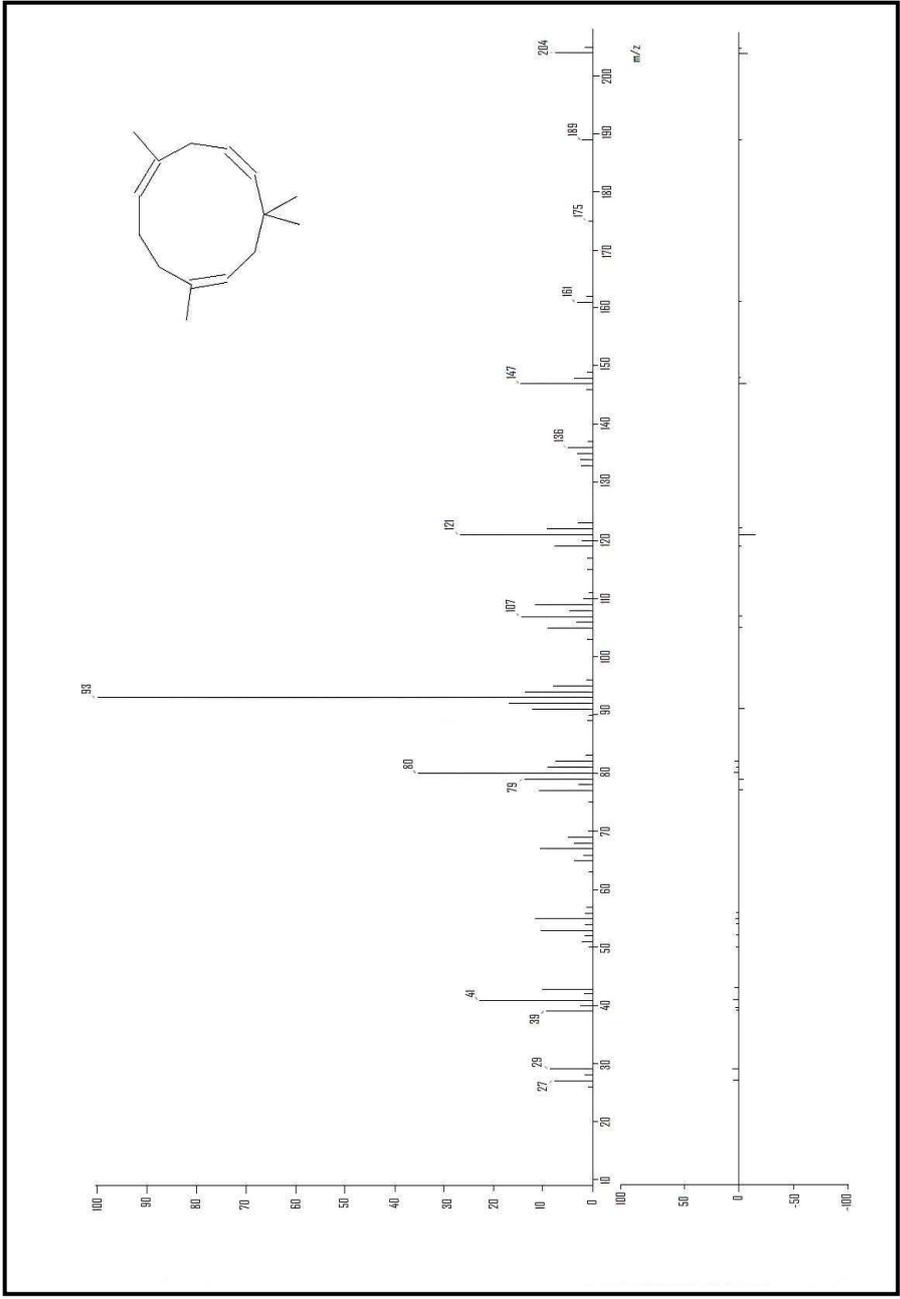
**Espectro 6:** Isocariofileno (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>)

PM=204    TR (zona A) = 11.05    TR (zona B) = 11.16    2.09% (zona A)  
1.77% (zona B)



**Espectro 7: Humuleno (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>)**

PM=204 TR (zona A) = 11.44 0.91 % (zona A)





---

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacques, P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México. pp. 253.
- Alanis, G. L. 1998. Contribución al estudio de la calidad del aceite esencial en orégano *Lippia graveolens* H.B.K Tesis profesional de Licenciatura. Unidad Regional Unidad de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. Durango.
- Arceo, A. J. M., Hernández, S. J. L. y Vivas, E. I. E. 2004. Apuntes de agronomía. Compilación de agronomía 1. Editorial Universidad Autónoma Chapingo-Departamento de preparatoria agrícola. México. pp. 190.
- Arcina-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S. y González, E. M. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 54: 1-20
- Agrios, G. W. 1988. Plant pathology. 3 ed. New York, Academic Press. pp.803.
- Argueta, V. A., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I, II y III. Instituto Nacional Indigenista. México.
- Arizio, O. y Curioni, A. 2003. Productos aromáticos y medicinales (Doc.A-6). Estudio 1.EG.33.7. Componente A: Préstamo BID 925/OC-AR. Pre. II. Coordinación del Estudio. Oficina de la CEPAL-ONU en Buenos Aires. Ministerio de la economía de la nación. 130 pp.
- Ávila, J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis Maestría en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
- Ávila, O. 2005. Composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cordia curassavica* (Jacq) Roemer & Schultes: Boraginaceae (Barredor). Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México.



- Bassole, I. H. N., Ouattara, A. S., Nebie, R. L., Outtara, C. A. T., Kabore, Z. I y Traore, S.A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*. 62: 209-212.
- Boller, T. 1995. Chemoreception of microbial signal in plant cells. *Annual Review of Plants Physiology and Plant Molecular Biology*. 46: 189-214
- Bruneton, J. 1991. *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. Editorial Acribia. México. pp. 223-352.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. y Jones, R. L. 2000. *Biochemistry y Molecular Biology of Plants*. Eds. American Society of Plant Physiologist Rockville, Maryland. pp. 1250-1251.
- Caballero, N. J. 1978. Estudio botánico y ecológico de la región del río Oxpanapa, Veracruz. *El uso agrícola de la selva*. 3(2): 63-83.
- Cervantes, S. L. y Valdés, G. J. 1990. Plantas medicinales del Distrito de Ocotlán, Oaxaca. *Anales. Instituto de Biología, UNAM. México. Serie Botánica*. 60(1): 86-103.
- Compadre, C. M., Hussain, R. A., León, I. y Enriquez, R. G. 1987. Volatile constituents of *Montanoa tomentosa* and *Lippia graveolens*. *Planta Médica*. 53(5): 495-496.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. 12(4): 564-582.
- Dávila, P., Arizmendi, M. del C., Valiente- Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A. y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacan-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.
- Davis, B. D. y Dulbecco, R. 1996. *Tratado de microbiología*. Cuarta edición. Editorial Davis B. D. y Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg H. S. Masson, S.A. México.
- Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Revisión: Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16(4): 385-393.
- Domínguez, A. X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa. México. pp. 3-17.



- Domínguez, X. A., Sánchez, V. H., Suárez, M., Baldas, J. H. y González, M. R. 1989. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Médica* 55: 208.
- FAO-Org. 2005. [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?lang=es&sk=no](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?lang=es&sk=no).
- Finegold, S. M. y Jo Baron, E. 1989. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana. En: Editores Diagnóstico Microbiológico. 7ª edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- García, E. 1988. Diversidad climática vegetal de México. Instituto de Geografía, UNAM 16-25.
- Garcilazo, R. T. 2003. Actividad antibacteriana de cinco negritos blanco (*Lantana achyranthifolia* Dsef.,: Verbenaceae). Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. FES-Iztacala.
- Gil, P. E y Sáez, A. V. 2005. Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamono, bajo la filosofía “cero emisiones” (Documento 30-052005). Conciencias-Universidad EAFIT. Pp.42.
- Gómez-Pompa, A. 1982. La etnobotánica de México. *Biótica*.7(2).
- González, G. M. C., Alejandre, I. G y González, V. L. 1999. Pruebas de laboratorio utilizando aceites esenciales de *L. graveolens* H.B.K. Variedad berlandieri en *Varroa jacobsoni*. *Notiabeja*.7:1-6.
- Gutiérrez, A. I. 1989. Determinación del efecto antimicrobiano, *in vitro*, de las plantas de la subclase dicotiledónea, utilizadas popularmente contra disentería (causada por *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*). Tesis de Licenciatura. UNAM, ENEP-Iztacala. México, D.F.
- Hamburger, M y Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 30(12): 3864-3874.
- Harborne, J. B. 1988. Introduction to ecological biochemistry. Editorial Academia press. Tercera edición. pp.354.
- Harborne, J. B. y Tomas- Barberan, F. A. 1991. Ecological Chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Editorial Clarendon Press-Oxford. pp. 439.



- Herbert & Baxter, H. 1993. Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. London. pp. 550-669.
- Hernández, C. T. 2004. Etnobotánica y actividad antimicrobiana de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Doctorado en Ciencias. FES-Izatacala, UNAM, México.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Durán, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A. y Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 181-188.
- Juven, B. J., Kanner, J., Scheved, F. y Weisslowics, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*. 76: 626-631.
- Kabara, J. J. 1981. Food-grade chemicals for use in designing food preservative system. *Journal Food Protect*.44: 633-647.
- Kim, J., Marshall, M. R. y Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne phatogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 2839-2845.
- Koneman, W. E. 1985. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México.
- Kumate, J. 1988. Morbilidad y mortalidad por diarreas en México. En: Editorial Torregrosa Ferráez L, Olarte J, Rodríguez Suárez RS, Santos Preciado J. I, Velásquez Jones L. *Enfermedades diarreicas en el niño*. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México «Federico Gómez», 9ª ed., México, D.F. pp.11-19.
- Lira, R. 1998. Evaluación del Deterioro Ambiental, Conservación Ecológica y Manejo Sustentable de Recursos Naturales en la Subcuenca Baja de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Informe del Proyecto General de la Unidad de Biotecnología y Prototipos. FES Iztacala, UNAM.
- Mevy, J. P., Bessiere, J. M., Dherbomez, M., Millogo, J. y Viano, J. 2006. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. *Food Chemistry* (En prensa).



- Muñoz, F. 2000. Plantas medicinales y aromáticas. Edición Mundi Prensa. Madrid, España. pp. 99.
- Oliveros, O. 2000. Descripción Estructural de las Comunidades Vegetales en las Terrazas Aluviales del Río el Salado, en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. México. Tesis de Licenciatura en Biología. FES Iztacala. UNAM, México. pp 87.
- Ortiz, D.M.B. 1986. Aztec sources of some mexican Fol. Medicine en Fol. Medicine, the art and the science. American Chemical Society. Stainer R. P. Editor U.S.A.
- Palacios, L. E. E. 2005. Economía y plantas medicinales. Facultad de ciencias económicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. CSI. Boletín 52. pp. 28-32.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez, M. D. y Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology. 76: 201-214.
- Pratesa, H. T., Santos, J. P., Wuaquila, J. M., Fabrisa, J. D., Oliveira, A. B. y Fosterc, J. E. 2003. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopherta dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research. 34(4): 243-249.
- PROCYMAF-SEMARNAP. 2005. Especies forestales no maderables y maderables de zonas áridas y semiáridas en los estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. *Lippia graveolens* Kunth. pp. 1-2.
- Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Epifanio, F., Burini, G y Curini, M. 2005. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Laminaceae). Phitochemistry. 98: 195-200
- Romo de Vivar, A. 1985. Productos naturales de la flora Mexicana. Capítulo 5. Terpenoides, monoterpenoides. Limusa. México. pp. 59-67.
- Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael Coxcatlán. Tesis de Licenciatura en Biología. FES. Iztacala. UNAM. México.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.



- Secretaría de Gobierno, Gobierno del Estado de Puebla. 1999. Los municipios del Estado de Puebla. En: Enciclopedia de los Municipios de México. Puebla, México.
- Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1973. Análisis bacteriológico del agua para el control de su potabilidad. Boletín Informativo. II (10):2-11.
- Serrano, P. R., 2006. Variación espacio temporal de metabolitos con actividad antifúngica de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias. FES-Iztacala. UNAM. México.
- Van der Berghe, D. A. & Vlietink, A. J. 1991. Screening methods for bacterial agents from higher plants. In: Hostettmann, K. (Ed) Methods in plant biochemistry. Vol.6. Assay for bioactivity. pp 47-69.
- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M., Villaseñor, J. L. y Ramírez, J.O. 2000. La vegetación del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica. 67: 24-74.
- Viljoen, A. M., Subramoney, S., Van Vouren, S. F., Boser, K. H. C. y Demirci, B. 2004. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. Journal of Ethnopharmacology. 96: 271-277.
- Villaseñor, J. L., Dávila P. y Chiang, F. 1990. Fitogeografía del valle de Tehuacan-Cuicatlán. Boletín de la sociedad botánica de México.50: 135-149.
- Vitousek, P. y Turner, D. R. 1994. Litter decomposition the mauna loa environmental matrix, Hawaii, In: Patterns, mechanism and models. Ecology 75(2): 418-429.
- Vivas, E. I. E. y Miranda, V. I. 2004. Apuntes de agronomía II. Compilación de agronomía 2. Editorial Universidad Autónoma Chapingo-Departamento de preparatoria agrícola. México. pp. 189.
- Wang, H. & Bung, T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry. 61: 1-6.



- 
- Wink, M. 1999. Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitations in Biotechnology. Editorial Sheffield Academic Press. pp 1-16.