



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
ALGUNOS COMPONENTES DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA
TRADICIONAL DEL VALLE DE TEHUACÁN- CUICATLÁN,
PUEBLA.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

SEBASTIAN CANDELARIA DUEÑAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MEX.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala bajo la dirección de la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo forma parte del Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera PAPCA (1) 2012 – 2013. UNAM con el nombre: Actividad antimicrobiana de algunos componentes de los aceites esenciales de plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla.

También al Project useful San Rafael Coxcatlán Plants (MGU/Useful Plants Project México) Royal Botanical Gardens Kew.

A mi directora de tesis Tzasna, por toda la paciencia, ayuda y esfuerzos realizados durante este trabajo.

Por ultimo a mi familia, maestros y amigos que estuvieron esperando este momento, por enseñarme y ayudarme. Muchas gracias a todos por su apoyo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	7
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS PARTICULARES	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Obtención de los compuestos	9
Microorganismos utilizados	9
Bacterias Gram-positivas	9
Bacterias Gram-negativas	9
Levaduras	10
Evaluación de la actividad antibacteriana	10
Evaluación cualitativa	10
Evaluación cuantitativa	10
Evaluación de la actividad antifúngica	11
Efecto del aceite sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	11
Análisis estadísticos	11
RESULTADOS	12
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	12
Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	17
Efecto del aceite sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	24
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	33
APÉNDICES	34
Apéndice I. Estructura química de los diferentes compuestos empleados	34
Apéndice II. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer	36
Apéndice III. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	38
Apéndice IV. Efecto del compuesto sobre la curva de crecimiento bacteriano	39
BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Estudios realizados sobre algunos componentes de aceites esenciales.	7
Cuadro 2.	Actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos sobre bacterias Gram positivas.	13
Cuadro 3.	Actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos sobre bacterias Gram negativas.	14
Cuadro 4.	Actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos sobre levaduras.	15
Cuadro 5.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) sobre bacterias Gram positivas.	18
Cuadro 6.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) sobre bacterias Gram negativas.	19
Cuadro 7.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración fungicida mínima (CFM) sobre levaduras.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ruta de síntesis del ácido mevalónico.	5
Figura 2.	Ruta de síntesis de 5-Fosfono-1-desoxi-D-xilulosa.	6
Figura 3.	Actividad antimicrobiana de los compuestos sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.	17
Figura 4.	Efecto del eugenol sobre la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> .	24
Figura 5.	Efecto del eugenol sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> 75MR.	25
Figura 6.	Efecto del eugenol sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> CUSI.	25
Figura 7.	Efecto del carvacrol sobre la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> .	26
Figura 8.	Efecto del carvacrol sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> 75MR.	26
Figura 9.	Efecto del carvacrol sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> CUSI.	27
Figura 10.	Efecto del timol sobre la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> .	27
Figura 11.	Efecto del timol sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> 75MR.	28
Figura 12.	Efecto del timol sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> CUSI.	28

RESUMEN

Se han realizado estudios sobre los aceites esenciales de plantas medicinales del valle de Tehuacán-Cuicatlán con actividad antimicrobiana y se encontró que presentan compuestos en común como: α -pineno, β -pineno, carvacrol, eugenol, limoneno, mirceno, ocimeno, cineol, salicilato de metilo, farneseno y timol. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de algunos compuestos presentes en los aceites esenciales. La evaluación cualitativa se realizó por la técnica de difusión en agar de Kirby Baüer en bacterias Gram positivas (11 cepas), Gram negativas (18) y levaduras (8). Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó el método de dilución en agar. Todos los compuestos evaluados presentaron actividad antimicrobiana. El eugenol y el carvacrol tuvieron los halos de inhibición más grandes sobre la mayoría de las cepas microbianas expuestas. En cuanto a las levaduras, los compuestos ocimeno, cineol y farneseno no presentaron ninguna actividad. Los compuestos eugenol, carvacrol y timol presentaron las CMI y CBM más bajas, se observó un efecto bactericida en concentraciones mayores o iguales a CMI para *Staphylococcus aureus* 75MR, *Escherichia coli* 128 MR y *Candida albicans* CUSI, para los diferentes compuestos eugenol, carvacrol y timol.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas a lo largo de la historia, por todas las civilizaciones de forma empírica basada en la tradición para satisfacer sus necesidades tales como la alimentación, vestimenta, construcción, para aliviar algunas enfermedades que los aquejan, etc. (Rio et al., 2006). Los hombres y animales tuvieron que distinguir entre las plantas venenosas y las que no lo eran; así se desarrolló gradualmente el conocimiento de las drogas de origen natural. El conocimiento de la flora ha permitido mejorar las condiciones de vida del ser humano (Evans., 1991).

En los países en vías de desarrollo, el amplio uso de las plantas medicinales se atribuye a su accesibilidad y asequibilidad. Incluso la distribución del personal de la salud es desigual, la mayor parte se encuentra en ciudades u otras zonas urbanas y por lo tanto es difícil que las poblaciones rurales tengan acceso. La medicina tradicional es a veces la única fuente asequible de atención sanitaria, especialmente para los habitantes de bajo recurso (OMS, 2002).

En México, las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, tanto en el medio rural como el medio urbano (Osuna et al., 2005). No obstante, aún cuando los bienes y servicios suministrados por la medicina alópata son un elemento esencial para la salud de la población, éstos no cubren necesariamente la totalidad de la demanda, por lo que el consumo de plantas medicinales se ha incrementado. Tan sólo en el 2011 los mexicanos destinaron 972 millones de pesos en servicios y productos de medicina tradicional. El 55.2% fue utilizado para el pago de curanderos, chamanes, parteras, etcétera; y el resto en la compra de hierbas medicinales, remedios caseros, medicamentos naturistas, entre otros (INEGI, 2013).

Estos hechos promueven la realización de catálogos de plantas partiendo de investigaciones etnobotánicas. La OMS avala desde hace años el uso racional de las plantas que han demostrado eficacia terapéutica y cuya relación

beneficio/riesgo puede resultar adecuada para su empleo por distintos sistemas sanitarios (Rio et al., 2006).

En México, existen instituciones que entre sus funciones se encuentra el bienestar social, las cuales incluyen actividades dirigidas a coleccionar ejemplares de la flora medicinal. Por ejemplo el Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAM) realizó un trabajo etnobotánico que respalda las investigaciones experimentales farmacológicas y/o fitoquímicas. Por otra parte el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM) contiene cerca de 17 mil ejemplares en su colección de plantas y respaldadas por investigaciones de campo representativos de la diversidad étnica y florística de México (Aguilar et al., 1994; Betancourt y Gutierrez., 1999).

En cuanto a biodiversidad, México es un país muy rico, reconocido por ser el cuarto lugar en el mundo, donde existen especies utilizadas con fines medicinales (Aguilar et al., 1994). En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana. Soportada por aproximadamente 4,500 especies, ésta ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (García de Alba., 2012). A pesar de la popularidad cada vez mayor de las plantas medicinales en todo el mundo y en México, muchas de las plantas utilizadas con fines medicinales tiene usos reconocidos tradicionalmente, pero existe poca documentación científica sobre sus principios activos, sus acciones farmacológicas o su eficiencia clínica (Bornes et al., 2004).

En la actualidad se ha incrementado en el sector público y privado el interés sobre los productos naturales en la industria farmacéutica, ya que han sido la principal fuente de medicamentos comerciales. El 61% de las drogas que existen en el mercado han sido obtenidas de los productos naturales. De las 35 000 especies de plantas que existen, se cree que un tercio aún no han sido descubiertas y del cuarto de millón que se han reportado sólo una fracción de ellas han sido químicamente investigadas (Cseke et al., 2006), mediante diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos para verificar su efectividad (Ortega, 2005).

Esto se le atribuye a los metabolitos secundarios que son compuestos de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por el ataque de insectos, herbívoros o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan compuestos que degradan la pared celular de los microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar toxinas de origen microbiano (Jiménez et al., 2004). Cabe mencionar que los metabolitos secundarios juegan un papel importante en la selección natural ya que al contener las plantas diversos compuestos estos las puede hacer más competentes ante otras plantas y poder sobrevivir (Croteau et al., 2000). Cada planta posee predominio de uno a varios metabolitos secundarios. Estos compuestos pueden actuar en el organismo en forma complementaria, o bien tener una actividad distinta, de esta forma se amplía el espectro de actividad de una planta. El valor medicinal de una planta reside en sus compuestos, son producidos por distintos tejidos, semillas, tallos, flores y raíces (Belda y Bellod, 2006).

Los aceites esenciales los cuales son mezclas de hidrocarburos alicíclicos y aromáticos compuestos por una mezcla de metabolitos secundarios de gran importancia en las plantas como son; terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esterres, sustancias azufradas y nitrogenadas; estos se obtienen por arrastre de vapor, son líquidos a temperatura ambiente incoloros y generalmente su densidad es inferior a la del agua y son liposolubles. La proporción de estas sustancias varía de una especie a otra, y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo, etc. Se encuentran en todos los órganos vegetales su función principal es la de atraer insectos polinizadores, además sirven como medio de defensa ante el ataque de diferentes organismos. En la industria generalmente son empleados en la elaboración de fragancias (Dominguez, 1973; Bruneton, 1991)

Los terpenos son los compuestos más frecuentes de los aceites esenciales que derivan de la unión de unidades de cinco carbonos llamados isopreno (C_5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil

pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato (Figura1) que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta de la 5-Fosfono-1-Desoxi-D-Xilulosa o DXP (Figura 2), la cual es independiente de la del mevalonato y que se realiza en los plástidos. Los sesquiterpenos (C₁₅), triterpenos (C₃₀) y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos (dos unidades de isopreno C₁₀), diterpenos (C₂₀), tetraterpenos (C₄₀) y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Jiménez et al., 2004; Dey y Harborne, 1991).

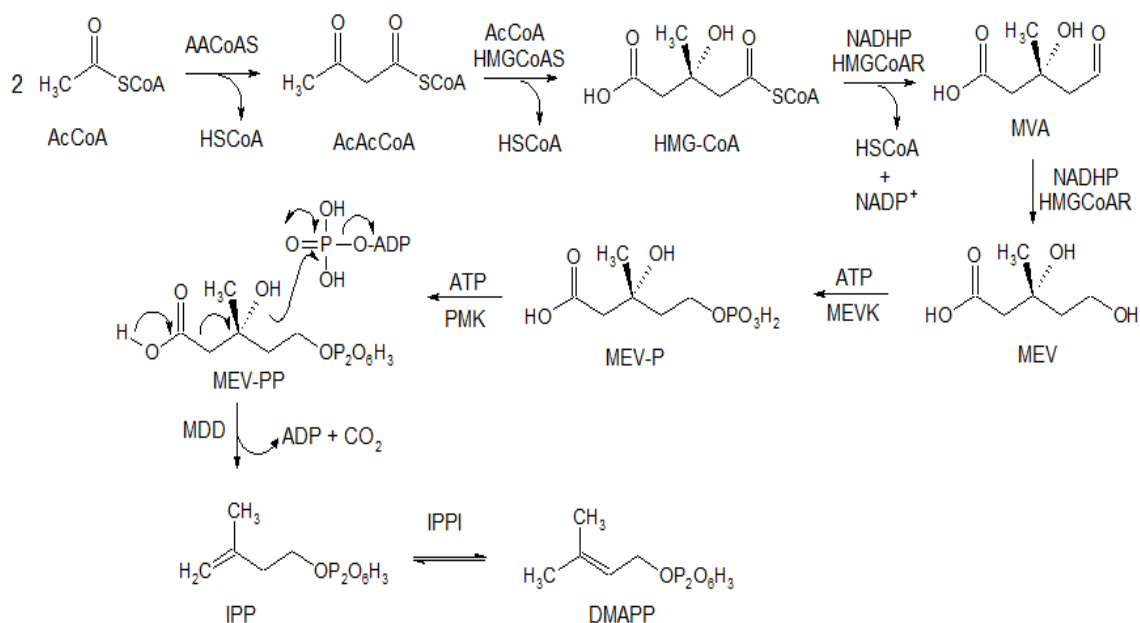


Figura 1. Ruta de síntesis del ácido mevalónico. Parte de dos unidades de acetil coenzima A (Ac-CoA), en donde se condensan por medio de una reacción tipo Claisen para dar acetoacetil-CoA (AcAcCoA). Esta molécula se vuelve a condensar con una tercera unidad de AcCoA para dar como producto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) como intermediario. El tioéster de la coenzima A se reduce para formar el aldehído correspondiente, el mevaldehído (MVA), el cual se reduce a ácido mevalónico (MEV). Por acción de dos moléculas de adenosin trifosfato (ATP) el mevalonato se fosforila (MEV-P y MEV-PP) y descarboxila para dar como productos los precursores de los terpenos, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). La ruta del mevalonato es prácticamente universal y se lleva a cabo en el citosol. Por esta ruta se sintetizan principalmente sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos. *Enzimas:* Acetoacetil-CoA sintetasa (AACoAS). 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGCsAS). 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCsAR). Mevalonato quinasa (MEVK). Fosfomevalonato quinasa (PMK). Mevalonate 5-difosfato descarboxilasa (MDD). Difosfato de isopentenilo isomerasa (IPPi). (Eisenreich et al., 2001)

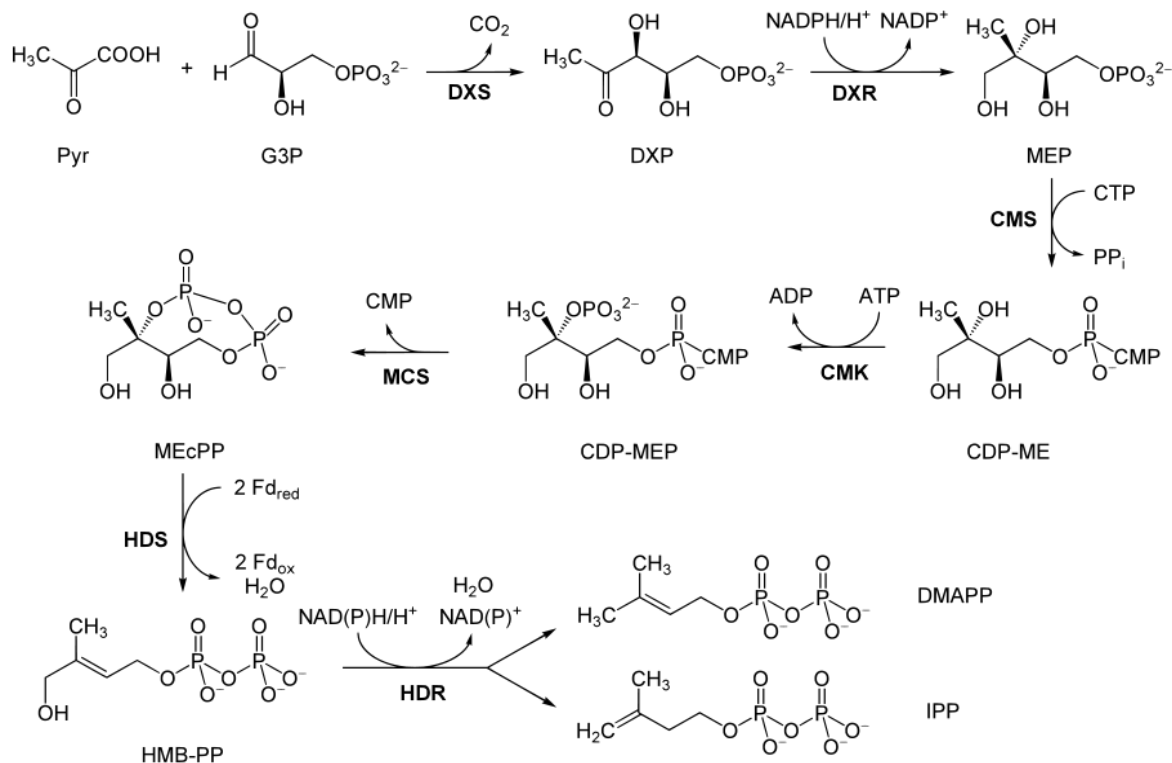


Figura 2. Ruta de síntesis del 5-Fosfono-1-Desoxi-D-xilulosa. Una unidad de ácido pirúvico (Pyr), proveniente de la degradación de carbohidratos, se condensa en grupo carbonilo del piruvato con el grupo carbonílico del D-gliceraldehído (G3P), para dar la 5-Fosfono-1-desoxi-D-xilulosa (DXP). Por medio de una condensación aldólica inversa, el carbono 1 transpone hacia la posición 2, generando así el 4-fosfono-2-C-metil-D-eritritol (MEP). Éste intermediario se conjuga por medio de una sustitución nucleofílica con una unidad de citidilribósido, por acción del CTP, para formar 4-(CDP)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME). Este compuesto se fosforila en el carbono 2, donde se forma el intermediario fosforilado CDP-EMP y desplaza el citidilribósido para obtenerse el 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclofosfato (MEcPP). Por ruptura reductiva del ciclo se da una reacción de eliminación para formar el pirofosfato de 4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo (HMB-PP). El paso final consiste en la eliminación del grupo hidroxilo para obtenerse el catión alílico correspondiente, el cual puede transponerse de tal forma que se isomerizan de manera reversible el IPP y el DMAPP. Esta ruta se lleva a cabo sobre todo en los plástidos de las plantas y en muchas células procariontes. Por esta ruta se sintetizan sobre todo monoterpenos, diterpenos y carotenoides. *Enzimas:* 5-Fosfono-1-desoxi-D-xilulosa sintasa (DXS). 5-Fosfono-1-desoxi-D-xilulosa reductoisomerasa (DXR). 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa (CMS). 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa. (CMK). 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MCS). 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa (HDS). 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (HDR) (Eisenreich et al., 2001).

Los metabolitos secundarios generalmente están presentes en las plantas como mezclas de compuestos y los patógenos son afectados diferencialmente por estos dependiendo de su concentración (Espinosa-García, 2001). El interés en los monoterpenos aislados ha ido creciendo en los últimos años debido a su eventual uso en la farmacéutica o su utilidad farmacológica que estos presentan (Sánchez et al., 2004).

El valle de Tehuacán-Cuicatlán es una zona de una elevada tradición en el uso de plantas medicinales (Hernández et al., 2003). Se han realizado diversos estudios sobre los aceites esenciales de algunas especies tales como: *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae) (Hernández et al., 2005), *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae) (Hernández et al., 2009), *Cordia curassavica* (Boraginaceae) (Hernández et al., 2007) *Gymnolaena oaxacana* (Greenman) Rydb. (Asteraceae) (Candelaria et al., 2015). En estos estudios se encontró que los aceites esenciales presentan muchos compuestos en común entre ellos: α -pineno, β -pineno, carvacrol, eugenol, limoneno, mirceno, ocimeno, cineol, salicilato de metilo, farneseno y timol.

ANTECEDENTES

Sobre los componentes de aceites esenciales se han realizado pocos estudios y algunos de ellos se encuentran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Estudios realizados sobre algunos componentes de aceites esenciales.

Autores	Estudio realizado
Braga et al., 2007	El timol y el eugenol presentaron actividad antifúngica sobre <i>Candida. albicans</i> alterando la morfología de esta.
Pandima et al., 2010	La actividad antibacteriana de eugenol contra <i>Salmonella. typhi</i> se debe a la interacción del eugenol en la membrana bacteriana. El efecto bactericida se observa después de 60 minutos
Guarda et al., 2011	Evaluaron la actividad antimicrobiana del timol y carvacrol y mostraron actividad sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Sieniawskaa et al., 2013	Evaluaron el aceite esencial de <i>Mutellina purpurea</i> y α -pineno sobre tres cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> teniendo éste mayor actividad antimicrobiana que el aceite esencial.

JUSTIFICACIÓN

Las plantas han sido utilizadas a lo largo de la historia para satisfacer las necesidades como una alternativa comercial y farmacológica para el tratamiento de diversas enfermedades, es importante realizar estudios que validen el uso de las plantas medicinales para conocer los componentes responsables de la actividad antimicrobiana como son los aceites esenciales, debido a que estos se presentan en mezclas a distintas proporciones es importante conocer los compuestos que aportan a las plantas a dicha actividad. De esta manera este estudio tiene como fin contribuir al conocimiento de las propiedades medicinales de los aceites esenciales y sus componentes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de algunos compuestos presentes en los aceites esenciales de plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán - Cuicatlán, Puebla. (α -pineno, β -pineno, carvacrol, eugenol, limoneno, mirceno, ocimeno, cineol, salicilato de metilo, farneseno y timol).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) de cada uno de los compuestos.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM) de cada uno de los compuestos.
- Determinar el efecto de los compuestos más activos sobre la curva de crecimiento de una bacteria Gram positiva, una Gram negativa y un hongo levaduriforme.

MATERIALES Y METODOS

1.- Obtención de los compuestos.

Los compuestos se obtuvieron de Sigma-Aldrich: α -pineno (147524), β -pineno (112089), carvacrol (282197), eugenol (E51791), limoneno (183164), mirceno (M100005), ocimeno (W353901-1006), cineol (C80601), salicilato de metilo (W274518), farneseno (W383902) y timol (T0501). (Apéndice I).

2.-Microorganismos utilizados.

Los microorganismos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana fueron los siguientes:

Bacterias Gram-positivas.

Staphylococcus aureus ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* aislada de un caso clínico donada por el Hospital Angeles (Metropolitano). *Staphylococcus aureus* 48, 75 y 83 MR cepas multirresistentes aisladas de casos clínicos donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM).

Bacterias Gram-negativas.

Vibrio cholerae No-01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Vibrio cholerae* CDC V12, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Enterobacter aerogenes*, fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán, *Yersinia enterocolitica*, fue donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala y *Salmonella typhi* ATCC 19430. *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 53218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens* aisladas de casos clínicos, donadas

por el Hospital Angeles (Metropolitano). *E. coli* 10, 1249, 28 y 128 MR cepas multirresistentes aisladas de casos clínicos donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala.

Levaduras

Candida albicans aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala, *Candida albicans* ATCC 14065, donadas por la FES Cuautitlán, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* aisladas de casos clínicos, donadas por el Hospital Angeles (Metropolitano).

3.-Evaluación de la actividad antibacteriana.

Evaluación cualitativa

Se evaluaron los compuestos sobre las bacterias de acuerdo a la técnica de difusión en agar o de Kirby Baüer (Koneman, 1991). Los discos se impregnaron con 4 µL de cada uno de los compuestos. El control positivo consistió en discos impregnados de 25 µg de cloranfenicol, como control negativo se utilizó dimetil sulfóxido. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. (Apéndice II).

Evaluación cuantitativa

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó el método de dilución en agar (Koneman, 1991). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 0.01, 0.03, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 mg/mL. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice III).

4.-Evaluación de la Actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica en levaduras para cada compuesto se evaluó utilizando las mismas técnicas que para bacterias solo que el agar utilizado fue papa dextrosa y como control positivo nistatina (30µg/mL).

5.-Efecto del aceite sobre la curva de crecimiento bacteriano

El efecto del compuesto sobre las curvas de crecimiento realizándose de acuerdo al método propuesto por Kubo et al. 1993, citado en Avila, 1996. Con bacterias tanto Gram-positivas y Gram-negativas y hongos levaduriformes (Apéndice IV).

6.-Análisis estadísticos

A los resultados obtenidos de los bioensayos de la actividad antibacteriana se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, siendo los factores: tratamientos (cada uno de los compuestos) las cepas bacterianas y levaduras. (Durán et al., 2004).

RESULTADOS

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana de cada uno de los compuestos se evaluó de acuerdo al Método en difusión en agar (Kirby-Bauer) cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos en las evaluaciones cualitativas de la actividad antibacteriana en 11 cepas Gram positivas de los compuestos se muestran en el cuadro 2, en 16 cepas Gram negativas se muestran en el cuadro 3 y el comportamiento sobre 8 levaduras se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 2. Actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos sobre bacterias Gram positivas

Cepas	Control positivo	α - pineno	β - pineno	Eugenol	Mirceno	Ocimeno	Limoneno	Carvacrol	Cineol	Salicilato de metilo	Farneseno	Timol
<i>B. subtilis</i> FES-C	16.0±0.5	9.6±1.8	na	16.3±1.5	na	na	8.6±0.5	»	9.0±1.0	na	na	na
<i>B. subtilis</i> cc	29.3±2.6	na	na	11.3±0.5	na	11.0±1.0	na	35.6±0.0	na	na	na	na
<i>E. faecalis</i>	21.7±1.7	na	na	14.6±1.5	9.0±1.0	10.0±1.7	11.3±0.5	24.3±0.0	8.3±0.5	11.0±0.0	8.6±2.3	»
<i>M. luteus</i>	23.0±0.5	na	na	na	na	na	na	15.0±0.0	na	na	na	na
<i>S. aureus</i> ATCC 12398	28.0±1.6	na	na	11.0±0.0	na	na	10.3±1.1	32.0±0.0	10.0±3.0	16.3±0.9	13.3±1.5	31.6±1.2
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27.6±0.1	na	na	na	na	na	13.6±0.5	27.6±0.0	na	na	7.0±1.0	30.3±0.4
<i>S. aureus</i> 48 MR	22.0±0.0	na	8.0±2.3	18.6±2.0	na	na	na	»	na	10.3±0.4	8.0±0.0	na
<i>S. aureus</i> 75 MR	20.0±0.0	na	5.0±1.4	9.6±1.1	na	na	10.3±1.5	23.3±0.0	na	na	9.0±1.0	26.6±1.2
<i>S. aureus</i> 83 MR	22.0±0.0	na	na	13.0±0.0	na	na	9.6±1.5	26.0±0.0	na	11.6±0.4	9.0±0.0	26.6±1.2
<i>S. aureus</i> cc	14.0±0.0	na	na	12.0±1.0	na	7.3±0.5	na	17.0±0.0	na	14.3±1.6	9.6±0.5	26.3±1.2
<i>S. epidermidis</i> FES-C	6.7±1.2	na	na	15.3±0.5	na	na	10.3±0.5	na	na	8.0±0.8	na	na

Halos de inhibición en mm. Cada biensayo se realizó por triplicado. Control positivo: Cloramfenicol 25 μ g. *Bacillus subtilis* FES Cuautitlan, *Bacillus subtilis* caso clinico, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* 48 multi resistente, *Staphylococcus aureus* 75 multi resistente, *Staphylococcus aureus* 83 multi resistente, *Staphylococcus aureus* caso clínico, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* FES Cuautitlan. » inhibición total del crecimiento. na: sin actividad.

Cuadro 3. Actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos sobre bacterias Gram negativas

Cepas	Control positivo	α - pineno	β - pineno	Eugenol	Mirceno	Ocimeno	Limoneno	Carvacrol	Cineol	Salicilato de metilo	Farneseno	Timol
<i>E. aerogenes</i> FES-C	12.0±0.5	na	na	13.3±0.5	na	9.0±0.0	16.3±2.8	26.3±1.1	na	na	8.6±0.5	29.6±0.4
<i>E. aerogenes</i> cc	19.3±0.5	na	8.0±3.5	na	na	na	na	33.0±1.0	na	na	na	na
<i>E. coli</i> 10 MR	22.0±0.0	na	na	15.3±1.5	na	na	7.0±0.0	17.6±0.5	8.6±1.1	9.3±0.9	9.6±0.5	na
<i>E. coli</i> 1249 MR	23.0±0.0	na	na	14.3±0.5	na	na	na	24.3±1.1	na	na	na	28.0±1.6
<i>E. coli</i> 128 MR	25.0±0.0	na	na	na	na	na	8.3±0.5	27.3±0.5	na	na	na	18.6±0.9
<i>E. coli</i> 28 MR	24.0±0.0	na	na	20.0±2.0	na	na	10.0±0.0	na	na	na	na	na
<i>E. coli</i> ATCC 53228	21.7±1.7	11.6±2.0	na	15.3±0.5	8.3±2.5	9.6±1.5	25.6±1.1	30.0±0.5	na	na	na	»
<i>E. coli</i> cc	9.0±0.0	na	na	na	na	na	9.6±0.5	23.6±0.5	7.5±0.7	na	na	25.0±3.5
<i>P. aeruginosa</i>	7.3±0.6	na	na	12.3±1.1	na	8.0±2.0	na	28.6±1.1	8.0±0.0	8.0±0.8	7.6±0.5	28.6±1.2
<i>P. mirabilis</i>	13.3±0.5	na	na	14.6±2.0	na	na	na	20.3±0.5	9.6±0.5	10.6±0.4	na	»
<i>S. typhimurium</i>	25.7±0.5	na	na	20.0±1.0	na	na	7.6±0.5	26.6±1.5	na	na	na	33.3±1.2
<i>V. cholera</i> Tor	6.7±0.6	na	na	12.6±1.1	na	9.6±1.5	na	29.0±1.7	na	8.3±1.24	8.3±0.5	»
<i>V. cholera</i> Agua	10.0±1.0	na	na	13.3±1.1	8.0±0.0	7.0±0.0	10.6±0.5	22.3±0.5	na	7.3±0.4	na	32.3±1.2
<i>V. cholera</i> cc	27.7±0.5	na	na	13.6±0.5	na	6.6±1.5	13.0±1.0	25.0±0.0	na	8.6±0.9	8.3±0.5	30.3±0.4
<i>Y. enterocolitica</i> CUSI	8.3±0.1	na	na	18.6±5.5	na	na	12.3±0.5	na	10.3±0.5	na	na	»
<i>Y. enterocolitica</i> HA	25.7±0.5	na	na	24.0±1.0	10.3±2.0	10.3±1.5	9.3±1.1	24.3±0.5	na	na	10.0±0.0	»

Halos de inhibición en mm. Cada biensayo se realizó por triplicado, Control positivo: Cloramfenicol 25 μ g. *Enterobacter aerogenes* FES Cuautitlán, *Enterobacter aerogenes* caso clínico, *Escherichia coli* 10, 1249, 28 y 128 MR multirresistentes, *Escherichia coli* ATCC 53218, *Escherichia cocaso* clínico, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* ATCC 194, *Vch* Tor: *Vibrio cholerae* CDC V12, *Vch* agua: *Vibrio cholerae* INDRE 206, *Vch* cc: *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Ye*: *Yersinia enterocolitica*, *Ye* cc: *Yersinia enterocolitica* aisladas de casos clínicos. »: inhibición total del crecimiento. na sin actividad.

Cuadro 4. Actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos sobre levaduras

Cepas	Control positivo	α - pineno	β - pineno	Eugenol	Mirceno	Limoneno	Carvacrol	Salicilato de metilo	Timol
<i>C. albicans</i> ATCC 14065	10.0±0.0	12.0±0.8	na	30.3±1.5	12.0±1.7	15.3±1.5	32.3±2.0	»	»
<i>C. albicans</i> CUSI	10.0±0.0	na	7.7±0.9	20.0±1.0	10.3±1.5	14.0±2.6	39.0±1.7	»	»
<i>C. albicans</i> cc	10.0±0.0	14.3±2.4	9.3±1.8	20.6±1.5	11.3±1.5	21.0±7.81	»	na	»
<i>C. glabrata</i>	8.0±0.0	na	10.0±0.0	14.3±1.1	9.3±1.5	14.6±0.5	34.6±4.0	»	»
<i>C. tropicalis</i>	9.0±0.0	na	11.0±1.4	16.0±0.0	10.6±1.1	16.6±3.5	34.0±6.0	na	»
<i>C. tropicalis</i> cc	9.0±0.0	9.3±1.2	na	13.0±2.0	10.6±0.5	13.6±0.5	»	»	»
<i>C. albicans</i> 17 MR	10.0±0.0	na	11.3±1.4	18.3±3.0	10.0±1.0	8.3±7.23	»	na	»
<i>C. albicans</i> 18 MR	10.0±0.0	12.3±1.4	na	16.3±3.0	11.3±0.5	7.6±6.6	»	na	»

Halos de inhibición en mm. Cada biensayo se realizó por triplicado. Control positivo: Nistatina 30 μ g. Simbología. Ca CUSI: *Candida albicans* aislada de un caso clínico, *Candida albicans* ATCC 14065, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* aisladas de casos clínicos, *Candida albicans* 17 y 18 multi resistentes. » inhibición total del crecimiento. na sin actividad.

Como se puede observar en los cuadros anteriores tanto bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras fueron sensibles a los compuestos evaluados, los que presentaron mayor actividad tanto para las bacterias Gram positivas y Gram negativas fueron carvacrol y eugenol que presentaron actividad en la mayoría de las cepas desafiadas presentando los halos de inhibición más grandes. α -pineno, β -pineno y mirceno fueron los compuestos que presentaron menor actividad sobre el total de las cepas sometidas (Cuadro 2 y 3). En cuanto a las levaduras, los compuestos ocimeno, cineol y farneseno no presentaron actividad sobre ninguna cepa levaduriforme (Cuadro 4).

En cuanto al tamaño del halo de inhibición con respecto al grupo bacteriano (Gram positivas y Gram negativas) y levaduriforme se les realizó un análisis de varianza (ANOVA). Se puede observar que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$), es decir; los compuestos inhiben el crecimiento de ambos tipos bacterianos y levaduras (Figura 3).

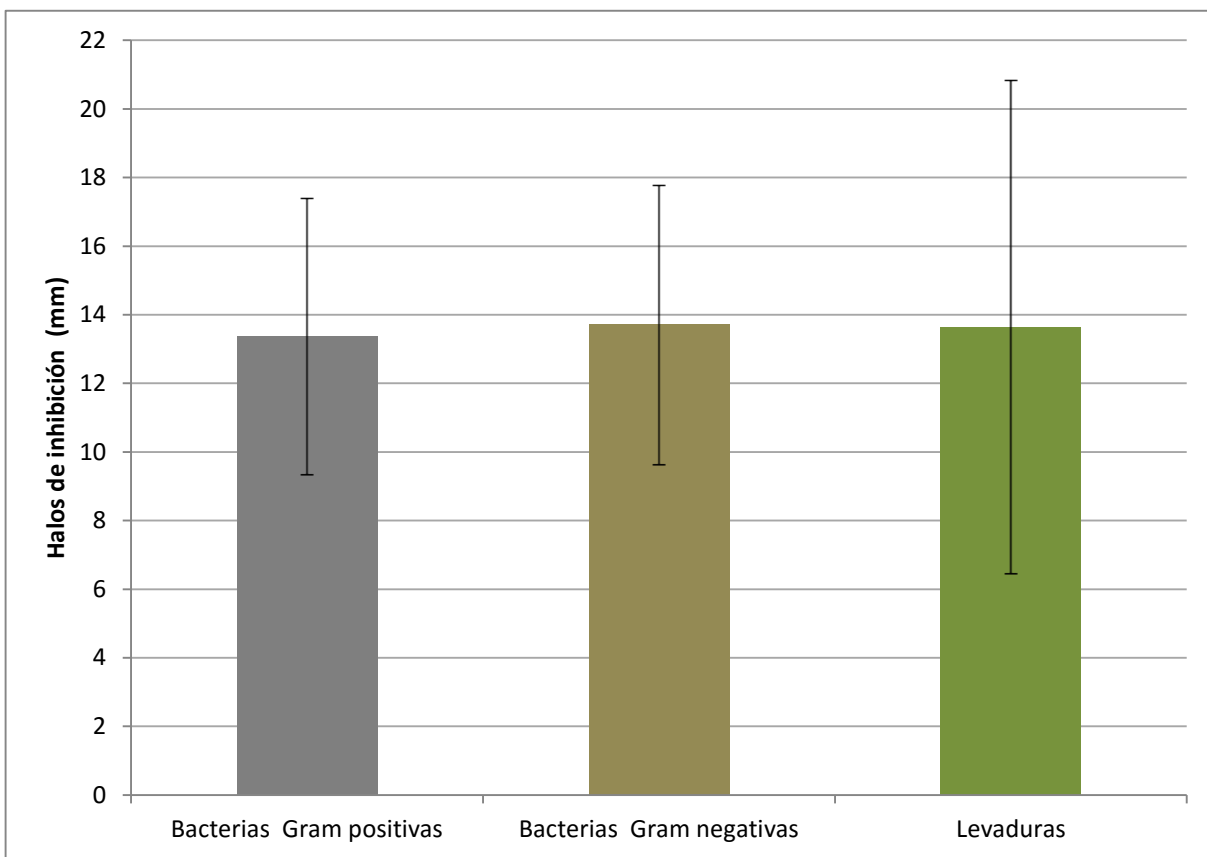


Figura 3. Actividad antimicrobiana de los compuestos sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.

Evaluación cuantitativa

Una vez comprobada la actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos se procedió a determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración bactericida mínima (CBM). Los resultados obtenidos en la determinación de CMI y CBM de las bacterias Gram positivas se observan en el cuadro 5, los de bacterias Gram negativas se observan en el cuadro 6 y sobre levaduras se observan en el cuadro 7.

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida mínima (CBM) sobre bacterias Gram positivas

Cepas	mg/mL	α - pineno	β - pineno	Eugenol	Mirceno	Ocimeno	Limoneno	Carvacrol	Cineol	Salicilato de metilo	Farneseno	Timol
<i>B. subtilis</i> FES-C	MIC	> 4.0	nd	0.25	nd	nd	2.0	0.125	1.0	nd	nd	nd
	CBM	>> 4.0	nd	0.50	nd	nd	> 2.0	0.250	2.0	nd	nd	nd
<i>B. subtilis</i> cc	MIC	nd	nd	0.25	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	nd	nd
	CBM	nd	nd	0.50	nd	nd	nd	0.250	nd	nd	nd	nd
<i>E. faecalis</i>	MIC	nd	nd	0.75	4.0	4.0	2.0	0.030	1.0	>2.0	nd	nd
	CBM	nd	nd	0.50	>4.0	>4.0	>2.0	0.062	2.0	>>2.0	nd	nd
<i>M. luteus</i>	MIC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	nd	nd
	CBM	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.250	nd	nd	nd	nd
<i>S. aureus</i> ATCC 12398	MIC	nd	nd	0.50	nd	nd	2.0	0.125	1.0	>2.0	nd	0.25
	CBM	nd	nd	0.75	nd	nd	>2.0	0.250	2.0	>>2.0	nd	0.50
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MIC	nd	nd	nd	nd	nd	1.5	0.125	nd	nd	>2.0	1.00
	CBM	nd	nd	nd	nd	nd	2.0	0.250	nd	nd	>>2.0	2.00

Simbología. *Bacillus subtilis* FES Cuautitlan, *Bacillus subtilis* caso clinico, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATTCC 12398, *Staphylococcus aureus* ATTCC 29213. > Mayor a la concentración. >> Mucho mayor a la concentración. nd: no determinada

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida mínima (CBM) sobre bacterias Gram positivas (Continuación)

Cepas	mg/mL	α - pineno	β - pineno	Eugenol	Mirceno	Ocimeno	Limoneno	Carvacrol	Cineol	Salicilato de metilo	Farneseno	Timol
<i>S. aureus</i> 48 MR	MIC	nd	nd	0.50	nd	nd	nd	0.062	nd	nd	nd	nd
	CBM	nd	nd	0.75	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	nd	nd
<i>S. aureus</i> 75 MR	MIC	nd	>4.0	0.50	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	>2.0	0.5
	CBM	nd	>>4.0	0.75	nd	nd	nd	0.250	nd	nd	>>2.0	1.0
<i>S. aureus</i> 83 MR	MIC	nd	nd	0.50	nd	nd	nd	0.125	nd	>2.0	>2.0	nd
	CBM	nd	nd	0.75	nd	nd	nd	0.250	nd	>>2.0	>>2.0	nd
<i>S. aureus</i> cc	MIC	nd	nd	0.50	nd	1.5	nd	0.125	nd	>2.0	>2.0	nd
	CBM	nd	nd	0.75	nd	4.0	nd	0.250	nd	>>2.0	>>2.0	nd
<i>S. epidermidis</i> FES-C	MIC	nd	nd	0.50	nd	nd	2.0	nd	nd	nd	nd	0.5
	CBM	nd	nd	0.75	nd	nd	>2.0	nd	nd	nd	nd	1.0

Simbología. *Staphylococcus aureus* 48 multi resistente, *Staphylococcus aureus* 75 multi resistente, *Staphylococcus aureus* 83 multi resistente, *Staphylococcus aureus* caso clínico, *Staphylococcus epidermidis* FES Cuautitlan. > Mayor a la concentración. >> Mucho mayor a la concentración. nd: no determinada

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida mínima (CBM) sobre bacterias Gram negativas.

Cepas	mg/mL	α - pineno	Eugenol	Mirceno	Ocimeno	Limoneno	Carvacrol	Cineol	Salicilato de metilo	Farneseno	Timol
<i>E. aerogenes</i> FES-C	CMI	nd	0.50	nd	4.0	nd	0.125	nd	nd	nd	nd
	CBM	nd	0.75	nd	>>4.0	nd	0.250	nd	nd	nd	nd
<i>E. aerogenes</i> cc	CMI	nd	nd	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	nd	nd
	CBM	nd	nd	nd	nd	nd	0.250	nd	nd	nd	nd
<i>E. coli</i> 10 MR	CMI	nd	0.25	nd	nd	2.0	0.125	nd	>2.0	>2.0	nd
	CBM	nd	0.50	nd	nd	>>2.0	0.250	nd	>>2.0	>>2.0	nd
<i>E. coli</i> 1249 MR	CMI	nd	0.50	nd	nd	nd	0.500	nd	nd	nd	0.25
	CBM	nd	0.75	nd	nd	nd	0.750	nd	nd	nd	0.50
<i>E. coli</i> 128 MR	CMI	nd	0.25	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	nd	0.25
	CBM	nd	0.50	nd	nd	nd	0.250	nd	nd	nd	0.50
<i>E. coli</i> 28 MR	CMI	nd	0.50	nd	nd	2.0	nd	nd	nd	nd	1.00
	CBM	nd	0.75	nd	nd	>>2.0	nd	nd	nd	nd	2.00
<i>E. coli</i> ATCC 53228	CMI	0.25	0.25	2	nd	0.5	0.125	nd	nd	nd	nd
	CBM	2.0	0.50	3.0	nd	>>2.0	0.250	nd	nd	nd	nd
<i>E. coli</i> cc	CMI	nd	0.25	nd	nd	2.0	0.250	nd	nd	nd	nd
	CBM	nd	0.50	nd	nd	>>2.0	0.250	nd	nd	nd	nd

Simbología. *Enterobacter aerogenes* FES Cuautitlán, *Enterobacter aerogenes* caso clínico, *Escherichia coli* 10, 1249, 28 y 128 MR multirresistentes, *Escherichia coli* ATCC 53218, *Escherichia* cocaso clínico. > Mayor a la concentración. >> Mucho mayor a la concentración. nd no determinada

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida mínima (CBM) sobre bacterias Gram negativas (continuación).

Cepas	mg/mL	α - pineno	Eugenol	Mirceno	Ocimeno	Limoneno	Carvacrol	Cineol	Salicilato de metilo	Farneseno	Timol
<i>P. aeruginosa</i>	CMI	nd	nd	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	nd	2.0
	CBM	nd	0.750	nd	nd	nd	0.250	nd	nd	nd	>>2.0
<i>P. mirabilis</i>	CMI	nd	0.500	nd	4.0	nd	0.062	nd	>2.0	nd	nd
	CBM	nd	0.750	nd	>>4.0	nd	0.250	nd	>>2.0	nd	nd
<i>S. tiphymurium</i>	CMI	nd	0.500	nd	nd	nd	0.125	nd	nd	nd	0.5
	CBM	nd	0.750	nd	nd	nd	0.250	nd	nd	nd	1.0
<i>V. cholera Tor</i>	CMI	nd	0.500	nd	nd	2.0	0.250	nd	>2.0	nd	nd
	CBM	nd	0.750	nd	nd	>>2.0	0.250	nd	>>2.0	nd	nd
<i>V. cholera Agua</i>	CMI	nd	0.500	4.0	4.0	nd	0.250	nd	>2.0	nd	nd
	CBM	nd	0.750	>>4.0	>>4.0	nd	0.500	nd	>>2.0	nd	nd
<i>V. cholera cc</i>	CMI	nd	0.500	nd	4.0	2.0	0.250	nd	>2.0	nd	nd
	CBM	nd	0.750	nd	>>4.0	>>2.0	0.500	nd	>>2.0	nd	nd
<i>Y. erolitica CUSI</i>	CMI	nd	0.062	4.0	4.0	2.0	nd	0.75	>2.0	>2.0	nd
	CBM	nd	0.125	>>4.0	>>4.0	>>2.0	nd	1.00	>>2.0	>>2.0	nd
<i>Y. enterolitica HA</i>	CMI	nd	0.500	nd	nd	2.0	0.250	nd	nd	nd	nd
	CBM	nd	0.750	nd	nd	>>2.0	0.500	nd	nd	nd	nd

Simbología. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Salmonella tiphymurium* ATCC 194, *Vch Tor: Vibrio cholerae* CDC V12, *Vch agua: Vibrio cholerae* INDRE 206, *Vch cc: Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Yersinia enterocolitic*, *Yersinia enterocolitica* aisladas de casos clínicos. > Mayor a la concentración. >> Mucho mayor a la concentración. nd no determinada

Cuadro 7. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) sobre levaduras

Cepas	mg/mL	α - pineno	β - pineno	Eugenol	Mirceno	Limoneno	Carvacrol	Salicilato de metilo	Timol
<i>C. albicans</i> ATCC 14065	CMI	0.50	nd	0.250	2.0	2.0	0.030	>2.0	0.125
	CFM	0.75	nd	0.500	3.0	>2.0	0.062	>>2.0	0.250
<i>C. albicans</i> CUSI	CMI	nd	0.50	0.125	2.0	2.0	0.030	>2.0	0.030
	CFM	nd	1.00	0.500	3.0	>2.0	0.062	>>2.0	0.0625
<i>C. albicans</i> cc	CMI	0.50	1.50	0.250	2.0	2.0	0.030	nd	0.250
	CFM	0.75	2.00	0.500	4.0	>2.0	0.062	nd	0.500
<i>C. glabrata</i>	CMI	nd	2.00	0.250	2.0	2.0	0.062	>2.0	0.125
	CFM	nd	>2.0	0.500	3.0	>2.0	0.125	>>2.0	0.250
<i>C. tropicalis</i>	CMI	nd	4.00	0.250	3.0	2.0	0.030	nd	0.125
	CFM	nd	>4.0	0.500	4.0	>2.0	0.062	nd	0.250
<i>C. tropicalis</i> cc	CMI	0.50	nd	0.250	1.0	2.0	0.030	nd	0.250
	CFM	2.00	nd	0.500	2.0	>2.0	0.062	nd	0.500
<i>C. albicans</i> 17 MR	CMI	nd	nd	0.250	2.0	2.0	0.030	>2.0	0.125
	CFM	nd	nd	0.500	3.0	>2.0	0.062	>>2.0	0.250
<i>C. albicans</i> 18 MR	CMI	nd	nd	0.250	4.0	2.0	0.030	nd	0.125
	CFM	nd	nd	0.500	>4	>2	0.062	nd	0.250

Simbología *Candida albicans* ATCC 14065, *Candida albicans* CUSI aislada de un caso clínico, *Candida albicans* caso clínico, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* aisladas de casos clínicos, *Candida albicans* 17 y 18 multi resistentes. > Mayor a la concentración. >> Mucho mayor a la concentración. nd no determinada.

Los compuestos carvacrol y eugenol presentaron las concentraciones mínimas inhibitorias más pequeñas para las bacterias Gram positivas (cuadro 5), al igual para las bacterias Gram negativas (cuadro 6). Es decir; se requieren concentraciones muy bajas para inhibir drásticamente el crecimiento bacteriano, partiendo de 0.03 mg/mL a 0.75 mg/mL. Los compuestos α -pineno y β -pineno presentaron las concentraciones mayores a 4 mg/mL, siendo los más altos para las Gram positivas y siendo el ocimeno para las Gram negativas que requieren mayor concentración para inhibir su crecimiento.

Los compuestos carvacrol, eugenol y timol presentaron las concentraciones mínimas inhibitorias más bajas en levaduras (cuadro 7), es decir; se requieren concentraciones muy bajas (de 0.062 mg/mL a 0.25 mg/mL) para inhibir drásticamente el crecimiento de las poblaciones desafiadas. Los demás compuestos que llegaron a presentar actividad obtuvieron concentraciones mayores o iguales a 2 mg/mL.

Con respecto a las CBM al igual que en CMI, el eugenol y carvacrol presentaron las concentraciones más bajas para las bacterias Gram positivas (cuadro 5) y para las bacterias Gram negativas (cuadro 6) siendo las concentraciones de 0.062 mg/mL a 0.75 mg/mL, El salicilato de metilo presentó concentraciones mayores a 2 mg/mL. Los compuestos ocimeno y mirceno presentaron concentraciones mucho mayores a 4 mg/mL. Es decir requieren esas concentraciones para poder eliminar el 99.9% de la población bacteriana.

En cuanto a las levaduras los compuestos eugenol a 0.125 mg/mL, carvacrol a 0.03 g/mL y timol a 0.03 mg/mL fueron los que presentaron las CFM mas activas a concentraciones menores (cuadro 7), es decir requieren concentraciones más bajas para eliminar el 99.9% de la población bacteriana, mirceno presentó las concentraciones bactericidas más grandes a concentraciones de 4.0 mg/mL.

Efecto del aceite sobre la curva de crecimiento bacteriano

Una vez establecidos los parámetros de CMI, CBM y CFM se procedió a determinar el efecto de los compuestos con mayor actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de una bacteria Gram positiva (*S. aureus* 75 MR) una Gram negativa (*E. coli* 128 M R) y un hongo levaduriforme (*C. albicans* CUSI), para los diferentes compuestos eugenol, carvacrol y timol. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras: En las figuras 4 (*E. coli* 128 MR), 5 (*S. aureus* 75MR) y 6 (*C. albicans* CUSI) se muestra el efecto del eugenol. En las figuras 7 (*E. coli* 128 MR), 8 (*S. aureus* 75MR) y 9 (*C. albicans* CUSI) el efecto del carvacrol y finalmente las figuras 10 (*E. coli* 128 MR), 11 (*S. aureus* 75MR) y 12 (*C. albicans* CUSI) el efecto del timol.

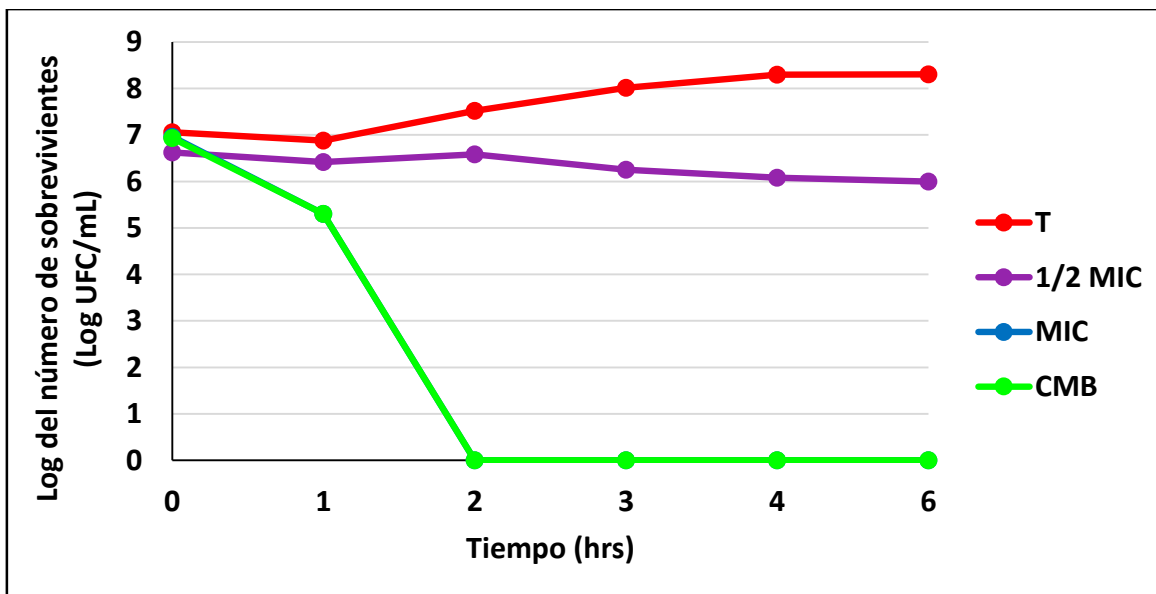


Figura 4. Efecto del eugenol sobre la curva de crecimiento de *E. coli*. Las concentraciones empleadas fueron: 0.125 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.25 mg/mL (MIC) y 0.5 mg/mL (CMB), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

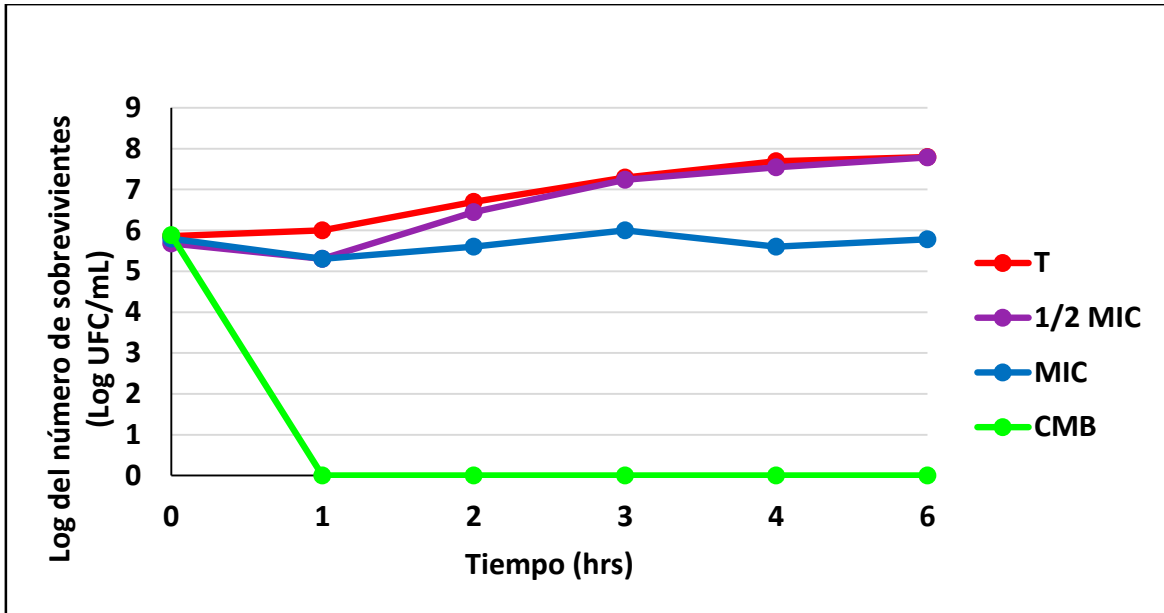


Figura 5. Efecto del eugenol sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* 75MR. Las concentraciones empleadas fueron: 0.25 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.5 mg/mL (MIC) y 1.0 mg/mL (CMB), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

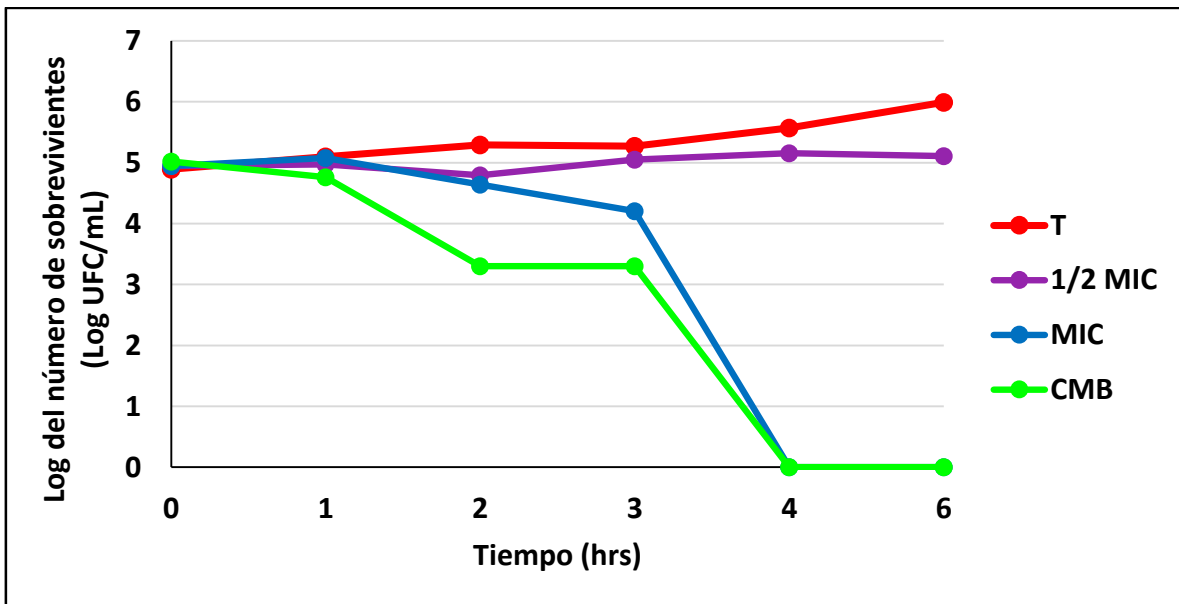


Figura 6. Efecto del eugenol sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* CUSI. Las concentraciones empleadas fueron: 0.125 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.25mg/mL (MIC) y 0.5 mg/mL (CFM), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

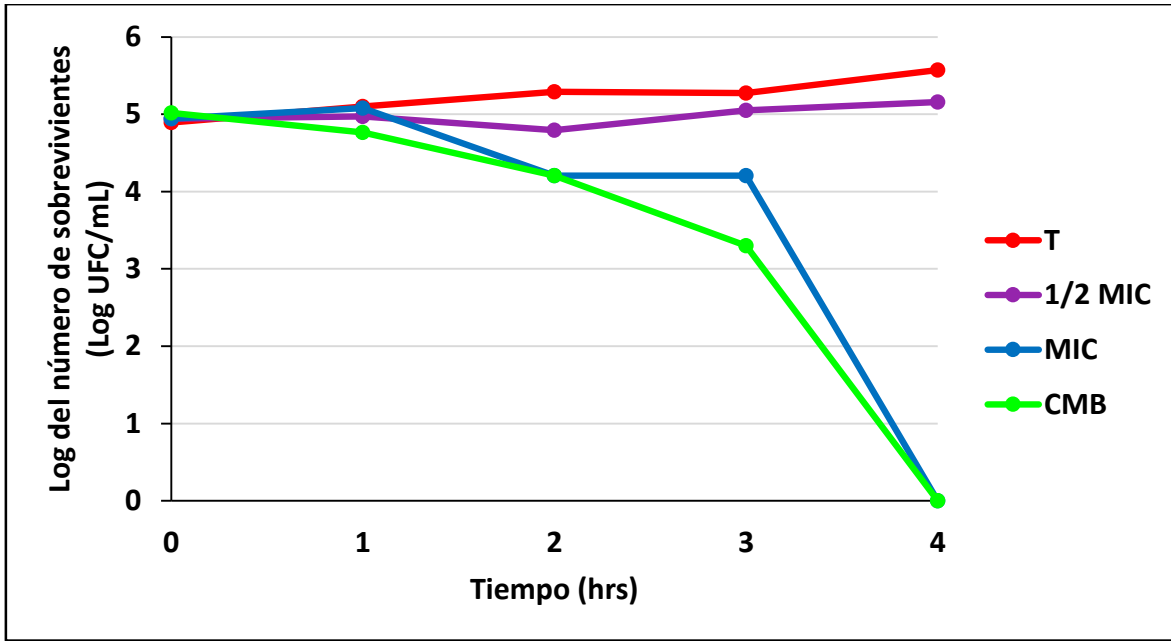


Figura 7. Efecto del carvacrol sobre la curva de crecimiento de *E. coli*. Las concentraciones empleadas fueron: 0.062 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.125 mg/mL (MIC) y 0.25 mg/mL (CBM), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

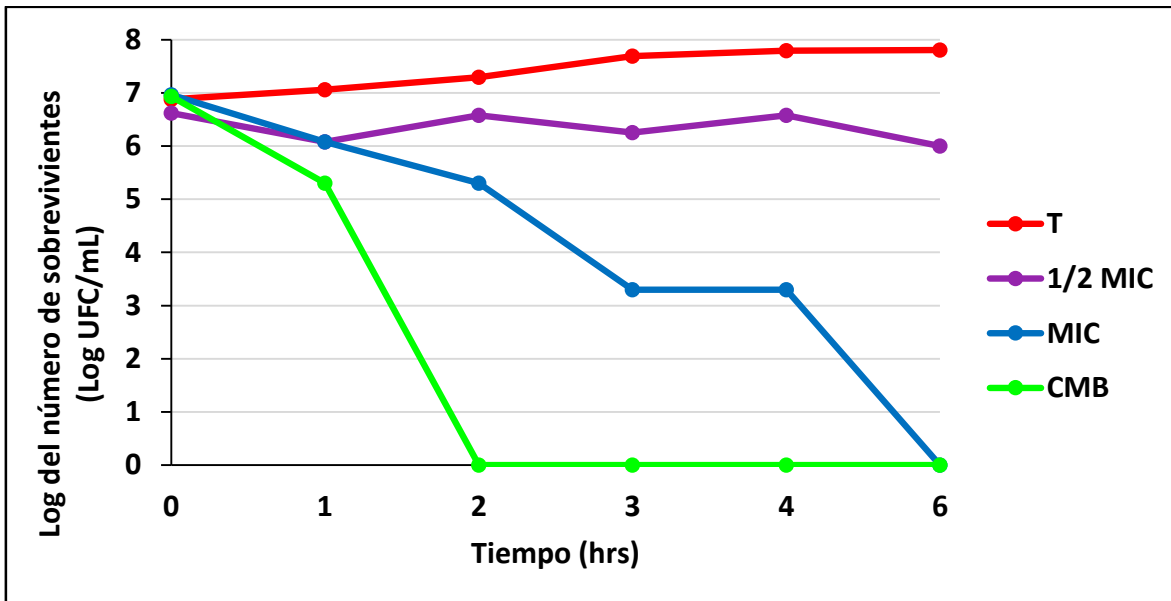


Figura 8. Efecto del carvacrol sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* 75MR. Las concentraciones empleadas fueron: 0.062 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.125 mg/mL (MIC) y 0.25 mg/mL (CBM), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

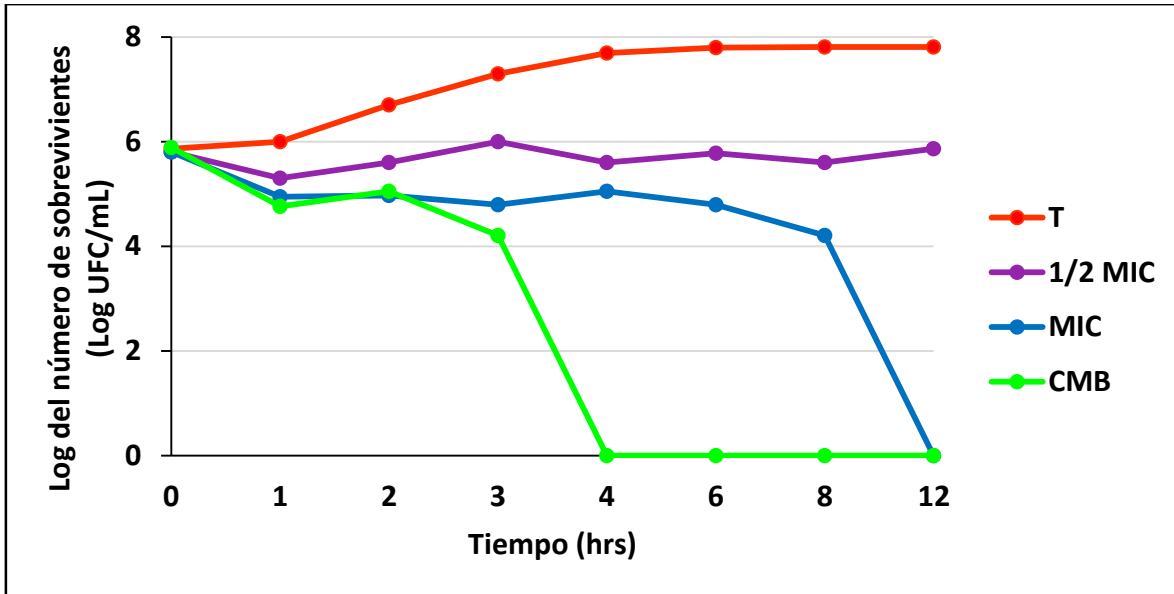


Figura 9. Efecto del carvacrol sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* CUSI. Las concentraciones empleadas fueron: 0.01 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.03mg/mL (MIC) y 0.062 mg/mL (CFM), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

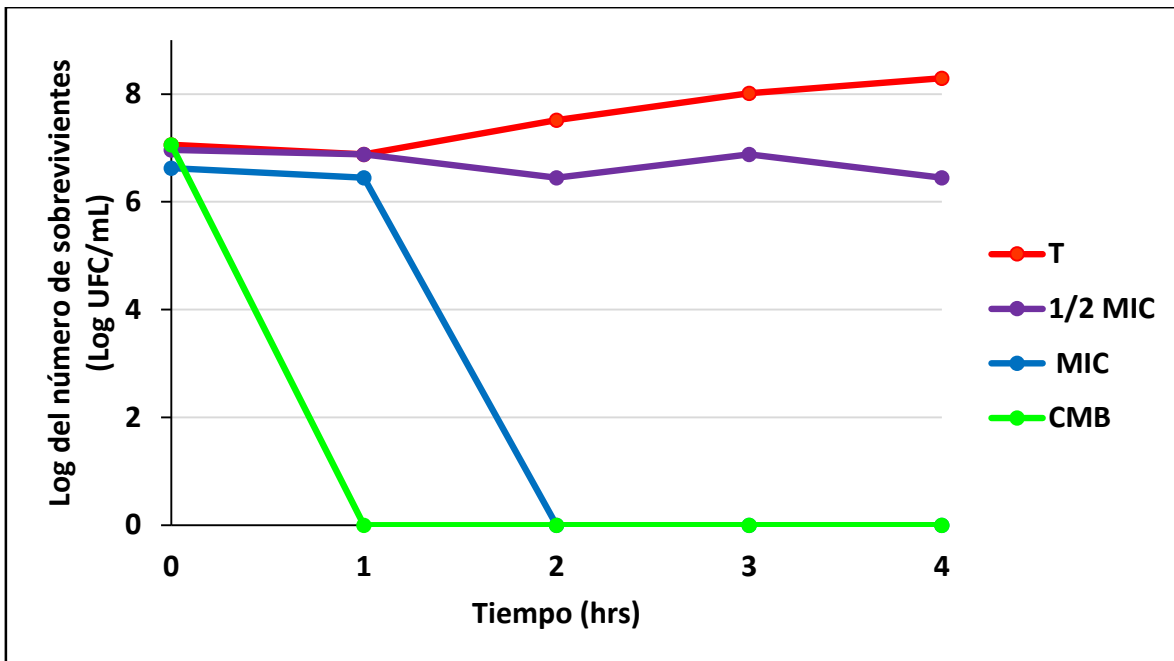


Figura 10. Efecto del timol sobre la curva de crecimiento de *E. coli*. Las concentraciones empleadas fueron: 0.125 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.25 mg/mL (MIC) y 0.5 mg/mL (CBM), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

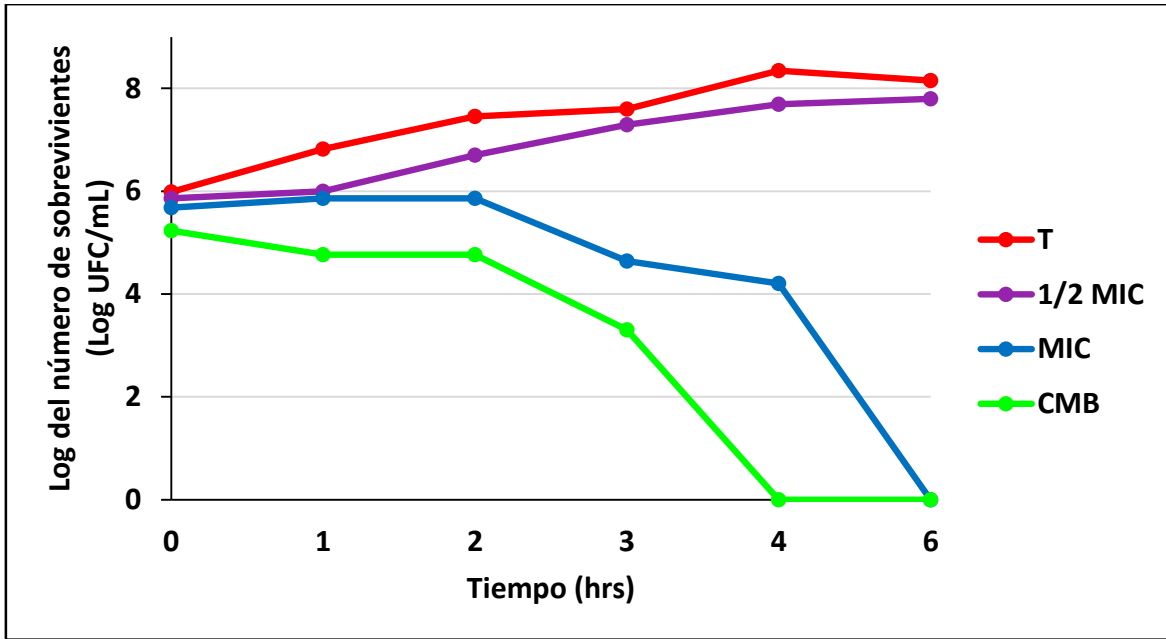


Figura 11. Efecto del timol sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* 75MR. Las concentraciones empleadas fueron: 0.25 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.5 mg/mL (MIC) y 1.0 mg/mL (CBM), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

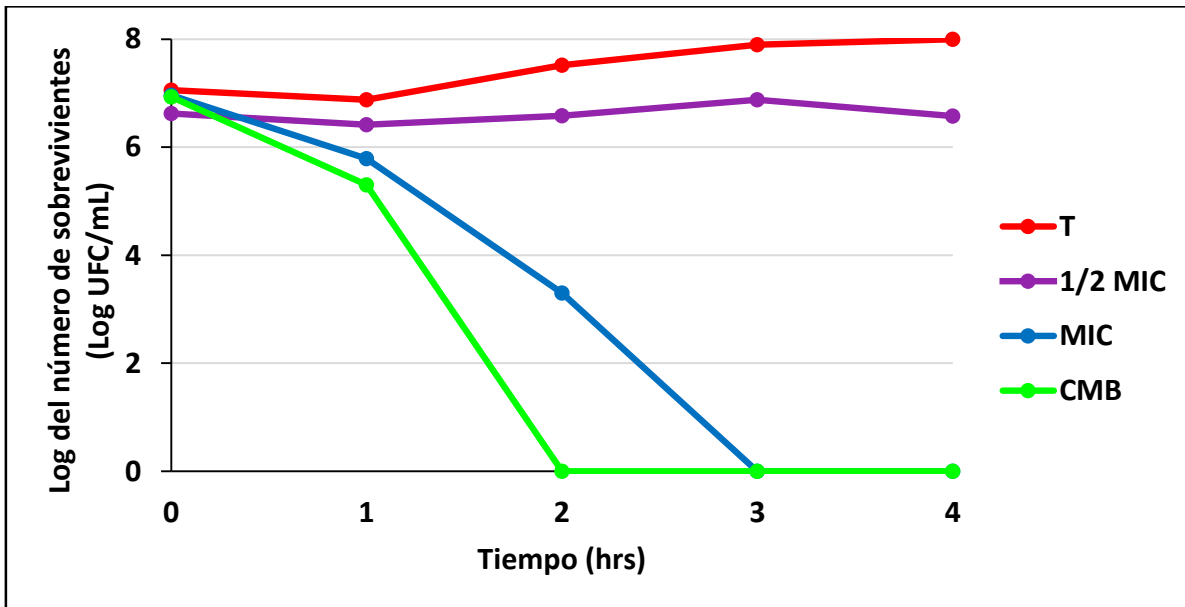


Figura 12. Efecto del timol sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* CUSI. Las concentraciones empleadas fueron: 0.01 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.03mg/mL (MIC) y 0.062 mg/mL (CFM), el tubo control no contenía compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Como se muestra en las figuras los compuestos carvacrol y timol presentaron un comportamiento bactericida o fungicida sobre las curvas de crecimiento bacterianas y levaduriformes a dosis iguales o mayores a CMI.

Para el compuesto eugenol en la población bacteriana de *S. aureus* 75MR se observó un efecto bacteriostático a concentraciones iguales o menores a CMI y un efecto bactericida a concentraciones mayores o iguales a CBM a la primera hora de exposición. Para las poblaciones de *E. coli* 128 MR y *C. albicans* se observó un efecto bactericida o fungicida a concentraciones iguales o mayores a MIC a las 2 hrs y 4 hrs respectivamente (figuras 4, 5 y 6).

El carvacrol inhibió completamente el crecimiento bacteriano a las 4 hrs para la cepa de *E. coli* 128 MR, para *S. aureus* 75MR la inhibición del crecimiento se presentó a las 2 hrs y para la cepa levaduriforme de *C. albicans* CUSI a las 4 hrs (figuras 7, 8 y 9).

El compuesto timol inhibió completamente el crecimiento bacteriano a la primera hora de exposición para *E. coli* 128 MR, mientras que para *S. aureus* 75MR fue a las 4 hrs y para la cepa de *C. albicans* CUSI la inhibición se presentó a las 2 hrs (figuras 10, 11 y 12).

Se puede decir que estos compuestos son buenos agentes antimicrobianos ya que a diferentes concentraciones interrumpen el crecimiento de una población bacteriana de *E. coli* 128 MR (Gram negativa), *S. aureus* 75MR (Gram positiva) y *C. albicans* CUSI (cepa levaduriforme) .

DISCUSIÓN

De acuerdo al presente trabajo, los resultados muestran que se puede validar el uso de las plantas y sus aceites esenciales utilizadas en la medicina tradicional del valle de Tehuacan- Cuicatlan Puebla, ya que varios compuestos presentan actividad tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas y levaduras. Los compuestos estudiados son moléculas lipofílicas que tienen la capacidad de interactuar con las membranas citoplasmáticas bacterianas y levaduras, y por ende pueden provocar su inestabilidad principalmente por el aumento de la permeabilidad de la membrana (Juven et al., 1994; Dorman y Deans, 2000; Guynot et al., 2003).

Los compuestos eugenol, carvacrol y timol presentaron la mayor actividad tanto en bacterias Gram positivas y Gram negativas al igual que en levaduras. Aunque la mayoría de los investigadores informan que las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas cuando se utilizan diferentes aceites esenciales (Marino et al., 2001; Pintore et al., 2002). Algunos autores mencionan que la sensibilidad de las Gram negativas a los diferentes componentes de los aceites esenciales se debe a que éstas presentan una membrana externa de lipopolisacáridos restringiendo la difusión a compuestos hidrofóbicos (Vaara, 1992). Al realizar el análisis estadístico se observó que no existen diferencias significativas entre los compuestos y los diferentes grupos de microorganismos (bacterias y levaduras) indicando que los compuestos presentes en los aceites esenciales pueden actuar.

Las diferencias estructurales entre las moléculas de los compuestos también son causa de las diferentes actividades observadas, ya que algunos compuestos presentaron mayor actividad y otros menor o nula en los diferentes grupos de microorganismos. En los compuestos: mirceno (7-metil-3-metilen-1,6-octadieno) y ocimeno (3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno) que se diferencian en la posición de un doble enlace (C-3), causando que uno presente actividad sobre las levaduras (mirceno) y el otro no (ocimeno). También se observó o al igual que el carvacrol y

el timol que la diferencia entre ellos es la posición de un grupo OH que en el timol se encuentra en posición *orto* mientras que en el carvacrol se encuentra en posición *meta*. Provocando de esta manera el deterioro de sistemas enzimáticos al unirse a los sitios activos de las enzimas responsables de la producción de energía y síntesis de componentes estructurales o a la destrucción o inactividad de material genético (Farag et al., 1989; Kim et al., 1995). El timol y carvacrol son lipófilicos y pueden entrar entre las cadenas de ácidos grasos que componen las bicapas de lípidos de la membrana, alterando la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares. En el caso de las levaduras compuestos como el carvacrol pueden afectar a la regulación y el funcionamiento de enzimas de la membrana que catalizan la síntesis de una serie de importantes componentes de polisacáridos de la pared celular, tales como β -glucanos, quitina y manano, por tanto, el crecimiento celular y la morfogénesis (Braga et al., 2007).

En cuanto a la sensibilidad de las cepas bacterianas a los diferentes compuestos se observó que las cepas Gram positivas fueron más sensible al carvacrol presentando los valores de MIC más bajos (0.03 – 0.125 mg/mL), seguidos de Eugenol (0.25 – 0.75 mg/mL) y por último el carvacrol (0.25 – 1.0 mg/mL). Las cepas bacterianas Gram negativas también fueron más sensibles al carvacrol presentando los valores de MIC más bajos (0.06 – 0.25 mg/mL), seguidos de Eugenol (0.06 – 0.5 mg/mL) y por último el carvacrol (0.25 – 0.5 mg/mL).

En cuanto a las cepas levaduriformes a la sensibilidad de a los diferentes compuestos se observó que fueron más sensible al carvacrol presentando los valores de MIC más bajos (0.03 – 0.06 mg/mL), seguidos de carvacrol (0.03 – 0.25 mg/mL) y por último el eugenol (0.125 – 0.25 mg/mL).

En relación a las curvas de crecimiento se observó que el efecto del eugenol, sobre las poblaciones de *E. coli* 128 MR y *C. albicans* CUSI mostró un efecto bactericida y fungicida a las 2 y 4 hrs respectivamente, a dosis iguales MIC. Para *S. aureus* 75 MR en concentraciones iguales a CBM el efecto observado es bactericida. El carvacrol y timol presentaron un efecto bactericida y fungicida sobre las curvas de crecimiento a dosis iguales o mayores a CMI. Este

comportamiento de las poblaciones bacteriana y fúngicas son característicos de curvas de supervivencia del tipo de impactos múltiples (Davis y Dubelco, 1996). Esto quiere decir que está actuando en varios puntos en la célula, afectando algunas de sus funciones y procesos importantes para su supervivencia.

Se observó en las poblaciones desafiadas, después de una hora de estar en contacto con el compuesto un efecto bacteriostático o fungistático en concentraciones iguales a MIC. Esto permite activar al sistema inmune del huésped y así lograr atacar la infección. Este comportamiento puede variar dependiendo del compuesto al que es sometido, debido a la estructura es diferente y la función que desempeñan en el blanco puede cambiar.

Aunque las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales y sus componentes han sido revisados en el pasado, el mecanismo de la acción no ha sido estudiado con gran detalle (Lambert y Pearson, 2000). Anteriormente se ha informado de que componentes de los aceites esenciales como el timol y carvacrol tienen propiedades antimicrobianas que provocan la disrupción de las membranas en *E. coli* y *S. typhimurium* (Jirovetz et al., 2006). Por otra parte, se demostró que el eugenol tiene la capacidad de desintegración en la membrana y aumentando su permeabilidad, y así provoca la muerte del organismo (Gill y Holly, 2006).

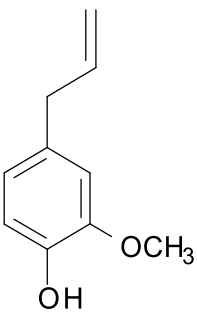
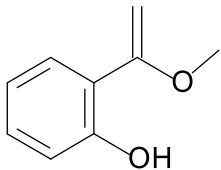
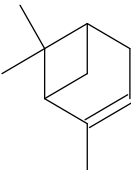
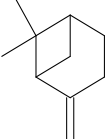
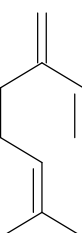
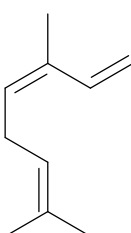
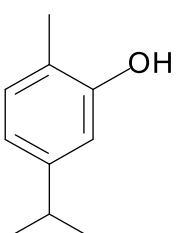
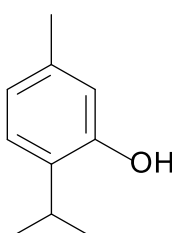
El principal aporte de este trabajo fue comprobar la actividad antimicrobiana de algunos compuestos presentes en los aceites esenciales utilizados en la medicina tradicional, validando su uso en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso que afectan a la población. Al igual de comprobar que los diferentes efectos observados en los aceites esenciales se deben a sus componentes y la concentración en que se encuentren.

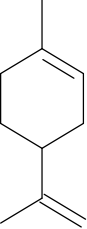
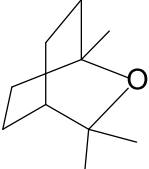
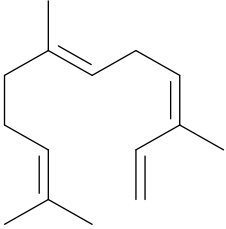
CONCLUSIONES

- Todos los compuestos evaluados mostraron actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.
- No existen diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de los compuestos sobre los diferentes grupos bacterianos y levaduras.
- Los compuestos carvacrol, eugenol y timol fueron los que presentaron una mayor actividad antimicrobiana.
- El carvacrol fue el componente que presentó mayor actividad antibacteriana, seguido del eugenol y timol.
- El carvacrol fue el componente que presentó mayor actividad antifúngica, seguido del timol y por último el eugenol.
- Los compuestos ocimeno, cineol y farneseno no presentaron actividad sobre ninguna cepa levaduriforme.
- eugenol, timol y carvacrol tienen un efecto bactericida a concentraciones iguales o mayores a MIC para los compuestos

APÉNDICES

APÉNDICE I. Estructura química de los diferentes compuestos empleados

Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
Eugenol		Salicilato de metilo	
α -pineno		β -pineno	
Mirceno		Ocimeno	
Carvacrol		Timol	

Limoneno		Cineol	
Farneseno			

APÉNDICE II. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Vander Berghe y Vlietnick, 1991).

El medio de cultivo utilizado en esta técnica es el agar Mueller-Hinton, debido a que con este se realizan pruebas de susceptibilidad y promueve una alta capacidad en el desarrollo de numerosos microorganismos, además de que se debe observar que esté presente una solidez y espesor adecuado en la caja para el buen desarrollo de las bacterias.

En el caso del inóculo el procedimiento que se lleva a cabo es por medio de un asa de siembra estéril, con la cual se tocan las superficies convexas de las colonias (de 4 a 5 aprox.) a usar fijándose que estas presenten una apariencia semejante a los organismos a ensayar. Después de obtener los microorganismos se sumerge el asa en el caldo Mueller-Hinton, descargando todo el material y enjuagando muy bien el asa en el líquido, una vez retirado el material se saca el asa. Posteriormente se pone a incubar el tubo del cultivo a una temperatura de 37°C durante aproximadamente 24 h, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/mL. En caso de que la suspensión de organismos sea más turbia que el estándar, se le agrega solución salina al 0.9% hasta igualarlas.

Posteriormente se sumerge un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana, tratando de retirar el exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente se siembra 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 se colocan en cada una de las zonas de la superficie del agar (en el cual ya se encuentra la bacteria) a una distancia de 22 a 25 mm. entre ellos y a 14 mm del borde de la caja utilizando una pinza estéril; los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la pinza, tratando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Posteriormente se toma la cantidad del compuesto a evaluar la actividad (4 µL) y se agrega el aceite al sensidisco tratando de cuidar que la punta de la micropipeta toque solo el

sensidisco y este lo absorba, haciéndose de manera cuidadosa y rápida para que el compuesto no se volatilice.

Como control positivo se usan sensidiscos con un antibiótico sintético (Cloramfenicol 25 µg) en el cual se evalúan las cepas experimentales, se realiza impregnando los sensidiscos con la solución y dejándolos en la campana esteril a temperatura ambiente a que la solución se evapore, posteriormente se colocan los sensidiscos en la superficie del agar con una pinza esteril (en la cual ya se encuentra la bacteria) a una distancia igual a la mencionada, presionando los sensidiscos suavemente.

Una vez que las cajas con agar estén ya preparadas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36 - 37°C, sin mayor tensión de CO₂ (esto es importante ya que el CO₂ puede formar ácido carbónico en la superficie húmeda del agar, provocando un descenso en el pH, por lo cual el desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual puede provocar una estrechez en la inhibición) durante 24 horas.

Interpretación de resultados.

En este caso las zonas de inhibición se miden con una regla calibrada en mm, y se realizan las pruebas por triplicado, y los valores obtenidos se promedian y reportan en mm.

**APÉNDICE III. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).
Método modificado de dilución en agar (Koneman, 1991).**

Preparación de reactivos y diluciones.

La solución antimicrobiana se prepara diluyendo el compuesto en el agar Mueller-Hinton cuidando que esté no se encuentre demasiado caliente y el aceite se evapore. Se toma rápidamente el compuesto (concentraciones a utilizar: 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125, 0.062 0.03 y .001 mg/mL del compuesto y se agrega al agar, disolviéndolo perfectamente para que ambos se distribuyan uniformemente. Después se agrega la solución rápidamente a la caja petri, se tapa y se deja solidificar. Una vez que ya se haya solidificado el agar y se encuentre a temperatura ambiente, se prepara un inóculo que contenga 10^5 UFC/ml (unidades formadoras de colonia/mL) y se siembra por la técnica de punteo. Posteriormente las cajas se incuban a 36 - 37 °C 24 horas. Cada bioensayo se realiza por triplicado.

Interpretación de resultados. La menor concentración del antimicrobiano que produce una inhibición drástica del desarrollo representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), mientras que en donde no crece es la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

APÉNDICE IV. Efecto del compuesto sobre la curva de crecimiento bacteriano (Avila, 1996).

Preparación y rotulación de un tubo con 10 ml de caldo Mueller-Hinton por cada concentración problema a utilizar ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM) y por cepa. Una vez marcado cada tubo se agrega el inóculo con aproximadamente 1×10^6 UFC/mL (100 μ L) y posteriormente se le agrega la concentración de aceite esencial rápido y cuidadosamente para que este no se volatilice y se mezcle perfectamente. Después se pasa a tubos eppendorf con una cantidad de aproximadamente de 600 μ L, se tapan perfectamente y se ponen a incubar a 37°C.

Con la muestra restante del tubo se toman 50 μ L y se siembra en la caja, se agita suavemente y posteriormente se toman otros 50 μ L de la solución y se diluyen en 5 mL de solución salina al 8 % (dilución 1), agitando nuevamente se toman 50 μ L de muestra y se siembran, de esta solución (dilución 1) se toman otros 50 μ L y se vuelven a diluir en solución salina (dilución 2) y se repite el procedimiento, a partir de esta muestra se comienza el tiempo cero y se sigue el mismo procedimiento para todos los tiempos. Se prepara y rotula otro tubo sin antídoto que sirve como testigo del desarrollo. El inóculo se prepara con aproximadamente 1×10^6 bacterias/mL en un tubo de ensayo con caldo Mueller-Hinton y se repite el mismo procedimiento. Muestrear cada dos horas durante los primeros 4 tiempos (T_0-0 , T_1-1 , T_2-2 , T_3-3 , T_4-4) (Tiempo-Horas transcurridas), a partir del tiempo 5 se muestrea cada 2 horas, hasta completar 12 horas y por ultimo a las 24 horas Se realizan diluciones para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo, una vez incubadas durante 24 horas a 37°C.

Se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de la "y" contra tiempo de incubación en el eje de las "X". Para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la población bacteriana, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas.

BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez., P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. pp. 1-20.

Avila, J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purepecha. Tesis Maestría en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 111 pp.

Belda A. y Bellod F. J. 2006. Plantas medicinales de la sierra de Mariola. Publicaciones de la Universidad de Alicante. España. 46 pp.

Betancourt, A. S. y Gutiérrez, D. M. A. 1999. Proyecto Mercados Verdes Herbolarios. Informe técnico final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología Y Desarrollo de Tlaxcala y Puebla A.C. México, D.F. 250 pp.

Bornes, J., Anderson y L. Philipson, P. 2004. Plantas Medicinales. Pharma Editores México. 21-23 pp.

Braga P. C., Dal Sasso M., Culici M. y Alfieri M. 2007. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia* 78:396–400.

Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. España. 594 pp.

Candelaria S., Serrano R., Avila M., Meraz S., Orozco J., Peña C. J., García-Bores A. M., Avila J. G., Peñalosa I. y Hernandez T. 2015 Chemical Composition and Antimicrobial activity of *Gymnolaena oaxacana* (Greenm.) Rydb. (Asteraceae) Essential Oil. Journal of Plant Sciences. 3(4): 241-247

Croteau, R., Kutchan, T.M. y Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). American Society of Plants Physiologists. 1250- 1268 pp.

Cseke L. J., Kiratosyan A. y Kaufman P. B., Warber S. L., Duke J. A., Breilmann H. L. 2006. Natural Products from plants 2ed Taylor & Francis. 553 pp.

Davis B. D. y Dulbecco R. 1996. Tratado de Microbiología. 4º ed. Ed. Salvat.

Dey, P. M. y Harbone, J. B. 1991. Methods in plant Biochemistry. Terpenoids. Volume 7. Academic Press. London, UK. 565 pp.

Domínguez, S., X, A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. 281 pp.

Dorman, H. J. D., Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88:308-316.

Durán, D. A., Vargas, V. A. y Cisneros, C. A. E. 2004. Bioestadística. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 220 pp.

Eisenreich, W., Rohdich, F. y Bacher, A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends of Plant Science 6:78-84.

Espinosa-García, F. J. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. En: Anaya A. L., F. J. Espinosa-García, R. Cruz-

Ortega, (Coordinadores). Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas en su aplicación. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología. Plaza y Valdés. México D. F 2312-249 pp.

Evans W.C. 1991. Farmacognosia Trease-Evans. 13 Ed., Interamericana S.A y Mc Graw Hill, México DF. P 1-15.

Farag R. S., Daw, Z. Y., Hewedid, F. M. y El-Baroty, G. S. A. 1989. Antimicrobial activity of some egyptyan specie essential oils. Journal Food Protection 52, 665-667.

García de Alba G. J. E., Ramírez, H. B. C., Robles A. G., Zañudo H. J., Salcedo R. A. L. y García de Alba V. J. E. 2012. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. Desacatos. 39: 29-44.

Gill, A. O. y Holly, R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. International Journal of Food Microbiology 108, 1–9.

Guarda A., Rubilar J. F., Miltz J. y Galotto M. J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. International Journal of Food Microbiology 146:144–150.

Guynot, M. E., Ramos, A. J. Setó, L., Purroy, P. Sanchis, V. y Marín, S. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. Journal of Applied Microbiology. 94:893-899.

Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A y Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants use in

traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México), Journal of Ethnopharmacology. 88:181-188.

Hernández, T., Canales, M. Avila, J. G., García, A M., Caballero, J., Romo de Vivar, A. y Lira, R. 2005. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). Journal of Ethnopharmacology. 96(3): 551-554.

Hernández, T., Canales, M., Terán, B, Avila, O., Duran, A., García, A.M., Hernández, H., Angeles-López, O., Fernández-Araiza, M. y Avila, J.G. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). Journal of Ethnopharmacology. 111: 137-141.

Hernández, T., Canales, M. Avila, J. G., García, A.M., Meraz, S. y Duran, A. 2008. Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* Desf. And *Lippia graveolens* H.B.K. of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. 7(4): 203-207.

Hernández, T., Canales, M. Avila, J. G., García, A. M., Caballero, J., Romo de Vivar, A. y Lira, R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* HBK. (Verbenaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 8 (4):295-300.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2013. Sistema de Cuentas Nacionales de México: Cuenta satélite del sector salud de México 2008-2011. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.-- México : INEGI, 3. 413 pp.

Jiménez S. G., Ducoing P. H. y Sosa R. M., 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana Fitopatología. (21) 3:355-365.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A. y Schmidt, E., 2006. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54, 6303–6307.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F. y Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituent. *Journal of Applied Bacteriology* 76:626-631.

Koneman E.W. 1991. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Panamericana. México DF, pp. 386-393.

Kim, J., Marshall, M. R. y Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:2839-2845.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. y Nychas, G. J. E. 2001 A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology* 91, 453–462.

Marino, M., Bersani, C. y Comi, G., 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67, 187–195.

Organización Mundial de la Salud: OMS. 2002. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. OMS. Hong Kong SAR, China. 75 pp.

Ortega R., J, J. 2005. *Experto en Fitoterapia. Las plantas medicinales y sus beneficios, contradicciones e interacciones*. Ed Formación Alcalá. España. 335 pp.

Osuna, L., Mapia, M. y Aguilar A. 2005, *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar infecciones gastrointestinales: Estudio*

etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Ed Universitat de Barcelona. España. 173 pp.

Pandima D. K., Arif N. S., Sakthivel R. y Karutha P. S. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130:107–115.

Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R. y Casanova, J. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 15–19.

Rio, P., Lucena, F. Alonso, J., Casamitjam, N. y Granada, E. 2006. Fitoterapia con Plantas M.edicinales.1-5.

Sánchez. M. E., Turina. A. V., Garcia. D. A. Nolan. M. V. y Perillo. M. A. 2004. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces* 34:77–86.

Sieniawskaa E., Losb R., Baja T, Malmb A. y Glowniak K. 2013. Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and α -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilmcultures. *Industrial Crops and Products* 51:152– 157.

Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of outer membrane. *Microbiological Reviews*. 56(3): 395-411.

Van der Berghe, D. A, y Vlietink, A.J 1991. Screening methods for bacterial agents from hogher plantas. In: Hosteman, K. Ed *Methods in Plants Biochemistry*. Vol. 6 *Assy for Bioactivity*. 46-69 pp.