



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Cordia curassavica* (Jacq) Roemer y Schultes: Boraginaceae (Barredor) EN DOS  
ZONAS DEL VALLE DE TEHUACÁN CUICATLÁN, PUEBLA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**MAYRA DEYRA HERNÁNDEZ MONTOYA**

**BAJO LA ASESORÍA Y DIRECCIÓN DE: Dra. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO.**



**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO**





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.

**DEDICATORIAS.**

*A mis padres por su apoyo, dedicación y comprensión, por su lucha y sacrificios, pero en especial por su amor incondicional.*

*A mis hermanas por ser la luz de mi vida.*

*A Marisol y Sahara que se adelantaron en el camino, pero que siempre están en mis pensamientos.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero expresar un enorme agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo y muy especialmente:

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado mi directora de tesis, por confiar en mi, por todo este tiempo de trabajo juntas, por lo aprendido, por su paciencia, por su apoyo para que todo saliera adelante y sobre todo por brindarme su amistad.

A mis sinodales la Dra. Margarita Canales Martínez por su apoyo, consejos y su gran entusiasmo, a la M. en C. Ana María García Bores por sus valiosos conocimientos, al M. En C. Luis Barbo Hernández Portilla y al Dr. Rafael Lira Saade por sus enseñanzas.

Al M. En C. Ángel Durán Díaz por su colaboración.

A mis padres Tere y Martín, por su fuerza y valores humanos, por hacer de mí una mejor persona y a mis hermanas Bianca y Melissa por su cariño, su amistad y sus porras.

A los amigos y compañeros: A ti Edi por estar siempre a mi lado, por saber escuchar, por tu cariño y amistad a lo largo de todo este tiempo, por sacar de mí siempre una sonrisa.

A David mi gran amigo, por tantos momentos felices, por tantos años de amistad y apoyo.

A Jesús y en especial a Fernando un equipo que nunca olvidare, sin duda marcaron una parte importante de mi vida en Iztacala.

A mis amigas Paty, Sujey y Jimena por estar a mi lado en los peores y mejores momentos, por escucharme y aconsejarme, por su paciencia infinita, por la felicidad y el cariño que me han dado.

A Moni, Yazmín y Oso por su fuerza, por enseñarme a no rendirme y seguir luchando a pesar de todo.

A Memo, Axel y Ricardo por hacerme sonreír, por todos los buenos momentos.

A mis compañeros de laboratorio, a Rocío por sus valores y sencillez, a Julieta, a Karla y en especial a Jimena, Angélica y Gabriel por todos los increíbles momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, y los que quedan por compartir.....

Quizás me olvide de muchas personas que han ayudado en todo este tiempo, para ellas va también este agradecimiento.

Este trabajo fue apoyado por:

Proyecto Plantas útiles de San Rafael Coxcatlán (MGU/Useful Plants Project México)  
Royal Botanical Gardens Kew.

UNAM-PAPCA 2007-2008.

CONACyT proyecto 102591

**ÍNDICE GENERAL**

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS PARTICULARES.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	11
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	38
PERSPECTIVAS.....	39
APÉNDICES.....	40
APÉNDICE 1. Descripción de la planta.....	40
APÉNDICE 2. Área de estudio.....	42
APÉNDICE 3. Extracción por arrastre de vapor de aceites esenciales.....	44
APÉNDICE 4. Análisis en Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	45
APÉNDICE 5. Método de difusión en agar de Kirby- Baüer.....	46
APÉNDICE 6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM).....	48
APÉNDICE 7. Curva letal.....	49
APÉNDICE 8. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos.....	50
APÉNDICE 9. Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos.....	51
APÉNDICE 10. Espectros de masas de los componentes del aceite	

esencial de <i>Cordia curassavica</i> .....	52
REFERENCIAS.....	80

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Estudios realizados para el género de <i>Cordia</i> .....	4
Cuadro 2.	Datos generales de la especie .....	11
Cuadro 3.	Rendimiento del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> . .....	12
Cuadro 4.	Composición porcentual del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> ....	16
Cuadro 5.	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> ...	22
Cuadro 6.	Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> .....	24
Cuadro 7.	Inhibición cualitativa del crecimiento radial del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> .....	27
Cuadro 8.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> de la zona de Zapotitlán Salinas .....	28
Cuadro 9.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> de la zona de San Rafael (Época de sequía) ....	28
Cuadro 10.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> de la zona de San Rafael (Época de lluvia) ....	29
Cuadro 11.	Comparación de las pendientes del porcentaje de inhibición del crecimiento radial en San Rafael (Época de sequía y lluvia) y Zapotitlán .....	32
Cuadro 12.	Concentración fúngica al 25% (CF <sub>25</sub> ) y concentración fúngica Mínima (CFM) .....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cromatograma del aceite esencial de <i>C. cuarassavica</i> de la época de sequía en San Rafael .....	13
Figura 2.	Cromatograma del aceite esencial de <i>C. cuarassavica</i> de la época de lluvia en San Rafael.....	13
Figura 3.	Cromatograma del aceite esencial de <i>C. cuarassavica</i> de la época de lluvia en Zapotitlán Salinas.....	14
Figura 4.	Actividad antibacteriana del aceite esencial <i>C. curassavica</i> sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	23
Figura 5.	Efecto del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> colectada en época de sequía en San Rafael sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i> ...	25
Figura 6.	Efecto del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> colectada en época de lluvia en San Rafael sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i> ....	25
Figura 7.	Efecto del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> colectada en época de sequía en San Rafael sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> cc.....	26
Figura 8.	Efecto del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> colectada en época de lluvia en San Rafael sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> cc...	26
Figura 9.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>C. curassavica</i> sobre <i>Aspergillus niger</i> .....	30
Figura 10.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>C. curassavica</i> sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	30
Figura 11.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>C. curassavica</i> sobre <i>Fusarium moniliforme</i> .....	31
Figura 12.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>C. curassavica</i> sobre <i>Rhizoctonia solani</i> .....	31
Figura 13.	<i>Cordia curassavica</i> .....	41
Figura 14.	Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla .....	43
Figura 15.	Destilación por arrastre de vapor .....	44

**RESUMEN.**

*Cordia curassavica* es reconocida entre las ocho especies de mayor importancia relativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas en Zapotitlán Salinas, Puebla. La actividad biológica, la composición y concentración de algunos metabolitos secundarios varían dependiendo de las condiciones geográficas o ambientales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variación en la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. curassavica* en dos épocas del año y en dos zonas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla (San Rafael y Zapotitlán Salinas). El aceite esencial se obtuvo mediante la técnica de arrastre de vapor y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se identificaron para la zona de San Rafael, doce compuestos para la época de sequía y diecisiete compuestos para la época de lluvia, de los cuales comparten nueve. Los componentes mayoritarios: 1,7,7-trimetil-triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano (21.66% sequía y 18.83% lluvia), seguido de 1,5-dimetil-8-(1-metiletilideno), (E,E)-5-ciclodecadieno (16.29% sequía y 24.41% lluvia). En contraste a los once compuestos obtenidos en la zona de Zapotitlán Salinas de los que los principales componentes fueron el 4-metil,4-etenil-3-(1-metiletenil)1-(1-metil metanol) ciclohexano (37.34%), seguido de  $\beta$ -eudesmol (19.21%), espatulenol (11.25%); el isocariofileno y selineno fueron los únicos compuestos presentes en ambas zonas (San Rafael sequía, isocariofileno 12.40% y selineno 5.72%, lluvia isocariofileno 8.18% y selineno 2.85% y en Zapotitlán Salinas lluvia, isocariofileno 2.39% y selineno 3.79%). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las diferentes zonas y épocas se evaluó frente a trece cepas bacterianas (4 Gram-positivas y 9 Gram-negativas), una levadura y cuatro hongos filamentosos. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en agar de Kirby Bauer y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) utilizando el método modificado de dilución en caldo. La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de inhibición del crecimiento radial determinándose la concentración fúngica al 25% (CF<sub>25</sub>) y la concentración fungicida mínima (CFM). La actividad entre las dos épocas de San Rafael fue distinta puesto que el aceite de la época de sequía fue activa en 9 de las 13 cepas bacterianas experimentadas, mientras que el aceite de la época de lluvia presentó actividad frente a 4 cepas bacterianas; con respecto a la zona, Zapotitlán presentó actividad en 9 cepas de bacterias. Las cepas más sensibles en las dos épocas de San Rafael y en ambas zonas fueron *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* y *Vibrio cholerae* cc. El aceite esencial no presentó actividad frente a levaduras, pero fue activo en todas las cepas de hongos filamentosos excepto en *Fusarium sporotrichum* en el caso de la zona de San Rafael. La cepa más sensible fue *Rhizoctonia solani* para ambas zonas pero sin llegar a alcanzar el 100% de inhibición en San Rafael. Mediante una prueba de Kruskal-Wallis se determinó que existen diferencias significativas entre el efecto del aceite y las dos zonas de muestreo (época de lluvia San Rafael y Zapotitlán). El aceite de San Rafael Coxcatlán presentó menor efecto antimicrobiano, lo que es interesante ya que su uso es más bien de tipo forrajero, en esta zona. Se confirma que tanto las condiciones ambientales como las temporales de ambas zonas del Valle de Tehuacán Cuicatlán, afectan la composición y concentración de los compuestos presentes en el aceite esencial de *C. curassavica*, reflejándose en la actividad antimicrobiana. Estos resultados justifican el uso tradicional que se le ha dado a *C. curassavica*

**PALABRAS CLAVES:** Aceite esencial, antimicrobiano, *C. curassavica*, medicina tradicional.

## INTRODUCCIÓN.

Según la Organización Mundial de la Salud en la actualidad el 80% de la población mundial, utiliza las plantas como principal remedio medicinal. Sin olvidar que el 25% de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizado a partir de sustancias reportadas en investigaciones fitoquímicas (Berdonces *et al.*, 1995).

El estudio de plantas utilizadas en la medicina tradicional se debe a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades infecciosas (Andriole, 1999). Los cuales son una de las causas principales de mortalidad y morbilidad a nivel mundial (Secretaría de Salud, 2007), puesto que cada vez es más difícil encontrar medicamentos que actúen efectivamente sobre los microorganismos causantes de estas enfermedades (Mesa *et al.*, 2004). Este problema de salud se ha incrementado por la aparición de cepas resistentes, ocasionado principalmente por el uso inadecuado de los antibióticos, (Olarte y Torre, 1959; Zahner y Maas, 1972; De la Cruz, 1986; Donald *et al.*, 1995)

Según las estimaciones más recientes, alrededor del 15% de la riqueza florística mundial (37,000 especies), posee virtudes curativas, por lo que cabe esperar que nuevas y novedosas estructuras químicas de metabolitos secundarios coadyuven al desarrollo de nuevos fármacos (Huerta, 2002).

Los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de metabolitos primarios, entre los que podemos encontrar cumarinas, alcaloides, flavonoides, terpenos, etc. Los terpenos volátiles, que están formados por 2 o 3 unidades de isopreno (monoterpenoides y sesquiterpenoides), en conjunto con otros compuestos de bajo peso molecular forman parte de la compleja naturaleza de los aceites esenciales, presentes en varios órganos de una misma planta, pudiéndose obtener de las hojas, la flor o el fruto (Smith *et al.*, 1998; Kuklinski, 2000; Rios y Recio 2005). Estos compuestos son sintetizados como defensa ante patógenos (virus, bacterias y hongos) y depredadores (insectos y vertebrados), así como para atraer polinizadores (Bruneton, 1991; Morales de Godoy, 1996). Algunos de ellos son responsables del olor y color de numerosas plantas (Domínguez, 1973). También producen efectos beneficiosos para el ser humano, sobre diversos órganos, especialmente en los sentidos, así como en el sistema nervioso. Presentan

propiedades calmantes, relajantes, antisépticas, antifúngicas, antidepresivas, antiespasmódicas o astringentes entre muchas otras (Kuklinski, 2000; Shiva, 2007).

México posee una riqueza biológica considerada entre las más altas del mundo. Esta riqueza biológica esta sustentada en un complejo mosaico geológico, variada topografía y gran variedad de climas, que originaron la enorme diversidad de hábitats. (Gómez, 1985). Dentro de la variada cubierta vegetal, las zonas áridas y semiáridas ocupan el 40% del territorio nacional (Rzedowski, 1978). En la actualidad se reconocen cuatro regiones significativamente diferentes: la zona árida sonoreense, la chihuahuense, la Península de Baja California y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, localizado entre Puebla y Oaxaca (Rzedowski, 1973). Esta última es una de las zonas áridas más importantes de nuestro país, debido a la alta riqueza específica, diversidad biológica y endemismo de diversos grupos de plantas y animales (Dávila *et al.*, 2002), e incluso es reconocida como uno de los centros mundiales de diversidad de plantas (Groombridge, 1992).

Adicionalmente el Valle de Teuhacán-Cuicatlán cuenta con una elevada tradición en el uso de plantas para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Hernández *et al.*, 2003). Lo anterior es de suma importancia ya que cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales de forma que, la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica están tomando un auge insospechado, en la práctica de la medicina complementaria (Beyra *et al.*, 2004).

Actualmente, se han registrado en México alrededor de 4000 especies con propiedades medicinales, las cuales han representado una alternativa para la salud en poblaciones de bajos recursos, aplicándoles en casos de enfermedades gastrointestinales, del aparato urinario, aparato reproductor, sistema nervioso o para tratar un traumatismo, etc. (Huerta, 2002). Un ejemplo de esto es *C. curassavica* (Apéndice 1), que es empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades y en un estudio etnobotánico previo Hernández y colaboradores (2003) reportaron que es reconocida entre las ocho especies de mayor importancia relativa para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán Salinas, Puebla.

Del género *Cordia* y específicamente de *C. curassavica* se han realizado diversos estudios destacando los descritos en el cuadro 1, donde se puede observar que los componentes principales

de *C. curassavica* son  $\beta$ -terpineno,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno, cariofileno, carvacrol,  $\beta$ -eudesmol, espatulenol, biciclogermacreno, entre otros. Encontrándose actividad antibacteriana tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, así como actividad antifúngica sobre *Cladosporium cucumerinum*, *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*, actividad antiinflamatoria y propiedades tóxicas contra larvas del mosquito *Aedes aegypti*.

**Cuadro 1.** Estudios realizados para el género de *Cordia*.

Autores	País	Especie	Parte utilizada	Estudios
Nakamura <i>et al.</i> , 1997	Panamá	<i>C. sapinescens</i>	Hojas	Aislaron dos nuevos triterpenos, 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,25-trihidroxi20(S),24(S)-epoxidammarano y 3 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ ,25-dihidroxi20(S),24(S)-epoxidammarano del extracto metanólico
Ioset <i>et al.</i> , 1998	Panamá	<i>C. linnaei</i>	Raíces	Aislaron 3 meroterpenoides cordioquinona B y un nuevo naftoxireno, siendo el extracto diclorometano activo contra <i>Cladosporium cucumerinum</i> , <i>Candida albicans</i> y larvas de <i>Aedes aegypti</i> .
Harborne y Williams, 2000	Inglaterra	<i>C. verbenacea</i>	Hojas	Encontraron que el flavonol, artemetin(5-hidroxi-3,6,7,30,40-pentametoxiflavona) mostró una marcada actividad antiinflamatoria
Carvalho <i>et al.</i> , 2004	Brasil	<i>C. verbenacea</i> D.C	Partes aéreas	Reportaron que el $\alpha$ -pineno (29,69%), <i>trans</i> -cariofilleno (25,27%) y aloaromadendreno (9,99%), son los principales componentes del aceite esencial y que éstos presentan mayor actividad frente a bacterias Gram-positivas y las levaduras
Coelho de Souza <i>et al.</i> , 2004	Brasil	<i>C. monosperma</i> y <i>C. curassavica</i>		Realizaron un estudio etnofarmacológico y antimicrobiano del extracto metanólico, encontrando que las personas utilizan a <i>C. monosperma</i> como sustituto de <i>C. curassavica</i> , para el tratamiento de enfermedades de la vejiga y uso antiinflamatorio. En el estudio antimicrobiano reportaron que el género <i>Cordia</i> inhibió al menos a un microorganismo.
Aguilar <i>et al.</i> , 1994	México	<i>C. curassavica</i>	Flores y hojas	En un estudio etnobotánico reportan que es utilizada por la gente para tratar padecimientos como el Tifus exantemática, producida por la bacteria <i>Rickettsia prowaseki</i> transmitida por los piojos del cuerpo.
Gómez <i>et al.</i> , 1999	Panamá	<i>C. curassavica</i>		Aislaron como principales componentes del aceite esencial a $\beta$ -terpineno, $\alpha$ -pineno y cariofilleno.

**Cuadro 1.** Estudios realizados para el género de *Cordia*. (Continuación)

Autores	País	Especie	Parte utilizada	Estudios
Ioset <i>et al.</i> , 2000	Panamá	<i>C. curassavica</i>	Raíces	Aislaron dos naftoquinonas meroterpenoides, llamados cordioquininas J y K, demostrando actividad antifúngica sobre <i>Cladosporium cucumerinum</i> , <i>Candida albicans</i> y propiedades tóxicas contra las larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> que transfiere la fiebre amarilla.
Lans <i>et al.</i> , 2000	Trinidad y Tobago	<i>C. curassavica</i>	Hojas	Utilizada para tratar enfermedades de la piel en perros y para el control de ectoparásitos.
Hernández <i>et al.</i> , 2003	México	<i>C. curassavica</i>	Partes aéreas	Utilizada en la medicina tradicional de Zapotitlan Salinas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, el extracto hexánico presentó actividad antibacteriana frente a 13 cepas bacterianas
Avila, 2006	México	<i>C. curassavica</i>	Partes aéreas	Evaluó la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial contra 13 bacterias y 5 cepas de hongos. Siendo <i>Sarcina lutea</i> y <i>Vibrio cholerae</i> las cepas más sensibles, además de <i>Rhizoctonia solani</i> e identifico al 4-metil, 4-etenil-3-(1-metil etenil) -1 - (1-metil-metanol) ciclohexano (37,34%), $\beta$ -eudesmol (19,21%), Espatulenol (11,25%) y cadina 4 (5), 10 (14) dieno (7,93%) como los principales componentes.
Santos <i>et al.</i> , 2006	Brasil	<i>C. curassavica</i>		Encontraron que el $\alpha$ -pineno (20,5%), $\beta$ -pineno (13,1%), (E)-cariofileno (12,4%) y biciclogermacreno (13,8%) son los componentes principales de su aceite esencial, presentando actividad larvicida contra larvas de mosquito <i>Aedes aegypti</i> .
Terán 2006	México	<i>C. curassavica</i>	Partes aéreas	Evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de <i>C. Curassavica</i> , presentando actividad frente a 9 cepas bacterianas, los extractos hexánico y clorofórmico presentaron actividad antifúngica, inhibiendo 4 de las 5 cepas de hongos utilizadas. Se identificó la presencia de carvacrol.
Hernández <i>et al.</i> , 2007	México	<i>C. curassavica</i>	Partes aéreas	Evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos contra 13 bacterias y 5 cepas de hongos. Siendo <i>Sarcina lutea</i> y <i>Vibrio cholerae</i> las cepas más sensibles a los aceites esenciales y <i>Vibrio cholerae</i> para el extracto hexánico. <i>Rhizoctonia solani</i> fue la cepa más sensible al efecto de el aceite esencial y <i>Trichophyton mentagrophytes</i> para el extracto hexánico.

En base a los estudios antes mencionados es notable destacar que *C. curassavica* es una planta a la cual se le han atribuido distintas propiedades medicinales, de la cuál se han identificado distintos componentes como fenoles, monoterpenos, sesquiterpenos, etc., y actividad no solo antimicrobiana, sino también antiinflamatoria y larvicida. Observándose que existen diferencias, tanto en la composición química, como en la actividad biológica de la planta estudiada, lo cual se puede ver influenciado por factores extrínsecos, como la temperatura, humedad, intensidad de luz, estrés hídrico, suministro de nutrientes, entre otros factores que afectan la producción de metabolitos secundarios y su actividad biológica que puede variar, desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano, hasta la acción bactericida o fungicida.

Se calcula que en México y en todo el mundo, la validación química farmacológica y biomédica solo se ha llevado a cabo en 5% del total de especies registradas como medicinales (Huerta, 2002). Debido a esto es importante realizar estudios para evaluar la actividad antimicrobiana de las especies de plantas medicinales en factores ambientales, temporales y espaciales distintos. Además de estudios fitoquímicos para identificar la estructura química de los metabolitos activos presentes en la planta, realizando así una contribución a la validez científica del uso tradicional y devolviendo a la comunidad información válida, puesto que en ocasiones la aplicación sin un aval científico representa un riesgo para la salud humana.

Considerando todo lo anterior, esta investigación se ha enfocado, en estudiar la variación tanto espacial como temporal de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. curassavica* en dos épocas del año en San Rafael con respecto a un estudio realizado en Zapotitlán Salinas, Puebla en el 2006. Pues esta es una manera de detectar las más convenientes y potenciales fuentes de principios activos y materias primas para la elaboración de medicamentos y al mismo tiempo justifica y nos permite revalorar los conocimientos botánicos populares, resultado de una gran herencia cultural.

**OBJETIVO GENERAL.**

- Estudiar la variación espacio-temporal de la composición química y actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Cordia curassavica* (Jacq) Roemer & Schultes: Boraginaceae (Barredor) de San Rafael, Coxcatlán en dos épocas del año y con respecto a lo reportado por Ávila en la zona de Zapotitlán Salinas, Puebla.

**OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Obtener el aceite esencial de *C. curassavica* colectada en dos épocas del año (sequía y lluvia) en San Rafael Coxcatlán, Puebla.
- Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de *C. curassavica*.
- Determinar la concentración fungicida al 25% (CF<sub>25</sub>) y concentración fungicida mínima (CFM) del aceite esencial de *C. curassavica*.
- Identificar los componentes del aceite esencial de *C. curassavica*.
- Comparar la composición del aceite esencial de *C. curassavica* en dos épocas del año (sequía y lluvia) de San Rafael y contra Zapotitlán Salinas.
- Comparar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. curassavica* en dos épocas del año (sequía y lluvia) en San Rafael y contra Zapotitlán Salinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Colecta de la planta.

La planta *C. curassavica* se colectó en dos épocas del año la primera de ellas en temporada de sequía y la segunda en temporada de lluvia (febrero y octubre respectivamente) del 2008, en la localidad de San Rafael, Coxcatlàn, Puebla (Apéndice 2), con número de colecta HCM5.

### 2. Extracción y composición del aceite esencial.

La obtención de los aceites esenciales de las muestras se realizó por medio de la técnica de arrastre de vapor (Domínguez, 1973) (Apéndice 3), determinando su rendimiento en relación al peso de la planta fresca.

La identificación de los compuestos presentes en las muestras del aceite esencial de *C. curassavica* se realizó en el Instituto de Química, UNAM, mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Apéndice 4). Los nombres comunes de los compuestos fueron identificados con base en la información del Phytochemical Dictionary (Harborne and Baxter, 1993).

### 3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

#### ➤ Microorganismos utilizados.

Bacterias.

*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, estas especies fueron donadas por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala. *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC19430, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio cholera* INDRE 206 (aislada de agua contaminada) agua, *V. cholera* aislada de un caso clínico, *V. cholera* No-01, *V. cholera* CDC V 12, las cuales pertenecen al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo inaba, biotipo El Tor.

Levadura.

*Candida albicans* aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala.

Hongos Filamentosos.

*Fusarium sporotrichum* ATCC NRL3299, *Fusarium moniliforme*, *Trichophyton mentagrophytes* (donado por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO de la FES Iztacala), *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112, *Aspergillus niger* CDBB-H-179, *Rhizoctonia solani* donada por el INIFAP, Celaya, México, *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306

### 3.1. Evaluación de la actividad antibacteriana.

#### ➤ Evaluación cualitativa.

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se realizó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991). Se impregnaron sensidiscos con 5µl de aceite esencial. Como control positivo se utilizó cloramfenicol (25 µg por disco). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 5).

#### ➤ Evaluación cuantitativa.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) utilizando el método modificado de dilución en agar (Avila, 1996). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 3.0, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 y 0.062 mg/ml del aceite; realizándose por triplicado cada bioensayo (Apéndice 6).

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

La determinación del efecto del aceite esencial sobre las curvas de crecimiento bacteriano se realizó de acuerdo al método propuesto por Kubo *et al.*, 1993, (Apéndice 7). Tomando

como criterio la sensibilidad frente al aceite esencial y la importancia médica de las cepas bacterianas, se eligió una cepa Gram positiva y una Gram negativa para determinar el efecto del aceite esencial sobre las curvas de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. Cholerae* cc, sensible en las dos épocas del año en San Rafael.

### 3.2. Evaluación de la actividad antifúngica.

#### ➤ Evaluación cualitativa.

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica se realizó mediante el método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se impregnaron sensidiscos con 5 µl de aceite esencial; como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Ketoconazol (25 µg por disco), realizándose todos los bioensayos por triplicado (Apéndice 8).

#### ➤ Evaluación cuantitativa.

Se determinó la concentración fúngica 25% (CF<sub>25</sub>) y la concentración fúngica mínima (CFM) con el método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) en cajas de 24 pozos. Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 2.00, 1.50, 1.00, 0.50, 0.25 y 0.125 mg/ml. Realizándose cada bioensayo por triplicado (Apéndice 9).

## 4. Pruebas estadísticas.

A los resultados obtenidos de los bioensayos de la actividad antibacteriana se les realizó un análisis de Kruskal-Wallis (Durán *et al.*, 2004) en donde los factores fueron: bacterias, zonas y época; mientras que para la actividad antifúngica se realizó un análisis de regresión lineal de la concentración del aceite esencial contra inhibición del crecimiento radial, para cada especie, posteriormente mediante una prueba de T se compararon las pendientes del efecto entre especies, zona y época. Para la comparación espacial se tomaron en cuenta los datos de la época de lluvia de San Rafael contra la época de lluvia de Zapotitlán.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 1. Colecta de la planta.

La planta *C. curassavica* se colectó durante dos épocas del año (sequía y lluvia) del 2008 en la localidad de San Rafael, Puebla. Los datos generales se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Datos generales de la especie estudiada.

Familia	Boraginaceae
Nombre científico	<i>Cordia curassavica</i>
Nombre común	Barredor
Número de colecta	HCM5
Parte utilizada	Parte aérea
Uso	Medicinal (como infusión en Zapotitlán salinas). Forrajera (en San Rafael)
Colector	Héctor Cervantes M

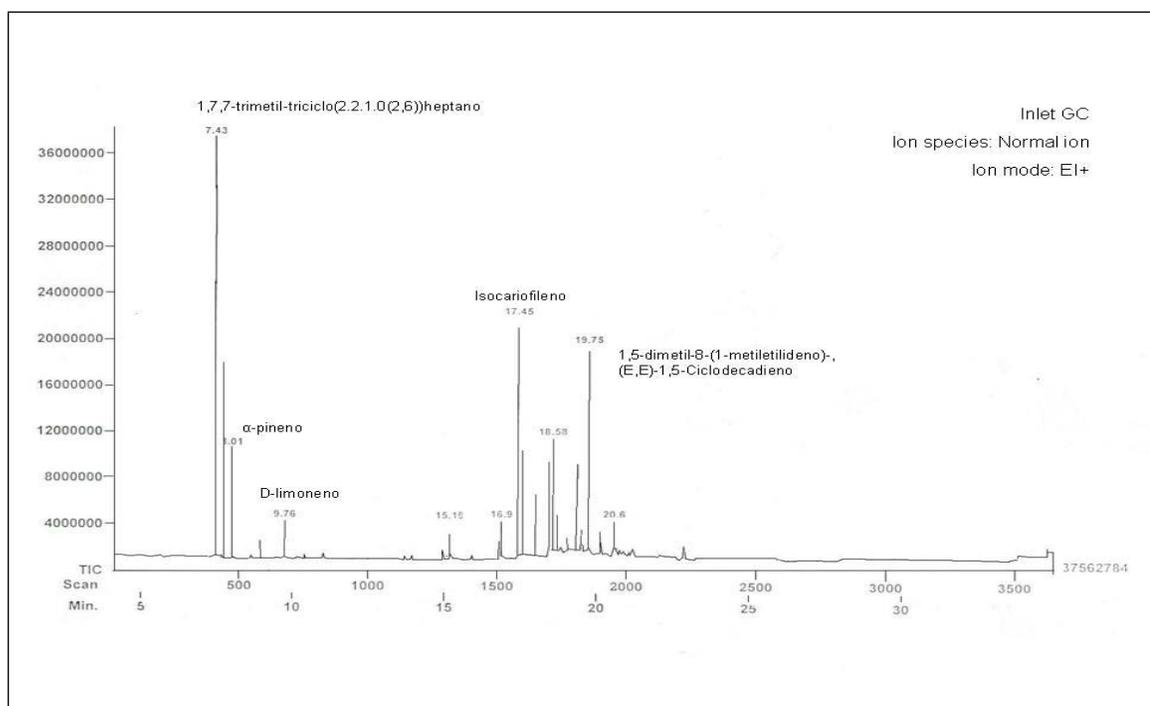
### 2. Extracción y composición química del aceite esencial.

El rendimiento obtenido de la extracción del aceite esencial de *C. curassavica* a partir de 1 kg de planta se muestra en el cuadro 3. Como se puede observar, el rendimiento del aceite esencial colectado en la zona de San Rafael fue mayor en la época de sequía que en la época de lluvia. Aunado a lo anterior el rendimiento obtenido por Ávila en la zona de Zapotitlán Salinas fue mayor con respecto a lo obtenido en San Rafael.

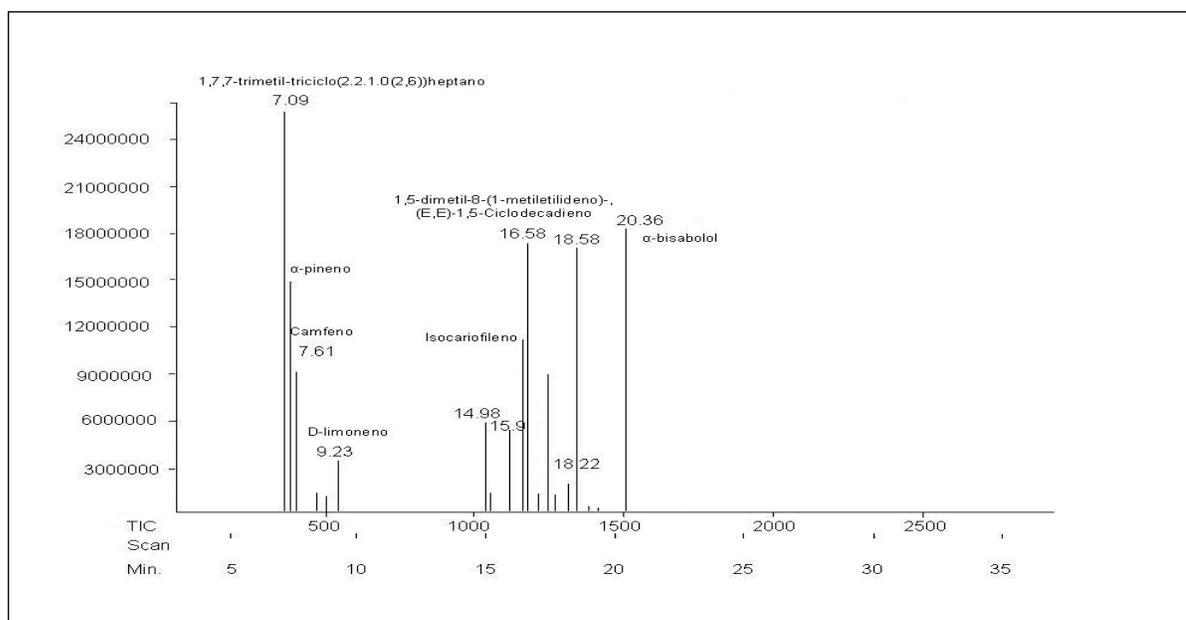
**Cuadro 3.** Rendimiento del aceite esencial de *C. curassavica*.

<b>Zona</b>	<b>Época</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Densidad (gr/ml)</b>
<b>San Rafael</b>	Sequía	0.3491	0.86
	Lluvia	0.1839	0.78
<b>Zapotitlán Salinas (Ávila, 2006)</b>	Lluvia	0.4091	0.98

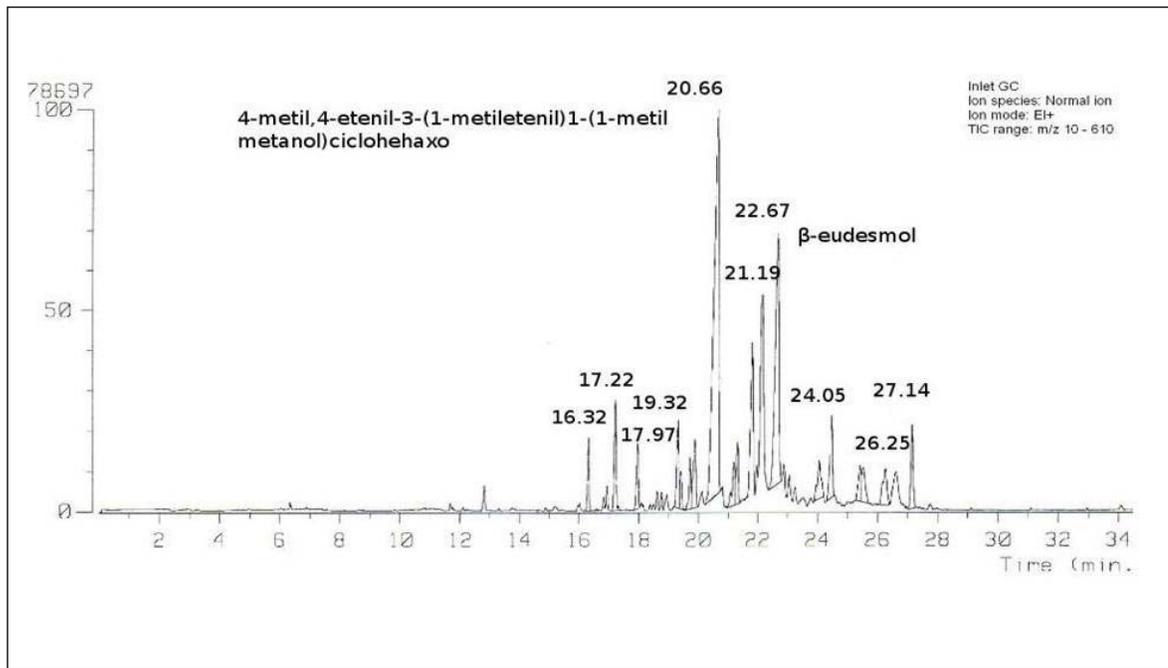
Mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se obtuvieron diferentes cromatogramas para el aceite de la época de sequía (Figura 1) y lluvia (Figura 2) de la zona de San Rafael y la de Zapotitlán (Figura 3). De acuerdo al tiempo de retención y por sus patrones de fragmentación se identificaron para la zona de San Rafael, doce compuestos (81.98%) para la época de sequía y 17 compuestos (95.43%) para la época de lluvia, en contraste a los 11 compuestos (96.28%) obtenidos en la zona de Zapotitlán Salinas. Cabe mencionar que solo el isocariofileno y selineno son los únicos compuestos presentes en ambas épocas y zonas. Por otro lado los aceites que se obtuvieron de las plantas de San Rafael en las dos épocas de colecta comparten 9 compuestos (Cuadro 4, apéndice 10).



**Figura 1.** Cromatograma del aceite esencial de *C. cuarassavica* de la época de sequía de San Rafael.



**Figura 2.** Cromatograma del aceite esencial de *C. cuarassavica* de la época de lluvia en San Rafael.



**Figura 3.** Cromatograma del aceite esencial de *C. cuarassavica* de la época de lluvia en Zapotitlan Salinas (Ávila, 2006).

En el cuadro 4 se muestran los componentes de los aceites esenciales obtenidos en las épocas de sequía y lluvia de la Zona de San Rafael y los componentes de la época de lluvia en la zona de Zapotitlán. Se observa que los componentes principales para la zona de San Rafael en la época de sequía fueron: 1,7,7-trimetil-triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano (20.30%), seguido de 1,5-dimetil-8-(1metiletilideno),(E,E)-5-ciclododecadieno, (16.29%) e isocariofileno (12.40%) y para la época de lluvia 1,5-dimetil-8-(1metiletilideno),(E,E)-5-ciclododecadieno (24.41%), seguido por 1,7,7-trimetil-triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano (18.83%) y  $\alpha$ -pineno (10.52%).

En contraste los componentes mayoritarios para la zona de Zapotitlán Salinas fueron: 4-metil,4-etenil-3-(1-metil etenil)1-(1-metil metanol)ciclohexano (37.34%), seguido de  $\beta$ -eudesmol (19.21%), espatulenol (11.25%).

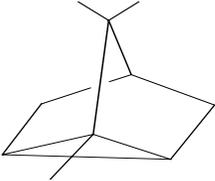
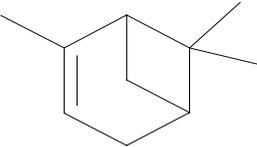
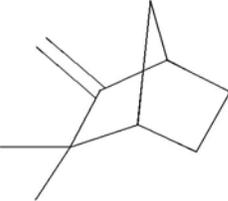
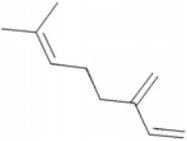
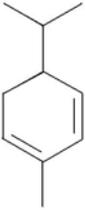
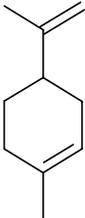
Cabe destacar que solo isocariofileno y selineno son los únicos compuestos presentes en ambas épocas y zonas (San Rafael sequía 12.40% y 5.72%, lluvia 8.18% y 2.85% y en Zapotitlán Salinas 2.39% y 3.79% respectivamente).

Los aceites esenciales obtenidos de *C. curassavica* en las dos épocas en San Rafael comparten 9 compuestos: 1,5-dimetil-8-(1-metiletilideno),(E,E)-5-ciclododecadieno (16.29% sequía y 24.41% lluvia); 1,7,7-trimetil-triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano (21.66% sequía y 18.83% lluvia),  $\alpha$ -pineno (10.18% sequía y 10.52% lluvia); isocariofileno (12.40% sequía y 8.18% lluvia);  $\beta$ -cubebeno (5.18% sequía y 6.49% lluvia); 1-etil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-, (1S-(1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ )-ciclohexano (1.85% sequía y 3.90% lluvia); selineno (6.11% sequía y 2.85% lluvia) y D-limoneno (2.04% sequía y 1.17% lluvia).

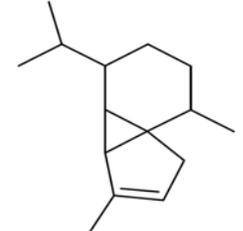
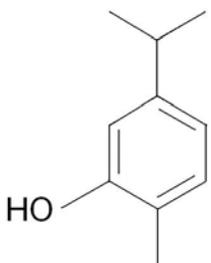
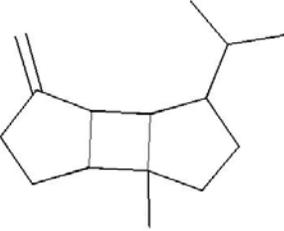
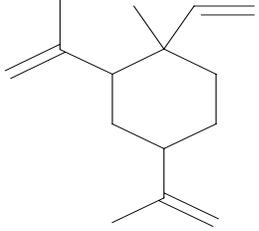
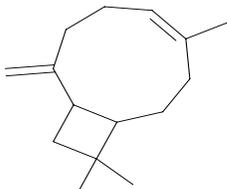
Del 81.98% de los componentes identificados para la época de sequía del aceite esencial obtenido de las muestras de *C. curassavica* en San Rafael el 41.0 % corresponde a monoterpenos y el 59.0 % sesquiterpenos, mientras que para la época de lluvia en donde se logró identificar el 95.43 % de los componentes el 45.0 % corresponden a monoterpenos y el 55.0 % a sesquiterpenos. Lo anterior muestra que para ambas épocas el aceite se encuentra conformado en una mayor proporción por sesquiterpenos.

Para la zona de Zapotitlán, en donde se logró identificar el 96.28 % de los componentes, no se identificaron monoterpenos, siendo los sesquiterpenos los componentes mayoritarios (93.0 %) y solo el 3.0 % correspondió a diterpenos (Cuadro 4).

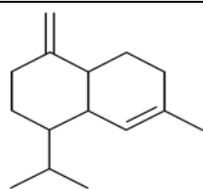
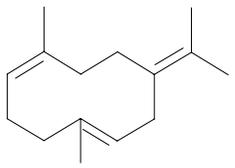
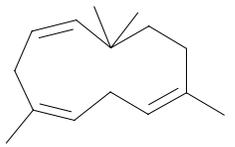
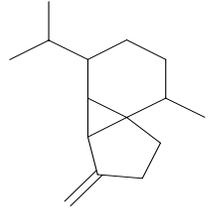
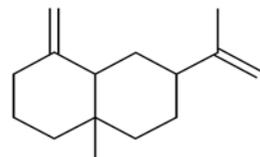
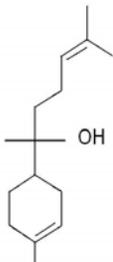
**Cuadro 4.** Composición porcentual de los aceites esenciales de *C. curassavica*.

Compuesto	Estructura	%		
		San Rafael Sequía	Lluvia	Zapotitlán Salinas Lluvia
1,7,7-trimetil- tricyclo(2.2.1.0(2,6)) heptano		20.3	18.83	---
A-pineno		9.53	10.52	---
Camfeno		---	6.75	---
A-mirceno		---	0.91	---
A-felandreno		---	0.91	--
D-limoneno		1.90	1.17	---

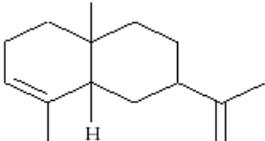
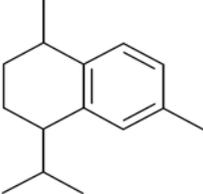
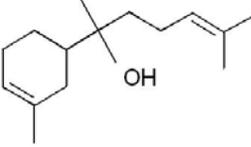
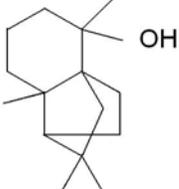
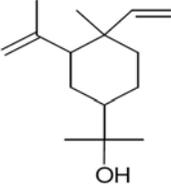
**Cuadro 4.** Composición porcentual de los aceites esenciales de *C. curassavica* (continuación).

Compuesto	Estructura	%		
		San Rafael		Zapotitlán Salinas (Ávila 2006)
		Sequía	Lluvia	Lluvia
$\alpha$ -cubebeno		---	1.17	2.22
Carvacrol		1.90	---	---
decahidro-3a-metil-6-metileno-1-(1-metiletil)-, (1S-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,3 $\beta$ , $\alpha$ , $\beta$ )ciclobuta[1,2,3,4]diclo-penteno		---	1.30	---
1-etnil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-, (1S-(1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ )ciclohexano		1.90	3.90	---
Isocarofileno		12.40	8.18	2.39

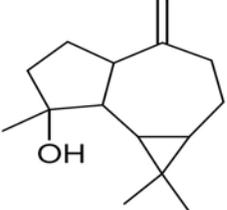
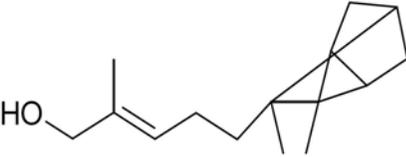
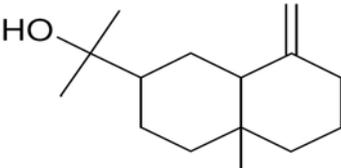
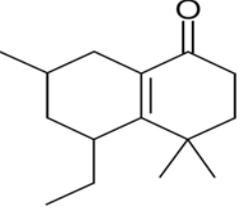
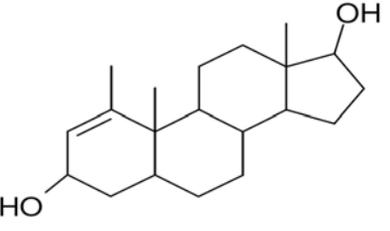
**Cuadro 4.** Composición porcentual de los aceites esenciales de *C. curassavica* (continuación).

Compuesto	Estructura	%		
		San Rafael Sequía	San Rafael Lluvia	Zapotitlán Salinas (Ávila 2006) Lluvia
Cadina		---	---	7.93
1,5-dimetil-8-(1-metiletilideno)-, (E,E)-1,5-Ciclodecadieno		16.29	24.41	---
Humuleno		3.12	0.91	---
$\beta$ -cubebeno		4.85	6.49	---
Selineno		5.72	2.85	3.79
$\alpha$ ,4-dimetil- $\alpha$ -(4-metil-3-pentenil)-, (R-(R*,R*))-3-ciclohexano-1-metanol		---	1.43	---

**Cuadro 4.** Composición porcentual de los aceites esenciales de *C. curassavica* (continuación).

Compuesto	Estructura	%		
		San Rafael		Zapotitlán Salinas (Ávila 2006)
		Sequía	Lluvia	Lluvia
2-isopropenil-4a,8-dimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno		2.25	---	---
Calameneno		---	---	3.72
$\alpha$ -bisabolol		---	1.42	---
Octahidro-2,2,4,7a-tetrametil-1,3a-etanol(1H)inden-4-ol		1.82	--	---
4-metil,4-etenil-3-(1-metil etenil)1-(1-metil metanol)ciclohexano		----	---	37.34

**Cuadro 4.** Composición porcentual de los aceites esenciales de *C. curassavica* (continuación).

Compuesto	Estructura	%		
		San Rafael	Zapotitlán Salinas (Ávila 2006)	
		Sequía	Lluvia	Lluvia
Espatulenol		---	---	11.25
5-(2,3-dimetiltriciclo 2.2.1.0 <sup>2,6</sup> hept-3-y1)-2-metil-2-penten-1-ol		---	---	2.48
$\beta$ -eudesmol		---	---	19.21
Hexahidro-2,5,5-trimetil-2H-2,4a-etanonaftalen-8(5H)-ona		---	---	2.90
1-metil-(3 $\beta$ .,5 $\alpha$ .,17 $\beta$ )-androst-1-ene-3,17-diol		---	---	3.05
Total		81.98	95.43	96.28

### 3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

#### 3.1. Evaluación de la actividad antibacteriana.

➤ Evaluación cualitativa.

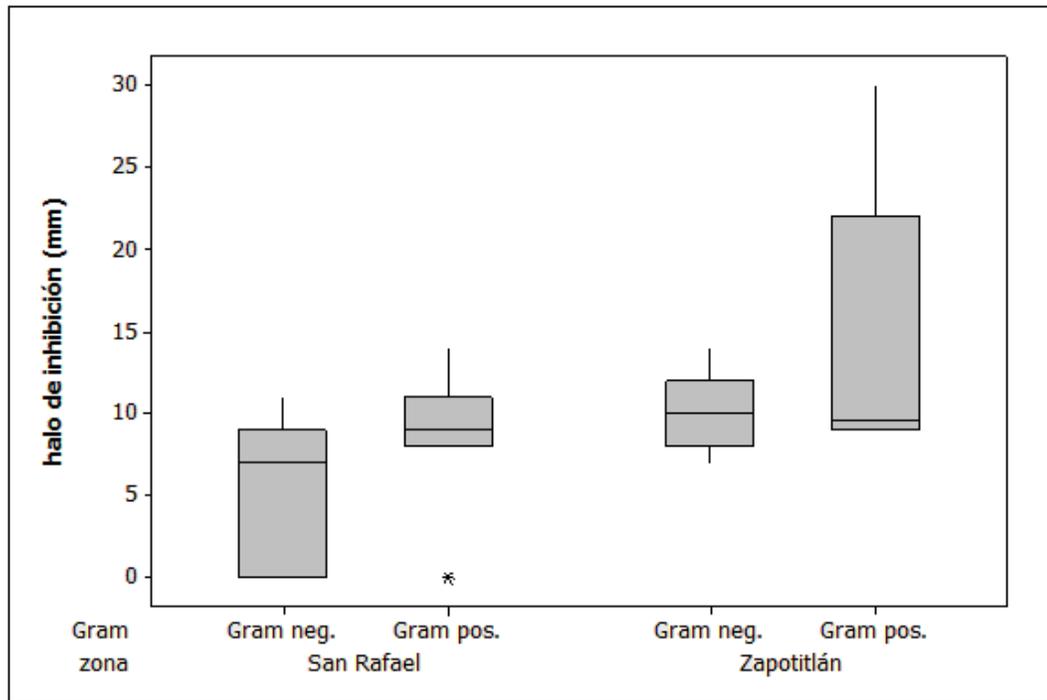
Como se puede observar en el cuadro 5, la actividad observada en las épocas de sequía y lluvia de San Rafael fue significativamente distinta siendo que la época de sequía presentó actividad en 9 de las 13 cepas experimentadas, *S. lutea* y *B. subtilis* fueron las cepas que tienen un halo de inhibición mayor; el aceite obtenido en la época de lluvia presentó actividad frente a 4 cepas; siendo *B. subtilis* y *Vibrio cholerae* cc las cepas con un halo de inhibición más grande. Con respecto a la zona, Zapotitlan presentó actividad frente a 9 cepas, de las cuales *S.lutea*, *V. cholera* cc y *V. cholerae* Tor fueron las que presentaron los mayores halos. Las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* y *Vibrio cholerae* cc presentaron halos de inhibición en las dos épocas y en ambas zonas. En la figura 4 se puede observar la actividad antibacteriana del aceite esencial en las dos zonas y en ambas épocas.

Mediante una prueba de Kruskal-Wallis se determinó que existen diferencias significativas entre el efecto del aceite y las tres épocas de muestreo ( $P= 0.001$ ), lo que quiere decir que la actividad del aceite depende de la época y zona en que se colecte. En la comparación temporal existen diferencias significativas entre las épocas de sequía y lluvia en San Rafael ( $P=0.0082$ ) y con respecto a la comparación espacial existen diferencias significativas ( $P= 0.0004$ ) entre San Rafael (época de lluvia) con Zapotitlán (época de lluvia).

**Cuadro 5.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. curassavica*.

Bacteria	Halo de inhibición (mm)			
	Cloramfenicol	Aceite Esencial <i>C. curassavica</i>		
		San Rafael		Zapotitlán Salinas
		Época de sequía	Época de lluvia	Época de lluvia Ávila 2006
<i>S. a.</i>	24.00±0.82	9.33±0.58	9.33±0.58	9.00±0.50
<i>S. e.</i>	24.00±0.82	8.33±0.58	8.00±0.00	10.00±0.50
<i>S. l.</i>	34.00±0.82	13.33±1.20	Na	27.33±1.89
<i>B. s.</i>	28.00±1.63	10.33±0.58	11.67±0.58	9.00±0.50
<i>S. t.</i>	28.00±1.63	Na	Na	Na
<i>Y. e.</i>	25.67±0.47	Na	Na	Na
<i>Vch agua</i>	35.00±0.50	7.00±0.00	Na	7.00±0.50
<i>Vch No 01</i>	35.00±0.50	8.33±1.15	Na	9.67±0.47
<i>Vch. Tor</i>	22.67±0.47	8.00±0.00	Na	11.33±0.47
<i>Vch. cc</i>	21.67±1.70	9.33±0.58	10.67±0.58	13.33±0.47
<i>E. ag.</i>	19.67±0.47	Na	Na	Na
<i>E. ae.</i>	19.33±0.47	Na	Na	Na
<i>E. c.</i>	21.67±1.70	8.33±0.58	Na	8.00±0.50

Simbología: *S.a.*, *Staphylococcus aureus*; *S.e.*, *Staphylococcus epidermidis*; *S.l.*, *Sarcina lutea*; *B.s.*, *Bacillus subtilis*; *S. t.*, *Salmonella typhi*; *Y. e.*, *Yersinia enterocolitica*; *V.ch.agua*, *Vibrio cholerae* aislada de agua contaminada; *V.ch. No-01*, *Vibrio cholerae*; *V.ch.Tor*, *Vibrio cholerae* CDC V12; *V.ch.cc*, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico; *E. ag.*, *Enterobacter agglomerans*; *E. ae.*, *Enterobacter aerogenes*; *E. c.*, *Escherichia coli*. Na. no presentó actividad.



**Figura 4.** Actividad antibacteriana del aceite esencial *C. curassavica* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En cuanto al tamaño del halo de inhibición con respecto al grupo bacteriano (Gram positivas y Gram negativas) se muestra que para ambas zonas no hay diferencias significativas (figura 4).

Pero para las épocas de lluvia y sequía si existen diferencias significativas ( $P=0.0011$ ) en cuanto al tamaño del halo de inhibición (Cuadro 4).

➤ Evaluación cuantitativa.

En la determinación de la CMI y CBM (cuadro 6), la cepa más sensible fue *V. cholerae* cc para las dos zonas pero requirió diferentes concentraciones de aceite esencial para inhibir su crecimiento: CMI= 0.037 mg/ml y CMI=0.062 mg/ml para San Rafael (lluvia) y Zapotitlán Salinas respectivamente. Mientras que para las épocas de sequía y lluvia en San Rafael las cepas más sensibles fueron *V. cholerae* cc requiriendo concentraciones de

de CMI= 0.037 mg/ml y CMI= 0.125 mg/ml (época de lluvia y época de sequía respectivamente) y *S. epidermidis* CMI= 1 mg/ml y CMI= 0.75 mg/ml (época de lluvia y época de sequía respectivamente).

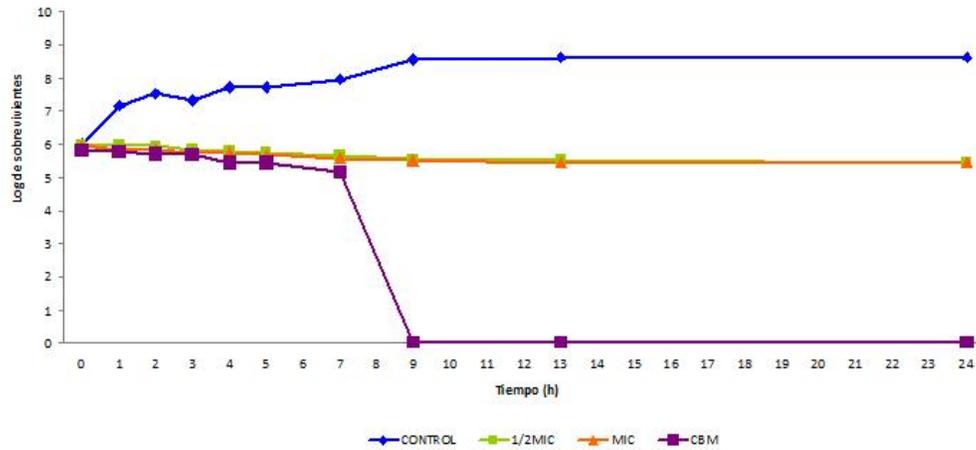
**Cuadro 6.** Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima del aceite esencial de *C. curassavica*.

Bacteria	Cloramfenicol (mg/ml)		Aceite esencial (mg/ml)					
			San Rafael Coxcatlán			Zapotitlán Salinas		
			Época de Sequía		Época de Lluvia		Época de Lluvia (Ávila 2006)	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. a.</i>	0.001	0.002	1.000	1.500	1.500	2.000	0.250	0.500
<i>S. e.</i>	0.002	0.004	0.750	1.000	1.000	1.500	0.250	0.500
<i>S. l.</i>	0.001	0.002	0.500	0.037	>3.00	>3.00	0.062	0.125
<i>B. s.</i>	0.002	0.004	1.500	2.000	0.500	0.750	0.250	0.500
<i>Vch agua</i>	0.001	0.002	3.000	>3.00	Na	Na	2.000	>2.00
<i>Vch No 01</i>	0.001	0.002	3.000	>3.00	Na	Na	0.750	1.000
<i>Vch. Tor</i>	0.001	0.002	1.500	2.000	Na	Na	1.500	2.000
<i>Vch. cc</i>	0.001	0.002	0.125	0.250	0.037	0.500	0.062	0.125
<i>E. c.</i>	0.004	0.006	3.000	>3.00	Na	Na	2.000	>2.00

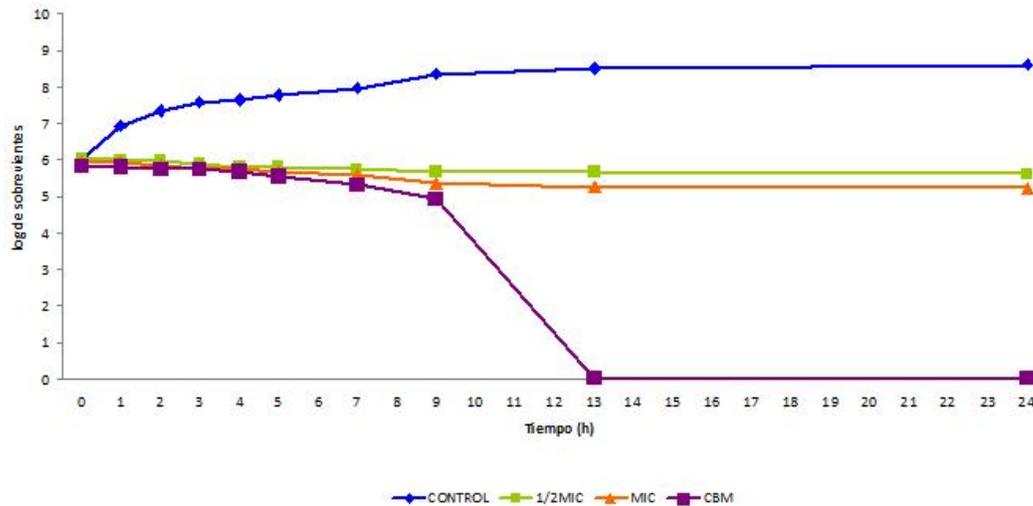
Simbología: *S.a.*, *Staphylococcus aureus*; *S.e.*, *Staphylococcus epidermidis*; *S.l.*, *Sarcina lutea*; *B.s.*, *Bacillus subtilis*; *V.ch.agua*, *Vibrio cholerae* aislada de agua contaminada; *V.ch. No-01*, *Vibrio cholerae*; *V.ch.Tor*, *Vibrio cholerae* CDC V12; *V.ch.cc*, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico; Na. no presentó actividad.

➤ Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento).

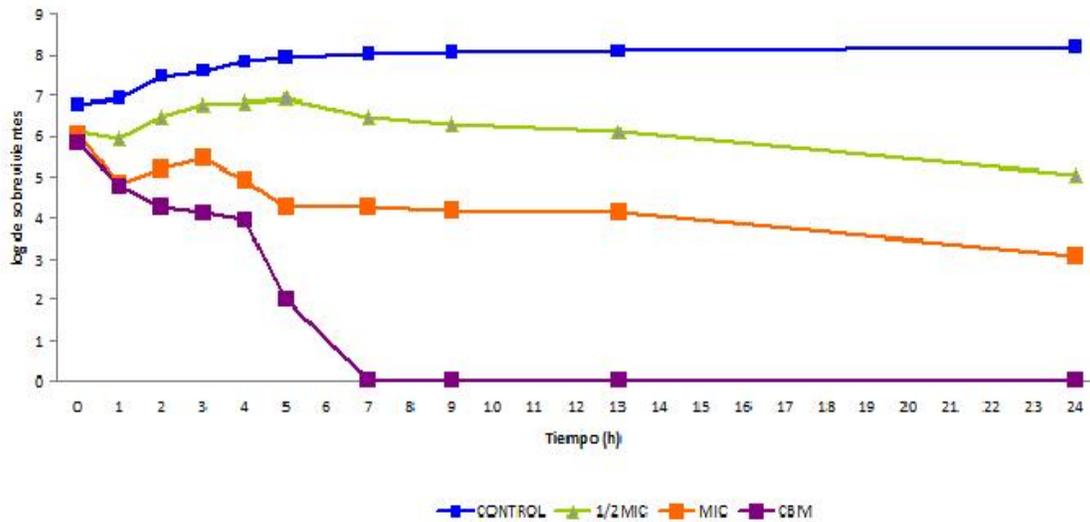
Los resultados obtenidos indican que el efecto del aceite sobre las diferentes cepas es similar, observándose que concentraciones menores o iguales a CMI tienen un efecto bacteriostático, mientras que en concentraciones mayores o iguales a CBM el efecto es bactericida, presentándose la muerte celular a las 7 horas para *V. cholerae* y a las 9 horas para *S. epidermidis*, en el caso del tratamiento con aceite esencial de la colecta de la época de sequía en San Rafael y para el tratamiento con aceite esencial colectado en la época de lluvia *S. epidermidis* a las 13 horas y *V. cholerae* cc a las 9 horas como se muestra en las figuras.



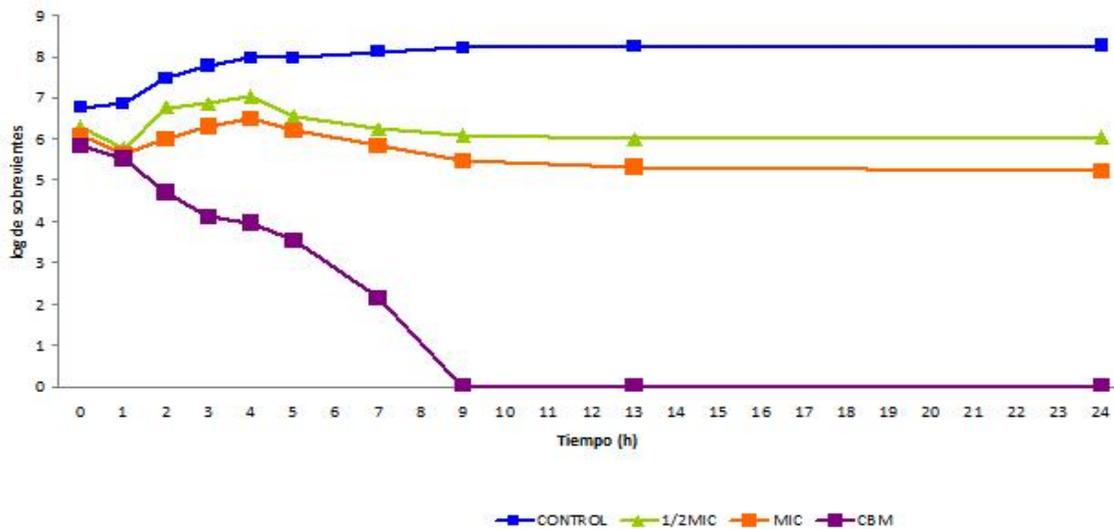
**Figura 5.** Efecto del aceite esencial de *C. curassavica* colectada en la época de sequía en San Rafael sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*. Se utilizaron las siguientes concentraciones:  $\frac{1}{2}$ MIC= 0.375 mg/ml, MIC= 0.75 mg/ml y CBM= 1.0 mg/ml.



**Figura 6.** Efecto del aceite esencial de *C. curassavica* colectada en la época de lluvia en San Rafael sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*. Se utilizaron las siguientes concentraciones:  $\frac{1}{2}$ MIC= 0.5 mg/ml, MIC= 1.0 mg/ml y CBM= 1.5 mg/ml.



**Figura 7.** Efecto del aceite esencial de *C. curassavica* colectada en época de sequía en San Rafael sobre la curva de crecimiento de *V. Cholerae* cc. Se utilizaron las siguientes concentraciones:  $\frac{1}{2}$ MIC= 0.0625 mg/ml, MIC= 0.125 mg/ml y CBM= 0.25 mg/ml.



**Figura 8.** Efecto del aceite esencial de *C. curassavica* colectada en época de lluvia en San Rafael sobre la curva de crecimiento de *V. Cholerae* cc. Se utilizaron las siguientes concentraciones:  $\frac{1}{2}$ MIC=0.187 mg/ml, MIC= 0.375 mg/ml y CBM= 0.5 mg/ml.

Para producir la inactivación de *S. epidermidis* fue necesario la acumulación de 25 y 16 impactos correspondiente al tratamiento con el aceite esencial de las épocas de sequía y lluvia respectivamente. Para inactivar *V. cholerae* fue necesario la acumulación de 13 y 9 impactos con respecto al tratamiento con aceite esencial de las épocas de sequía y lluvia respectivamente.

### 3. 2. Evaluación de la actividad antifúngica.

#### ➤ Evaluación cualitativa.

Como se puede observar en el cuadro 7, el aceite esencial fue activo en todas las cepas excepto en *Fusarium sporotrichum* para las dos épocas de la zona de San Rafael, mientras que el aceite obtenido de Zapotitlán Salinas presentó actividad en las cinco cepas desafiadas.

**Cuadro 7.** Inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *C. curassavica*.

Cepas fúngicas	Aceite esencial		
	Zapotitlán Salinas (Ávila, 2006)	San Rafael Coxcatlán	
		Época de sequía	Época de lluvia
<i>Fs</i>	+	-	-
<i>Fm</i>	+	+	+
<i>Tm</i>	+	+	+
<i>An</i>	+	+	+
<i>Rs</i>	+	+	+

Simbología: (+) = activo, (-) = no activo. *Fs*, *Fusarium sporotrichum*; *Fm*, *Fusarium moniliforme*; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *An*, *Aspergillus niger*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*.

#### ➤ Evaluación cuantitativa.

Los resultados obtenidos de la evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica se observan en los cuadros 8, 9 y 10.

**Cuadro 8.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *C. curassavica* de la zona de Zapotitlán Salinas (Ávila, 2006).

Concentración (mg/ml)	Porcentaje de inhibición Hongos			
	An	Tm	Fm	Rs
0.125	6.270±0.00	26.67±5.85	11.63±2.32	31.78±1.33
0.25	10.08±1.33	38.66±2.30	24.03±5.85	71.32±1.34
0.50	33.33±2.68	58.67±2.30	48.06±1.33	73.65±2.68
1.00	51.94±1.33	72.00±0.00	52.71±1.33	100.00±0.00
1.50	58.91±2.68	81.33±2.30	55.04±1.34	100.00±0.00
2.00	77.52±1.33	84.00±0.00	62.79±2.32	100.00±0.00

Simbología: *Fm*, *Fusarium moniliforme*; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *An*, *Aspergillus niger*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*.

**Cuadro 9.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *C. curassavica* de la zona de San Rafael (época de sequía).

Concentración (mg/ml)	Porcentaje de inhibición Hongos			
	An	Tm	Fm	Rs
0.125	15.52±3.84	2.08±3.61	0.00±0.00	20.83± 3.61
0.25	17.78±3.84	4.16±3.61	2.22± 3.85	27.08±3.61
0.50	22.22± 3.85	8.33±3.61	6.67±0.00	43.75±0.00
1.00	22.22±3.85	12.50±0.00	8.89±3.85	31.25±0.00
1.50	24.44± 3.85	14.58±3.61	8.89± 3.85	52.08±3.61
2.00	28.89±3.85	18.75±0.00	11.11± 3.85	66.66± 3.61

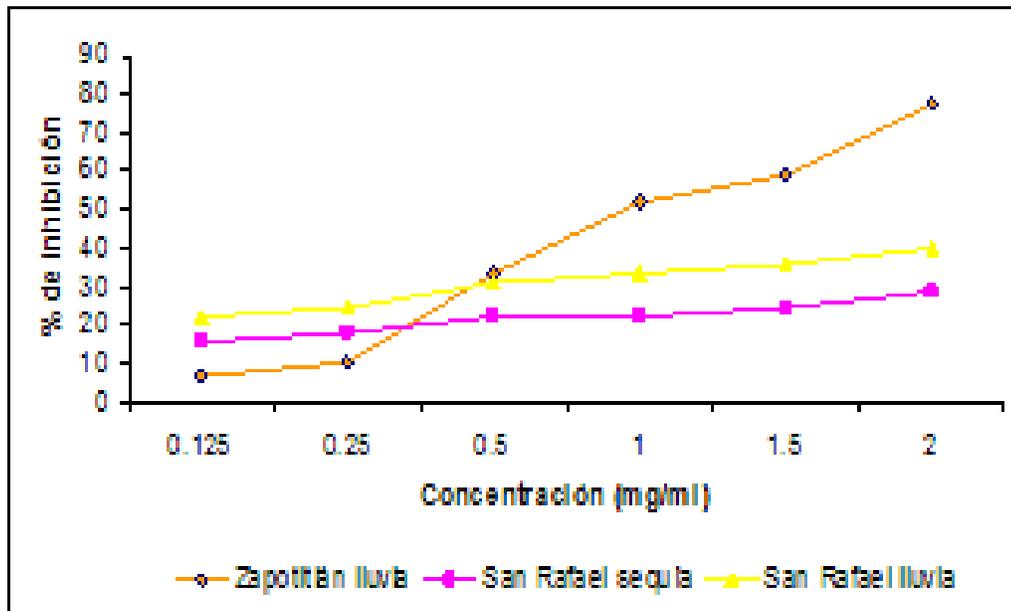
Simbología: *Fm*, *Fusarium moniliforme*; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *An*, *Aspergillus niger*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*.

**Cuadro 10.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *C. curassavica* de la zona de San Rafael (época de lluvia).

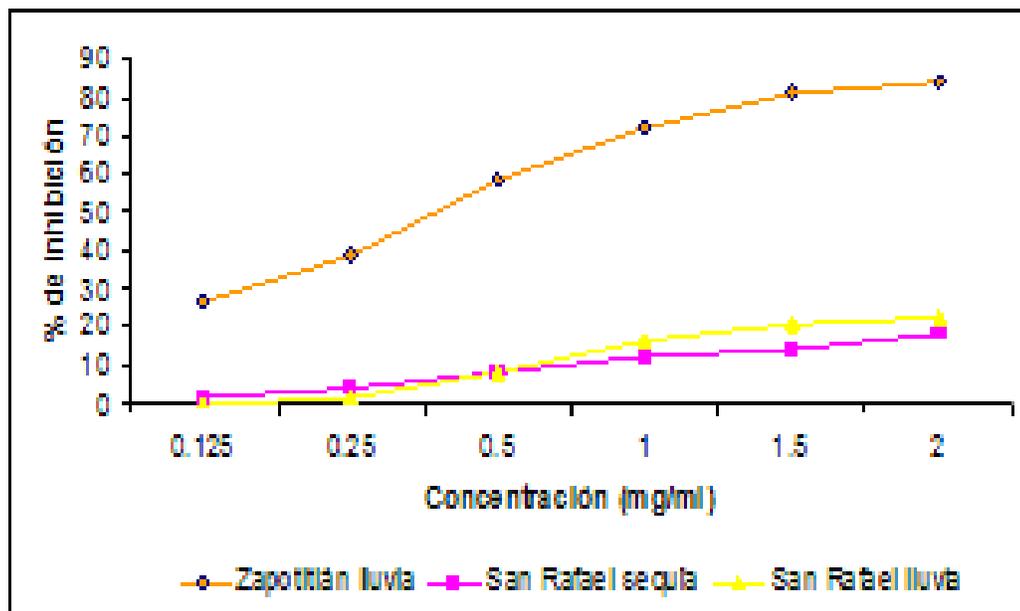
Concentración (mg/ml)	Porcentaje de inhibición Hongos			
	An	Tm	Fm	Rs
0.125	22.22±3.85	0.00±0.00	0.00±0.00	33.33±9.55
0.25	24.44±3.85	2.08 ±3.61	8.88±3.85	29.17±7.22
0.50	31.11±3.85	8.33 ±3.61	11.11±3.85	35.42±14.43
1.00	33.33±6.67	16.67±3.61	13.33±0.00	45.83±3.61
1.50	35.55±3.85	20.83±3.61	15.55±3.85	45.83±3.61
2.00	40.00±0.00	22.92±3.61	17.78±3.85	66.67±3.61

Simbología: *Fm*, *Fusarium moniliforme*; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *An*, *Aspergillus niger*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*.

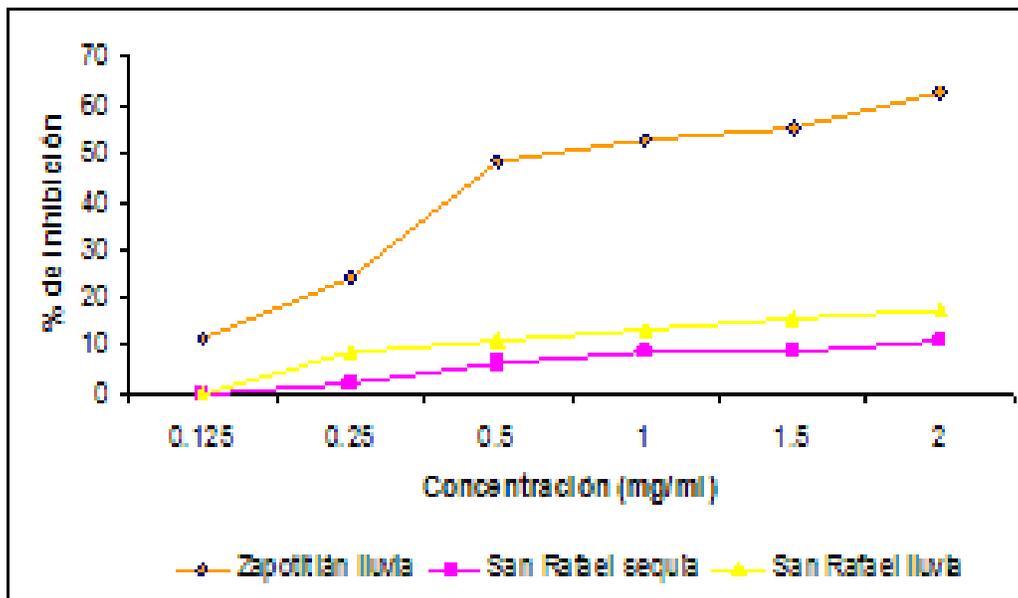
En las figuras 9, 10, 11 y 12 y se puede observar de una manera comparativa el efecto de las diferentes muestras de aceite esencial sobre cada cepa fúngica. Para todas las especies de hongos el aceite esencial obtenido de Zapotitlán Salinas presentó un mayor efecto antifúngico. En cuanto a las muestras obtenidas de las diferentes épocas de San Rafael, se observó que la época de lluvia presenta una mayor inhibición del crecimiento radial.



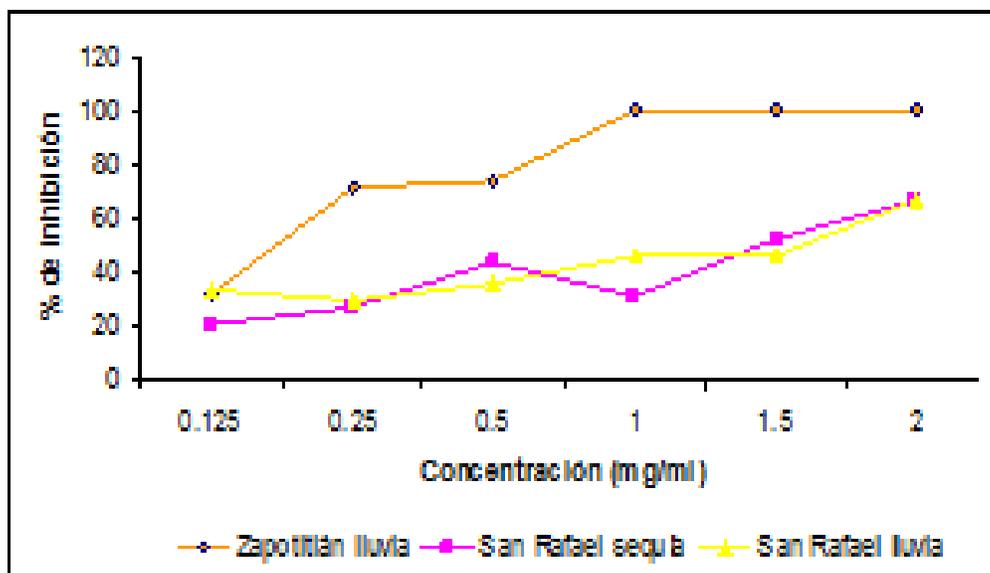
**Figura 9.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *C. curassavica* sobre *Aspergillus niger*



**Figura 10.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *C. curassavica* sobre *Trichophyton mentagrophytes*



**Figura 11.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *C. curassavica* sobre *Fusarium moniliforme*



**Figura 12.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *C. curassavica* sobre *Rhizoctonia solani*.

El aceite esencial de *C. curassavica* presento un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial en la cepa *R. solani* ya que requirió una concentración de 0.75 mg/ml para lograr un 100% de inhibición en el caso de Zapotitlán Salinas, mientras que para San Rafael se requirió de una concentración de 2 mg/ml para obtener alrededor del 60% de inhibición. Siendo *Fusarium moniliforme* la cepa más resistente en ambas zonas.

Los resultados obtenidos en la determinación de la CF<sub>25</sub> y CFM se muestran en el cuadro 11. Como se puede observar *R. solani* fue la cepa más sensibles al efecto del aceite esencial, ya que alcanzó el 25% de inhibición a concentración de 0.07 mg/ ml para la zona de Zapotitlán Salinas y para San Rafael 0.13 mg/ml.

**Cuadro 11.** Concentración fúngica al 25% (CF<sub>25</sub>) y Concentración fúngica mínima (CFM).

Especie	San Rafael (mg/ml)		Zapotitlán Salinas (mg/ml) (Avila, 2006)	
	CF <sub>25%</sub>	CFM	CF <sub>25%</sub>	CFM
<i>Rs</i>	0.13	>2.00	0.07	0.75
<i>Fm</i>	5.04	>2.00	nd	>2.00
<i>Fs</i>	na	na	nd	1.00
<i>Tm</i>	1.60	>2.00	0.14	>2.00
<i>An</i>	0.23	>2.00	0.27	>2.00

Simbología: *Fm*, *Fusarium moniliforme*; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *An*, *Aspergillus niger*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*.

Los resultados obtenidos de las pruebas de comparación de pendientes (Kruskal-Wallis) en las diferentes épocas de San Rafael (sequía y lluvia) y Zapotitlán Salinas del porcentaje de inhibición del crecimiento radial se muestran en el cuadro 12.

**Cuadro 12.** Comparación de pendientes en San Rafael (época de sequía y lluvia) y Zapotitlán del porcentaje de inhibición.

Especie	Zapotitlán Época de lluvia (Ávila 2006)	San Rafael Época de sequía	San Rafael Época de lluvia	Error est. de la pendiente	Estadístico de t (comparación temporal)	Estadístico de t (Comparación espacial)
<i>Rs</i>	25.42	12.03	12.29	2.96	-0.08 n.s	-4.44 **
<i>An</i>	----	5.71	6.67	0.63	-1.52 n.s	----
<i>Fm</i>	17.84	5.15	6.3	0.79	-1.46 n.s	-16.49 **
<i>Tm</i>	23.89	6.71	8.63	0.61	-3.15 *	-25.02 **

Simbología: igual a la anterior. n.s= diferencias no significativas; \* diferencias significativas al 0.05; \*\* diferencias significativas al 0.01. *Fm*, *Fusarium moniliforme*; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *An*, *Aspergillus niger*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*.

Se puede observar que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de las épocas de sequía y lluvia de San Rafael, mientras que en la comparación espacial, si se encontraron diferencias significativas (0.001).

Aunque presentaron actividad frente a las mismas cepas, el aceite de San Rafael Coxcatlán presentó menor efecto antimicótico.

## DISCUSIÓN

*C. curassavica* es una planta a la que se le atribuyen ciertas propiedades medicinales, es una de las ocho especies más importantes en la medicina tradicional de Zapotitlán Salinas por su uso contra diversas enfermedades infecciosas (Hernández *et al.*, 2003). Sin embargo en San Rafael Coxcatlán solo tiene uso de tipo forrajero (Dávila *et al.*, 2002). Debido a lo anterior surgió el interés de estudiar la variación espacial y temporal de la composición química, actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *C. curassavica* en estas dos zonas donde le dan un uso distinto.

Con respecto al rendimiento del aceite esencial, se sabe que las condiciones climáticas incluyendo temperatura, intensidad de luz, humedad (Harborne, 1988) y la naturaleza del suelo, influyen directamente en la producción del aceite esencial (Bruneton, 1991). En ambientes áridos las especies vegetales se encuentran sometidas a estrés hídrico de manera que 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 lo anterior, son los monoterpenos y sesquiterpenos 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 y/o al aumentar la concentración intracelular evitan la pérdida de agua (Romo de Vivar, 1985; Osorio, 2009).

En relación a la variación espacial se puede pensar que debido a que las condiciones climáticas en Zapotitlán Salinas son más áridas, las plantas deben sintetizar una mayor cantidad de metabolitos, es por esta razón que posiblemente el aceite obtenido de Zapotitlán presentó un mayor rendimiento y densidad (0.41 %, 0.89 g/ml) en comparación con el aceite obtenido en las muestras de San Rafael ambas en época de lluvia (0.18 %, 0.78 g/ml).

En cuanto a la variación temporal (época de sequía y lluvia) de las muestras obtenidas en San Rafael se encontró que el aceite esencial de la época de sequía presentó mayor rendimiento y densidad (0.35 %, 0.86 g/ml) que el aceite de la época de lluvia.

Las diferencias con respecto a la variación espacial de la composición de las muestras de aceite esencial probablemente son debidas nuevamente a las condiciones climáticas ya que como sabemos los sesquiterpenos son menos volátiles que los monoterpenos, razón por la que probablemente en el aceite esencial obtenido de la colecta en Zapotitlán se encuentra un mayor número de sesquiterpenos (Harborne, 1988).

En cuanto a la comparación temporal (época de sequía y lluvia) de las muestras obtenidas en San Rafael se encontró que en la época de sequía el 41.0 % corresponde a monoterpenos y el 59.0 % sesquiterpenos, mientras que para la época de lluvia el 45.0 % corresponden a monoterpenos y el 55.0 % a sesquiterpenos. Como se observa para ambas épocas el aceite se encuentra conformado en una mayor proporción por sesquiterpenos. En cuanto a la presencia de monoterpenos podemos observar que en la época de lluvia se encuentra un mayor porcentaje de éstos y esto probablemente se deba a que en la época de lluvia hay mayor competencia, ataque de microorganismos, etc., por tanto, las plantas deben producir estas sustancias químicas para dañar a sus competidores afectando su germinación, desarrollo o crecimiento (Romo de Vivar, 1985; Harborne y Tomas-Barberan, 1991) y para adquirir defensas frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales (Domingo y López-Brea, 2003).

El aceite esencial de ambas zonas y épocas presentó actividad tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas debido a que las moléculas del aceite esencial son lipofílicas y tienen la capacidad de interactuar con las membranas citoplasmáticas bacterianas, y por ende pueden provocar su inestabilidad principalmente por el aumento de la permeabilidad de la membrana (Conner, 1993; Sikkema *et al.*, 1994; Juven *et al.*, 1994; Ultee *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000 y Guynot *et al.*, 2003).

La actividad antibacteriana del aceite esencial con respecto al factor temporal fue distinta puesto que la época de sequía presentó actividad en 9 de las 13 cepas experimentadas, mientras que el aceite de la época de lluvia presentó actividad frente a 4 cepas, las cepas más sensibles en ambas épocas fueron *S. aureus*, *B. subtilis* y *V. cholerae* cc.

Tomando en cuenta el factor espacial, el aceite esencial obtenido de la planta colectada en la zona

de Zapotitlán presentó actividad frente a 9 cepas, en contraste con las 4 cepas en la que presentó actividad el aceite obtenido de la colecta de San Rafael.

*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* y *V. cholerae* cc fueron sensibles a los aceites de ambas épocas y zonas.

El aceite obtenido de *C. curassavica* colectada en San Rafael Coxcatlán presentó menor efecto antibacteriano, probablemente debido a que la cantidad y a veces la naturaleza de los principios activos no son constantes a lo largo del año, ya que la época, la edad de la planta, la localización geográfica y factores ambientales como lluvia, humedad, luz solar, etc, influyen en el contenido de metabolitos (Skrubis y Markakis, 1976; Gillén y Manzanos, 1998; Ramírez, 2006; Shiva, 2007).

Se podría pensar que la actividad presentada por el aceite de *C. curassavica* colectada durante las épocas de lluvia y sequía en la zona de San Rafael tal vez se deba a una acción sinérgica de alguno de los componentes (García, 2006): carvacrol, D-limoneno,  $\alpha$ -pineno, camfeno,  $\alpha$ -mirceno y  $\alpha$ -felandreno que se encontraron en proporciones minoritarias en el aceite y, se han reportado como componentes que tienen propiedades antimicrobianas (Pelczar *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 1999, Mesa *et al.*, 2004).

En el caso de lo reportado por Ávila (2006) podría pensarse que la actividad que presentó el aceite tal vez se deba a que varios de sus componentes presentan grupos hidroxilo (OH), lo que según Domingo y López (2003) parece estar relacionado directamente con la toxicidad frente a los microorganismos y cuyo mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente por interacciones no específicas con proteínas.

El efecto del aceite esencial de *C. curassavica* sobre la población bacteriana de *S. epidermidis* y *V. cholerae* es bacteriostático a dosis iguales o menores a CMI pero bactericida a concentraciones iguales a CBM, uno de los inconvenientes de utilizar concentraciones bactericidas es que se deprime o elimina la respuesta inmunógena al suprimir rápidamente el estímulo antigénico, lo

que puede impedir la generación de inmunidad, mientras que al utilizar concentraciones bacteriostáticas solo se inhibe el crecimiento bacteriano, permitiendo así una respuesta inmunológica (Aguilar, 2000). A pesar de que el aceite obtenido en ambas épocas en la zona de San Rafael causó muerte celular, posiblemente por la presencia de sinergismo, el aceite de la época de sequía causó la muerte celular de ambas cepas bacterianas en un menor tiempo que el aceite de la época de lluvia, esto tal vez debido a la presencia de carvacrol en la muestra de la época de sequía.

En el caso de la evaluación de la actividad antifúngica el aceite esencial fue activo en todas las cepas fúngicas excepto en *Fusarium sporotrichum* en el caso de la zona de San Rafael. La cepa más sensible fue *Rhizoctonia solani* para ambas zonas pero sin llegar a alcanzar el 100% de inhibición en San Rafael. Esta sensibilidad de los hongos al aceite esencial puede deberse 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 lipídica, la cual depende de la hidrofobicidad del compuesto (Hammer *et al.*, 2004; Carson *et al.*, 2006). Probablemente otro 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 (Inouye *et al.*, 2000 y 2001; Ricci *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

- De los componentes del aceite esencial de *C. curassavica* se identificaron doce para San Rafael para la época de sequía y diecisiete para la época de lluvia y once para Zapotitlán, según lo reportado por Ávila, 2006, compartiendo solo al isocariofileno y selineno en ambas zonas.
- El aceite esencial de *C. curassavica* de ambas zonas y épocas, inhibió tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas.
- El aceite obtenido de *C. curassavica* de San Rafael mostró menor actividad antibacteriana y antifúngica.
- Se confirma que tanto las condiciones ambientales como las temporales de ambas zonas del Valle de Tehuacán Cuicatlán, Puebla, afectan la composición y concentración de los compuestos presentes en el aceite esencial de *C. curassavica*, reflejándose en la actividad antimicrobiana.

## PERSPECTIVAS

- Al estudiar la variación del aceite esencial de *C. curassavica* en dos épocas diferentes podemos observar que el aceite con mayor actividad antimicobacteriana corresponde al obtenido en la época de sequía, por lo que sería conveniente que se realizaran estudios en esta época pero en la zona de Zapotitlán Salinas, donde se presentó una mayor actividad antimicrobiana.
- Llevar a cabo estudios comparativos de los aceites o extractos de *C. curassavica* tomando en cuenta distintas variables, como el genotipo de la planta, los diferentes métodos de extracción, localización geográfica, el ciclo vegetativo, así como las condiciones ambientales y las distintas partes de la planta.
- Realizar estudios de toxicidad del aceite o compuestos activos para ver el efecto que presenta en organismos vivos tales como moscas, artemia o ratones.
- Debido a la actividad antifúngica que presenta el aceite esencial de *C. curassavica* y al problema que representa la dermatomicosis en la población, el aceite de esta planta podría ser una alternativa terapéutica. Por lo que es conveniente la realización de estudios que puedan evaluar la actividad antimicótica del aceite a diferentes concentraciones ya sea en forma de crema o tal vez un jabón, para luego poder validar su posible uso en humanos.
- Ya que *C. curassavica* es usada como una planta forrajera en San Rafael, Coxcatlán, podrían realizarse estudios sobre los aceites esenciales de ésta como una alternativa para reemplazar a los promotores de crecimiento capaces de controlar a la población microbiana del tracto gastrointestinal.

## APÉNDICES.

### APÉNDICE 1. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA.

*Cordia curassavica* (Jacq) Roemer & Schultes (Figura.14). Forma parte de la familia Boraginaceae, del orden Labiales en la clase Magnoliopsida. Este género está constituido por árboles o arbustos, generalmente monoicos; algunas veces dioicos, a menudo con una pubescencia muy áspera, los pelos simples, estrellados o ramificados.

La mayoría de sus hojas son alternas, pecioladas, tienen la lámina con el margen entero o dentado. Las inflorescencias son cimosas, paniculadas, espigadas o capitadas; pequeñas o grandes, sésiles o pediceladas. El cáliz es tubular a campanulado, sulcado, estriado o liso, de 2 – 5 lóbulos, acrecente. La corola generalmente es blanca o blanco – verduzca, algunas veces amarilla o anaranjada, infundibuliforme, salveforme o campanulada, los lóbulos son generalmente 5 pares, algunas veces son más numerosos, plegados o aplanados, imbricados o subcontortos en prefloración. Los estambres del mismo número que los lóbulos de la corola, los filamentos igual o desigualmente insertos en tubo de la corola, exertos o incluidos, las anteras ovadas, oblongas o lineares, sagitadas o hastadas; ovarios 4 locular, los óvulos erectos, con la placenta lateral, aproximadamente en el centro o en la base del lóbulo, el estilo prolongado, dos veces bifido, los estigmas capitados o clavados. Los frutos son drupáceos, los lóculos 4 o, menos debido a abortos, el pireno muy endurecido; la semilla sin endospermo.

En Chiapas, Guerrero y Oaxaca se le conoce como barredor, varita prieta, chibaroba, chovaroba, xobaroba. Otros nombres comunes son: orégano cimarrón, xopche, kut'a chukuri.

En los estados de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala, la parte más utilizada de *C. curassavica* son las hojas, que se preparan machacadas, diluidas en agua, en cocimiento o administradas por vía oral, según el padecimiento (Argueta y Cano).



Figura 13. *Cordia curassavica*

## APÉNDICE 2. ÁREA DE ESTUDIO.

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán forma parte de la región xerofítica mexicana (Rzedowski, 1978) y se localiza en la parte sureste del estado de Puebla y noroeste de Oaxaca, entre los 17°39' y 18°53' de latitud norte y los 96°55' y 97°44' de longitud oeste; cuenta con una extensión aproximada de 10,000 km<sup>2</sup>, presentando diversas comunidades vegetales como son: bosque tropical caducifolio, bosque espinoso, bosque de encino, bosque de pino-encino, pastizal y matorral xerófilo (Figura. 15).

### SAN RAFAEL COXCATLÁN.

La localidad de San Rafael esta situada en el municipio de Coxcatlán Puebla. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 12' y 18° 14' de latitud norte y los meridianos 97° 07' y 97° 09' de longitud oeste.

El clima corresponde a un tipo seco, árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22°C (Médina, 2002). Los tipos de suelo predominantes son regosoles calcáreos, regosoles éutricos y xerosoles.

### ZAPOTITLÁN SALINAS.

El municipio de Zapotitlán Salinas se localiza en la parte sureste del estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 07' 18" y 18° 26' 00" de latitud norte y los meridianos 97° 19' 24" y 97° 39' 06" de longitud oeste.

El clima corresponde a un tipo seco o árido, semiárido con marcadas lluvias en verano y su promedio de temperatura a lo largo de todo el año es de 21.2 °C. Las principales unidades de suelo son litosoles, cambisoles cálcicos y xerosoles cálcicos.

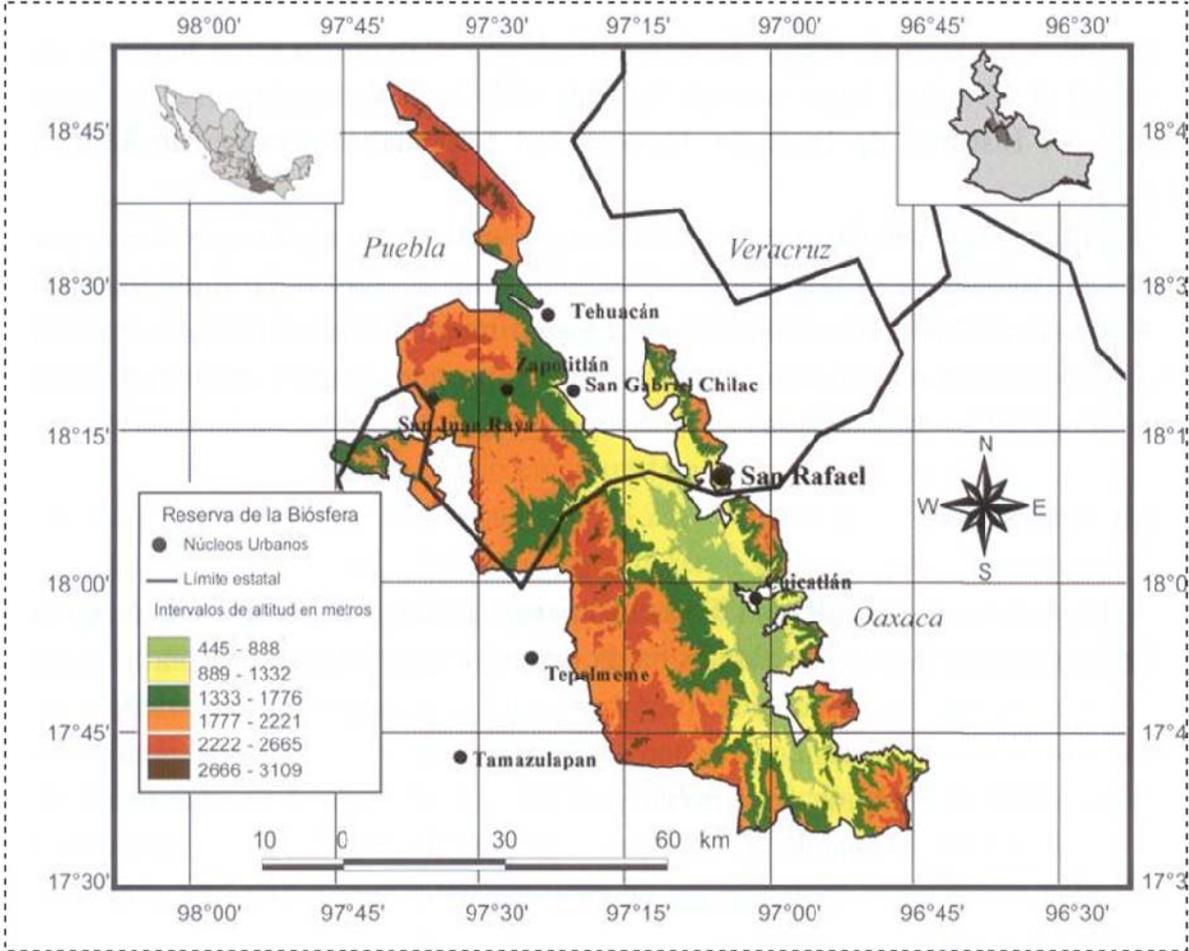


Figura 14. Valle de Thuacán-Cuicatlán, Puebla

**APÉNDICE 3. Extracción por arrastre de vapor de aceites esenciales (Domínguez, 1973)**

El aceite esencial se obtienen por la técnica de destilación por arrastre de vapor a partir de material fresco; este método utiliza la característica que tienen los aceites esenciales 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 figura 16.

Empleando este aparato se pueden destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500g de planta fresca, con un buen rendimiento.

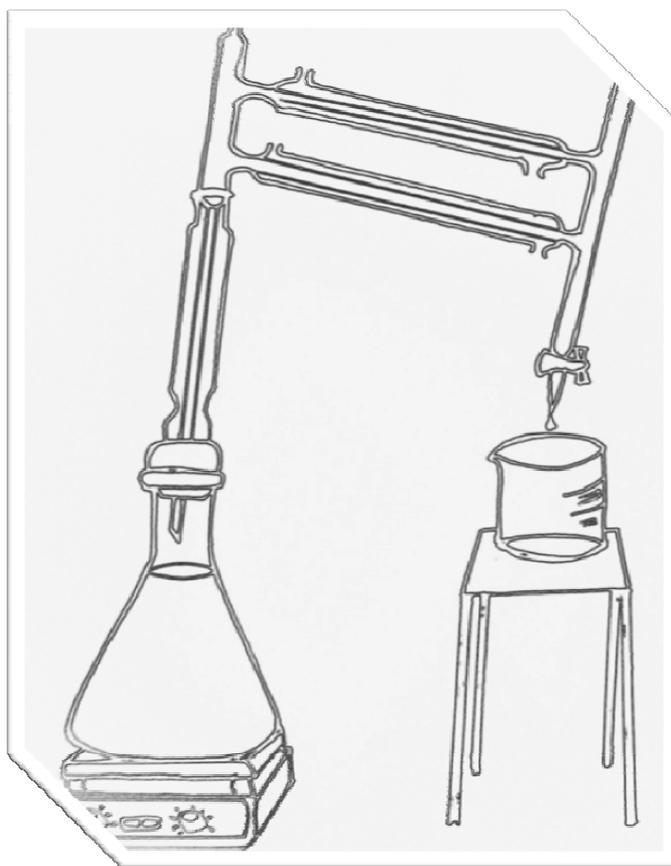


Figura 15. Destilación por arrastre de vapor

**APÉNDICE 4. Análisis en cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.**

Para el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los aceites esenciales (GC-MS) se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 serie II conectado a un espectrómetro Jeol AX50HA. El análisis se realizó utilizando una columna DB WAX de 30 m x 0.32 mm y diámetro interno de 0.25  $\mu\text{m}$ . Las condiciones de separación fueron: temperatura inicial del horno 80 °C aumentando 8°C por minuto hasta una temperatura final de 220°C; temperatura del inyector 225°C; gas de acarreo He, a presión de 134 Kpa (19 Psi) y velocidad lineal de 20 cm/s; cantidad de muestra empleada: 1.0  $\mu\text{l}$  (Split 1:100); La muestra se ionizó por impacto electrónico, la energía de ionización fue de 70 eV.

Los nombres comunes de los compuestos fueron identificados con el phytochemical dictionary (Harborne and Baxter, 1993).

---

**APÉNDICE 5. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Vander Berghe y Vlietnick, 1991).**

Medio de cultivo.

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Mueller-Hinton, debido a que promueve el desarrollo de la mayoría de aislamientos bacterianos significativos. Es recomendable que el agar tenga un espesor uniforme en la caja.

Inóculo.

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de bacterias. Se sumerge el asa en un tubo con caldo Mueller-Hinton, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 24 hrs, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml.

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 la suspensión bacteriana, antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo hisopo contra la pared interna del tubo 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 impregnados con el aceite esencial en cada una de las zonas se colocan en la superficie del agar, utilizando una pinza estéril; los sensidiscos se colocan por lo menos a 22mm uno de otro y a 14mm del borde de la placa. Los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la pinza, tratando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración del aceite esencial a evaluar (5 µl).

Control positivo. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con un antibiótico sintético (Cloramfenicol 25 µg ).

### Incubación.

Ya que las placas con agar están preparadas para la prueba de susceptibilidad, se colocan 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 húmeda 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.

Interpretación de resultados. Las zonas de inhibición se miden con una regla calibrada en milímetros. En todos los casos, las pruebas se realizan por triplicado y los valores promedio se reportan en milímetros.

---

## **APÉNDICE 6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).**

Método modificado de dilución en caldo (Koneman, 1985).

Preparación de reactivos y diluciones.

La solución antimicrobiana se prepara diluyendo el aceite en el caldo Mueller-Hinton a concentraciones de 3.0, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 y 0.062 mg/ml del aceite. Las pruebas se realizan en pequeños frascos. En cada frasco se colocan 10 ml de caldo con la concentración, se prepara un inóculo que contenga  $10^5$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml). Se agrega a cada frasco 0.1 ml del inóculo. Los frascos se incuban a 35 °C durante 24 horas. Cada bioensayo se realiza por triplicado con un control positivo (cloramfenicol)

Para evaluar el efecto bactericida del aceite esencial se determina CBM. Se siembra el contenido de los tubos que en la determinación de CIM no presentaban turbidez y se cultivan en placas de petri con agar Mueller-Hinton. Se incuban a 37°C durante 24 horas y posteriormente se realiza el recuento de UFC/ml.

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 7. Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento) (Avila, 1996).**

Preparación y rotulación por lo menos un tubo con el aceite esencial problema, para muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los 4 primeros tiempos, después durante dos horas, tres tiempos, seguido de un intervalo de 4 horas y finalmente a las 24 horas.

Se prepara y rotula otro tubo sin antídoto que sirve como control del desarrollo.

El inóculo se prepara con aproximadamente  $1 \times 10^6$  bacterias/ml en un tubo de ensayo con caldo Mueller-Hinton.

Se grafica el logaritmo del número d 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 bacteria, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas.

---

**APÉNDICE 8. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos (Wang y Bun, 2002).**

El ensayo antifúngico cualitativo se lleva a cabo en cajas de petri, que contienen agar PDA, en el cual se inocula 1mm<sup>2</sup> de micelio del hongo a ensayar. Después que el micelio se desarrolla se colocan los sensidiscos impregnados con 5µl de aceite esencial a una distancia de 5mm del límite micelial.

Incubación. Las cajas se incuban a 23°C durante 72 horas o hasta que el micelio se desarrolle.

Control positivo. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de ketoconazol de 25µg/disco.

Interpretación de resultados. En los casos en que existan zonas de inhibición del aceite esencial se reporta como activo, realizándose en todos los casos por triplicado.

---

**APÉNDICE 9. Método Cuantitativo de Inhibición del crecimiento radial de hongos (Wang y Bun, 2002).**

Este ensayo se realiza en cajas de veinticuatro pozos que contengan agar, con las concentraciones deseadas, posteriormente se inocula  $1\text{mm}^2$  con micelio del hongo a ensayar.

Incubación. Las cajas se incuban a  $23^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Control positivo. La sensibilidad de las cepas se evalúa con ketokonazol a las concentraciones predeterminadas.

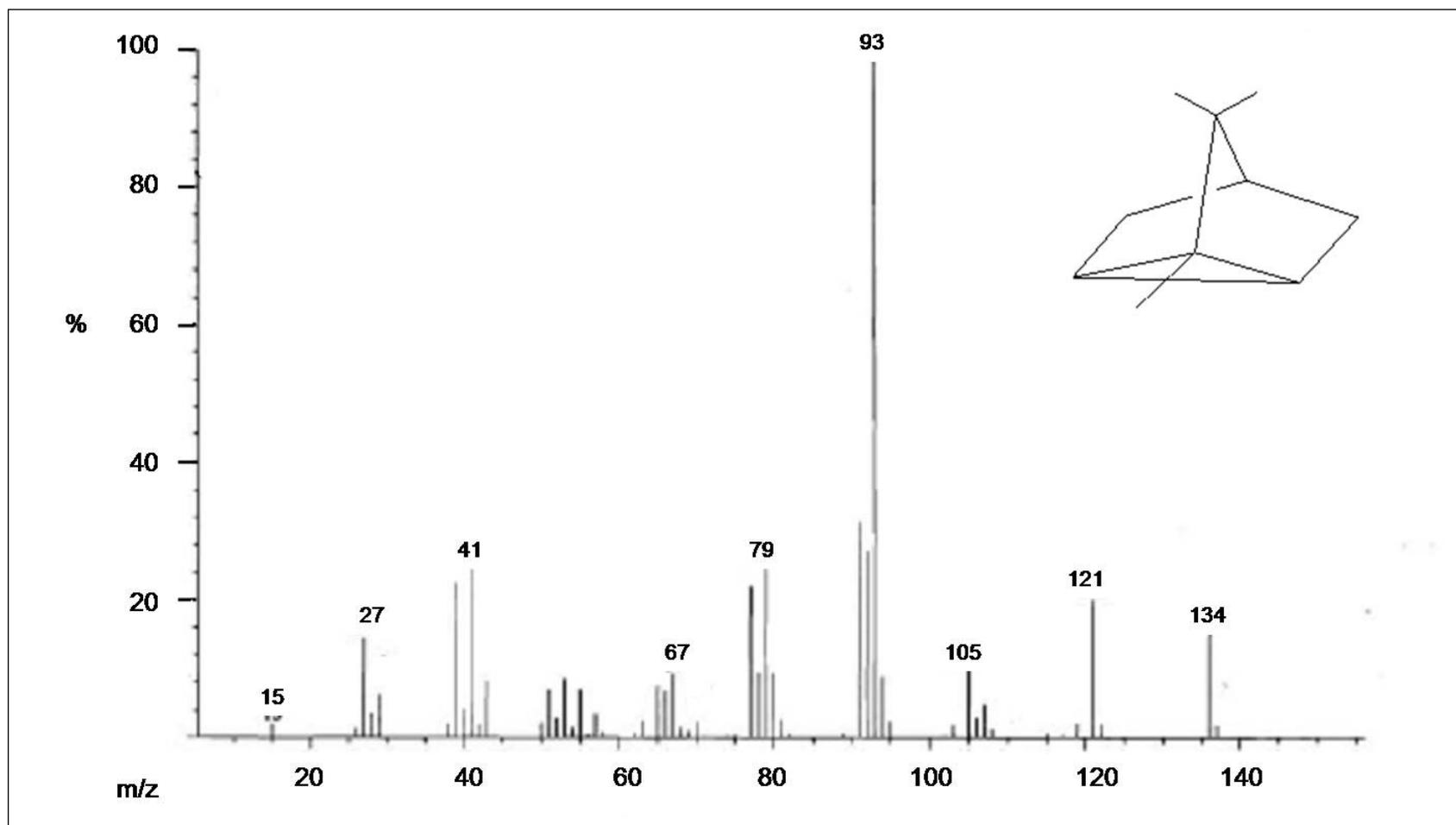
Interpretación de los resultados. Con una regla se mide el crecimiento del hongo para calcular el porcentaje de crecimiento, posteriormente se calcula el porcentaje de inhibición. Realizándose en todos los casos por triplicado.

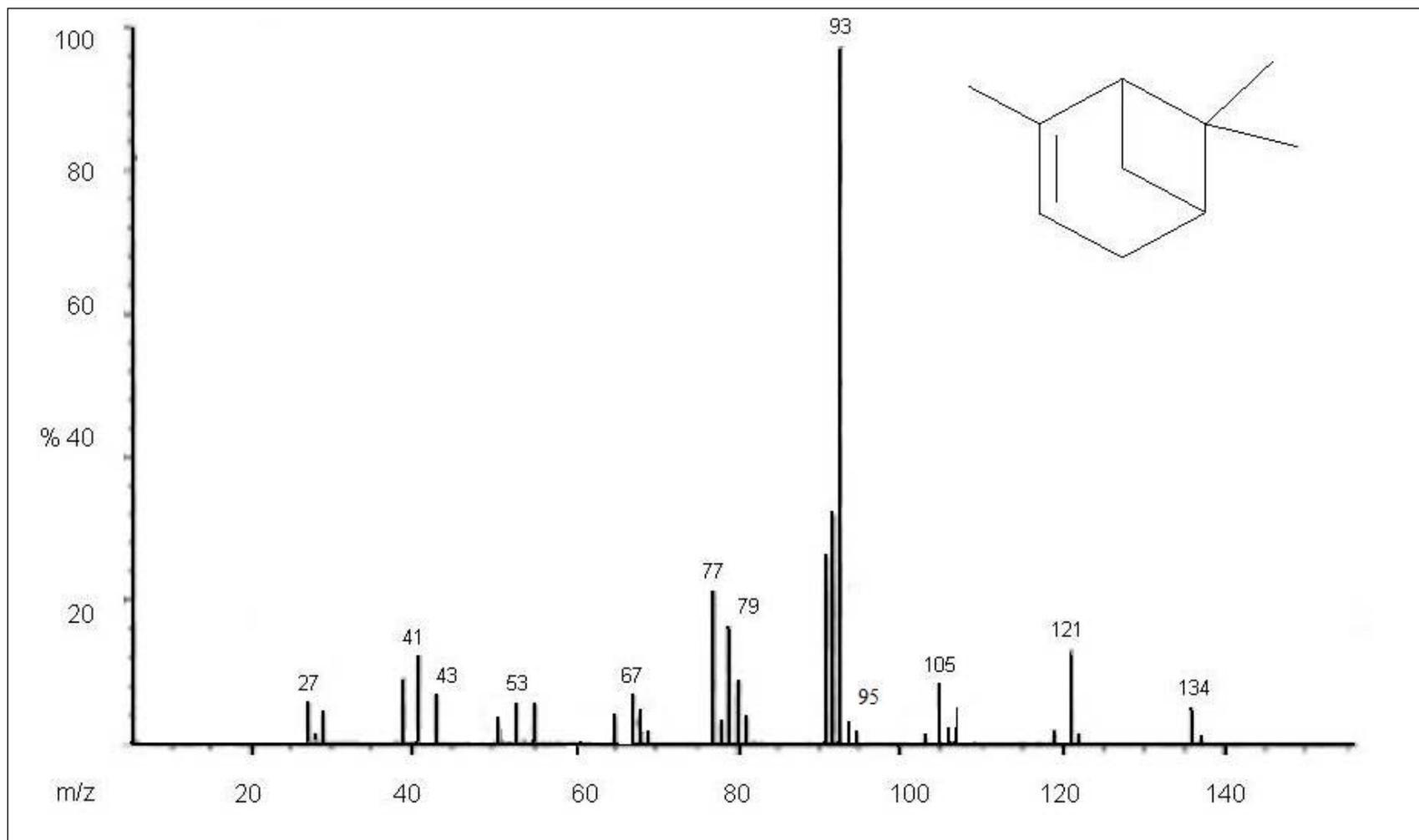
APÉNDICE 10. Espectros de masas de los componentes del aceite esencial de *C. curassavica*

Simbología: TR= Tiempo de retención, SRS= San Rafael Sequía, SRL= San Rafael Lluvia.

**Compuesto 1.**

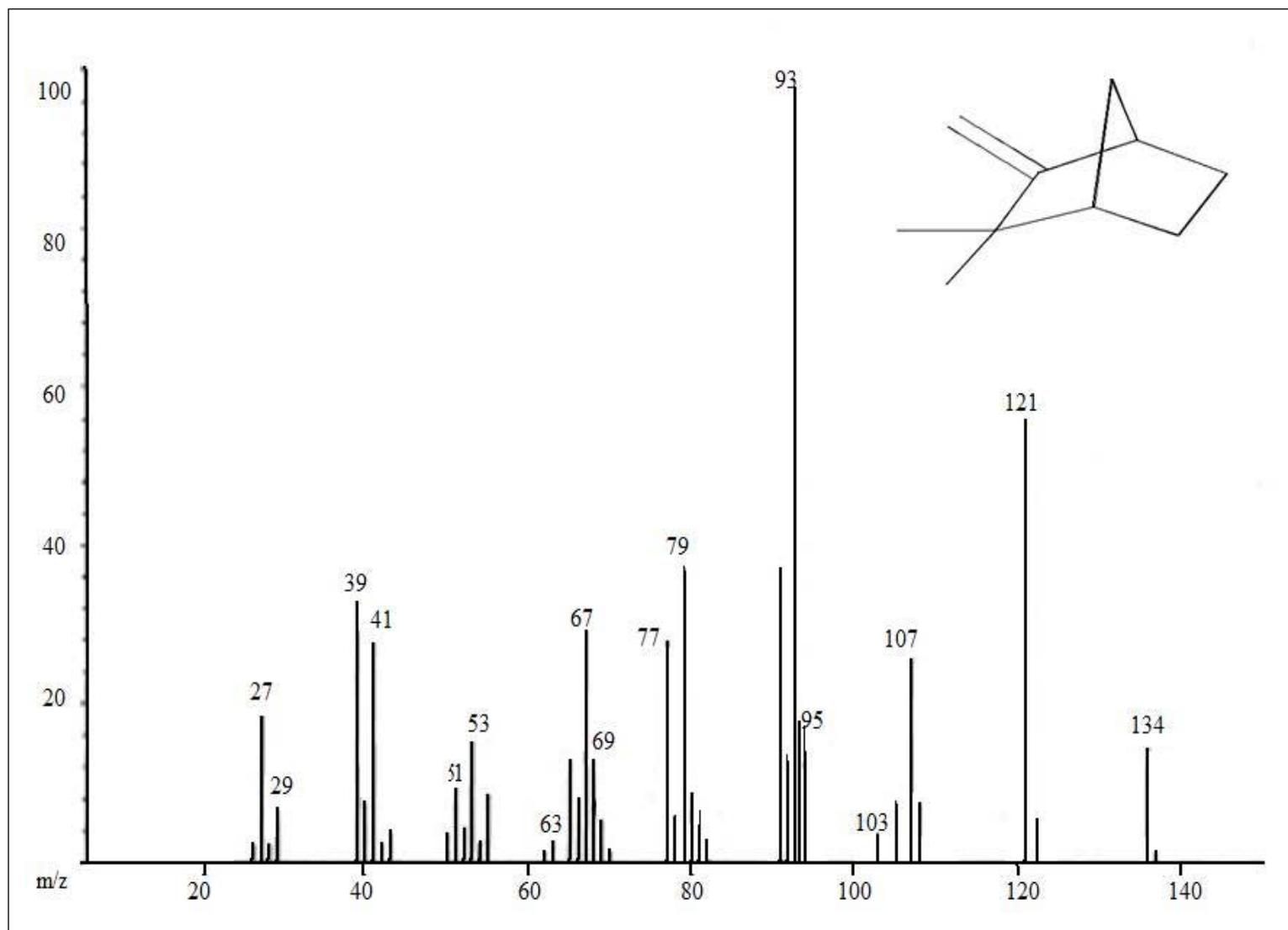
1,7,7-trimetil-triciclo(2.2.1.0(2,6))heptano (TR: SRS= 7.43, SRL=7.09, Zapotitlán=ausente)



**Compuesto 2.** $\alpha$ -pineno (TR: SRS= 7.69, SRL=7.31, Zapotitlán= ausente)

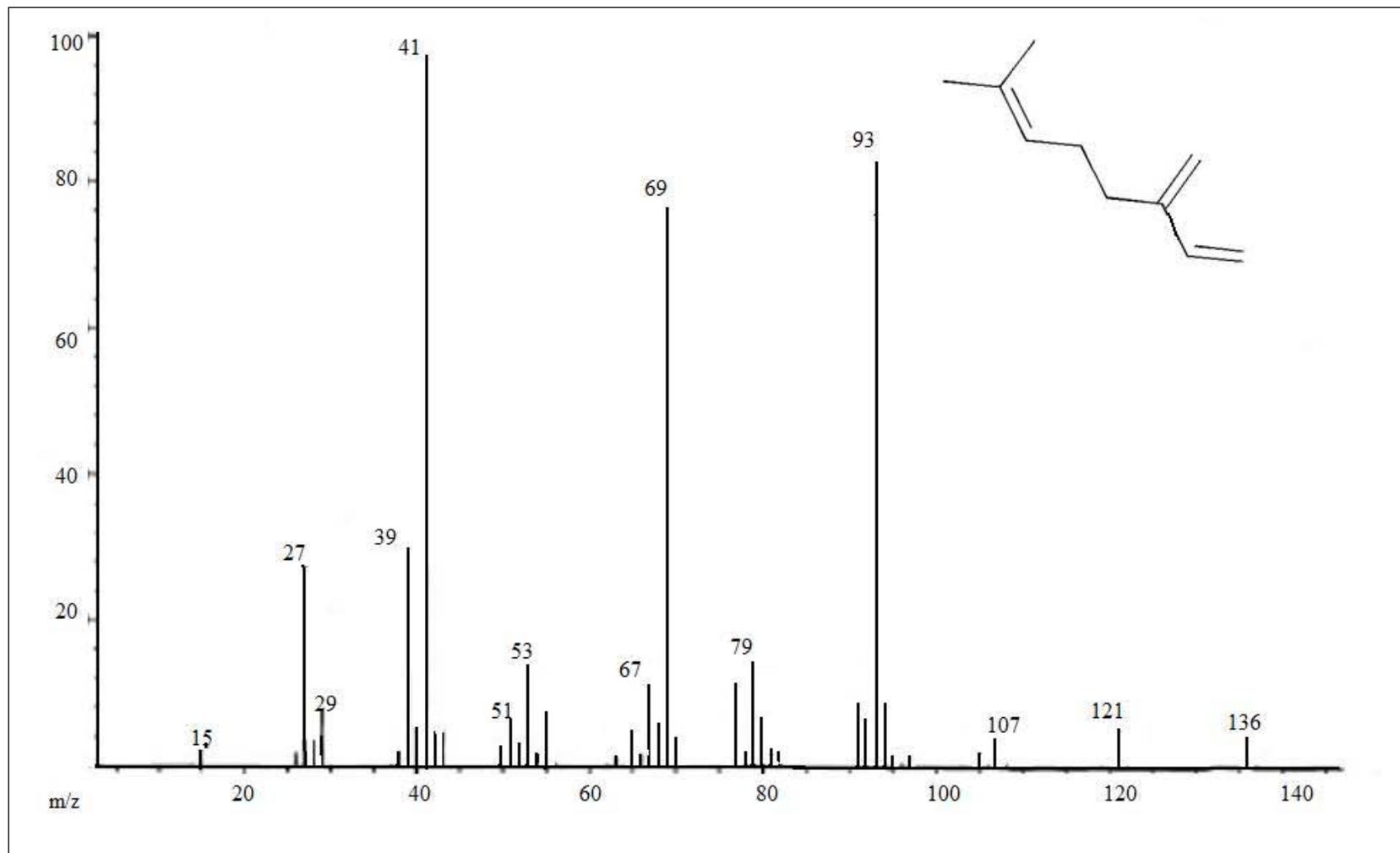
**Compuesto 3.**

Camfeno (TR: SRS= ausente, SRL=7.61, Zapotitlán= ausente)



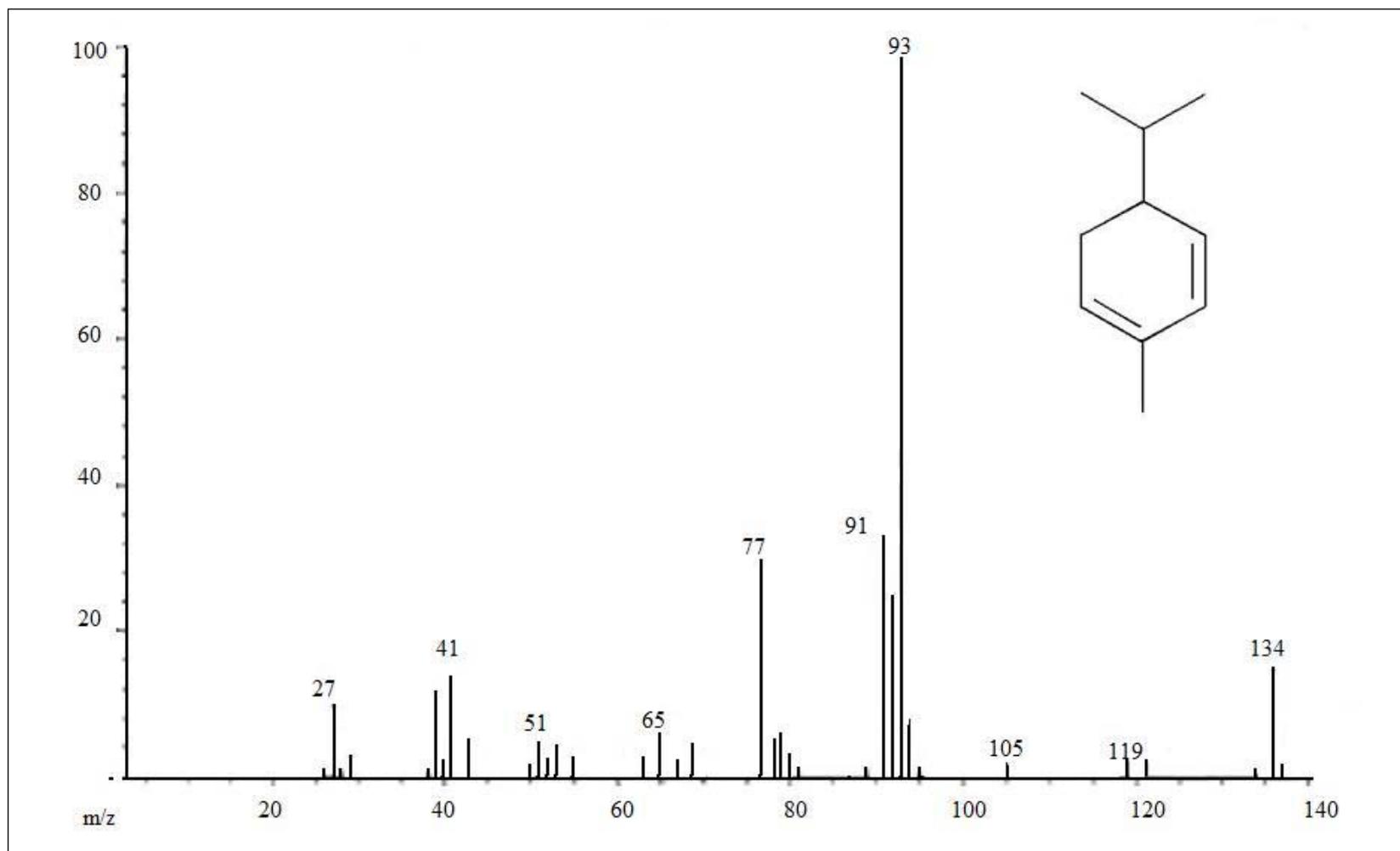
**Compuesto 4.**

$\alpha$ -mirceno (TR: SRS=ausente, SRL=8.44, Zapotitlán= ausente)



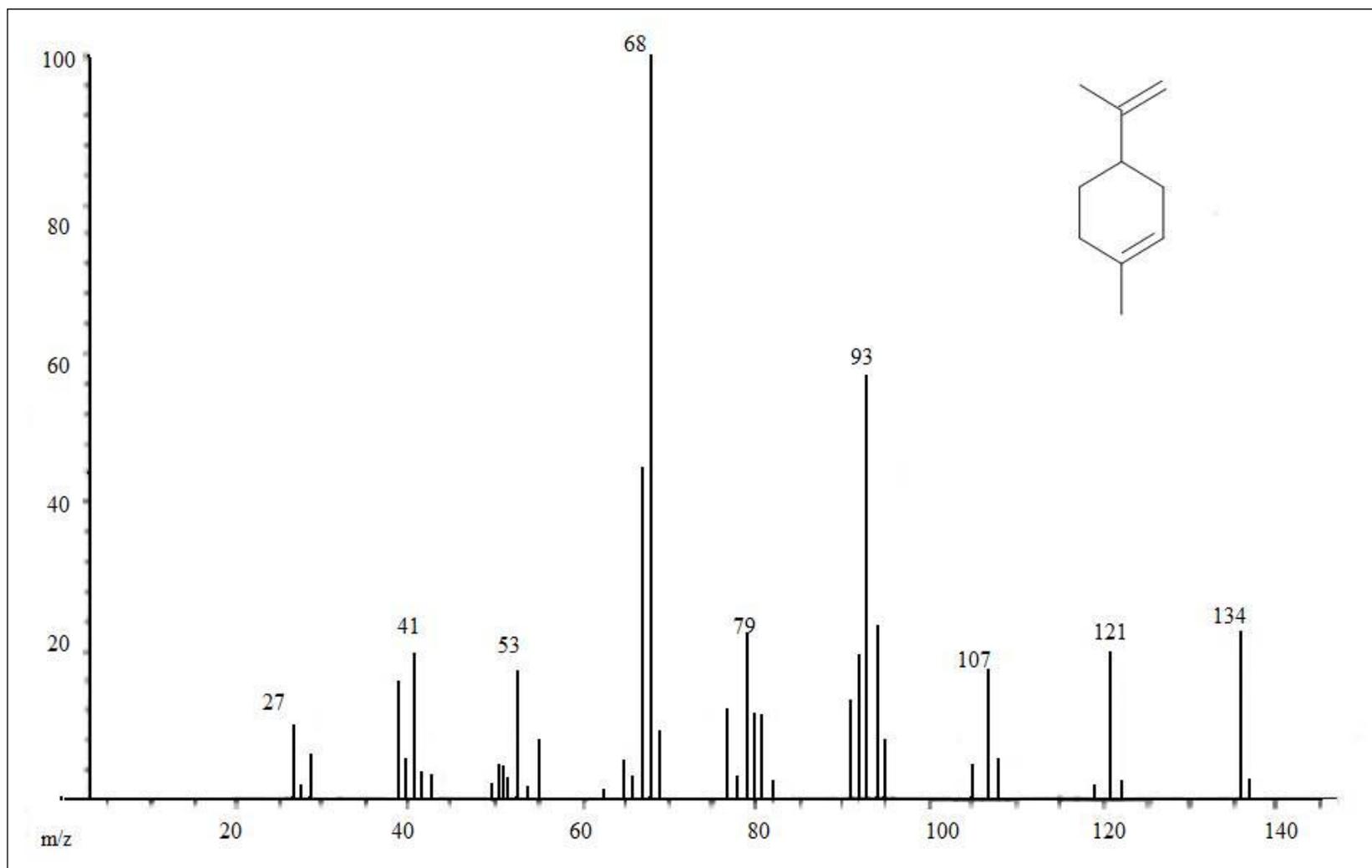
**Compuesto 5.**

$\alpha$ -felandreno (TR: SRS= ausente, SRL=78.73, Zapotitlán= ausente)



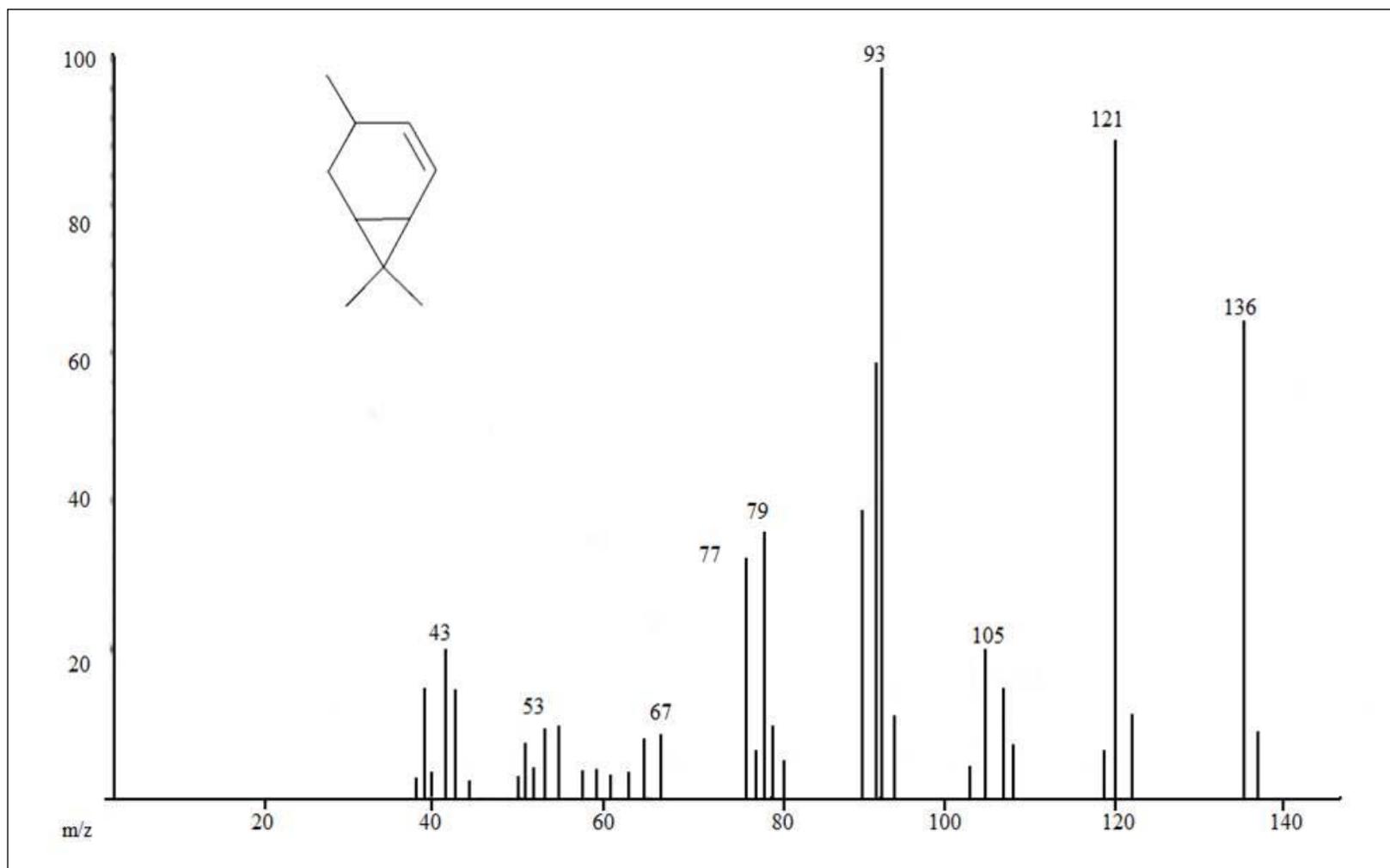
**Compuesto 6.**

D-limoneno (TR: SRS= 9.76, SRL=9.23, Zapotitlán= ausente)



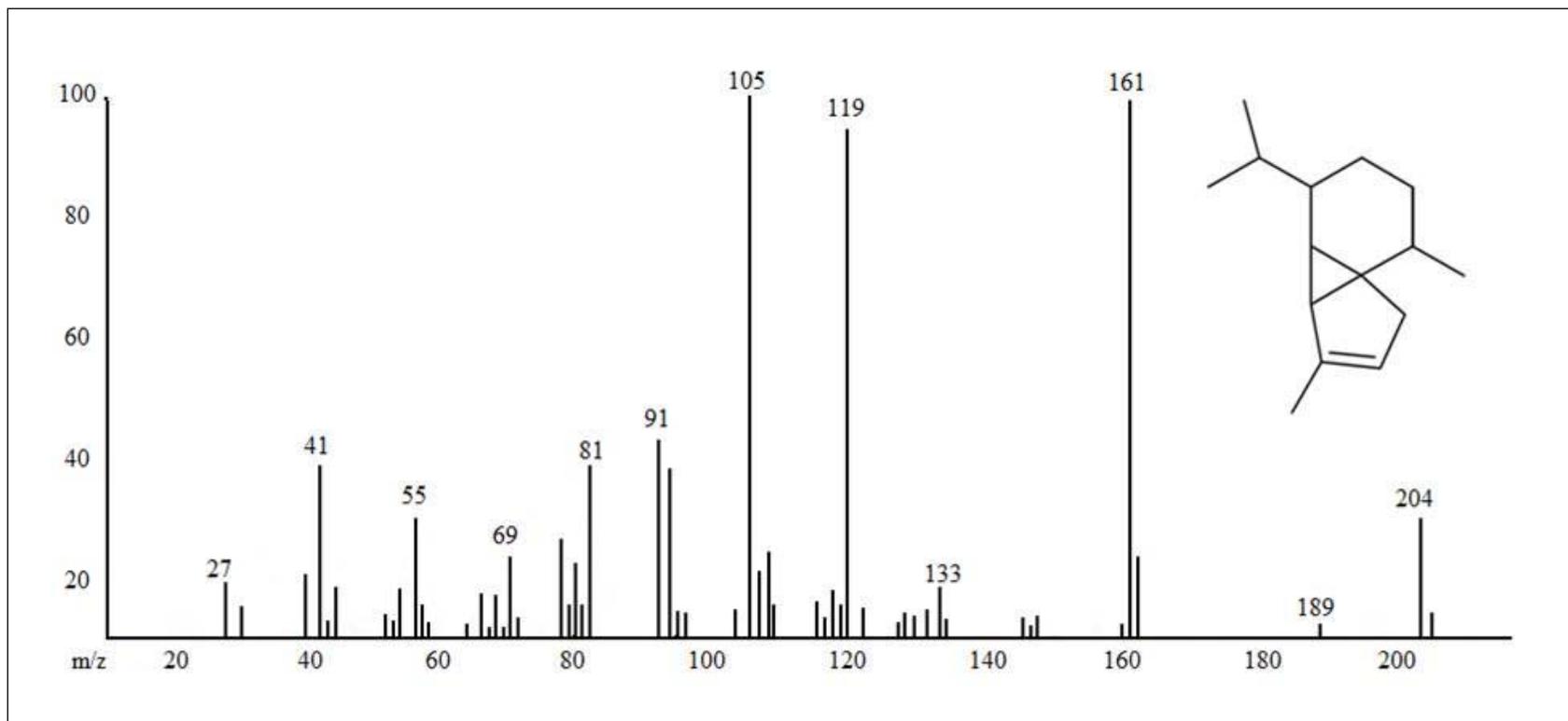
**Compuesto 7.**

4-careno (TR: SRS= ausente, SRL=14.98, Zapotitlán= ausente)



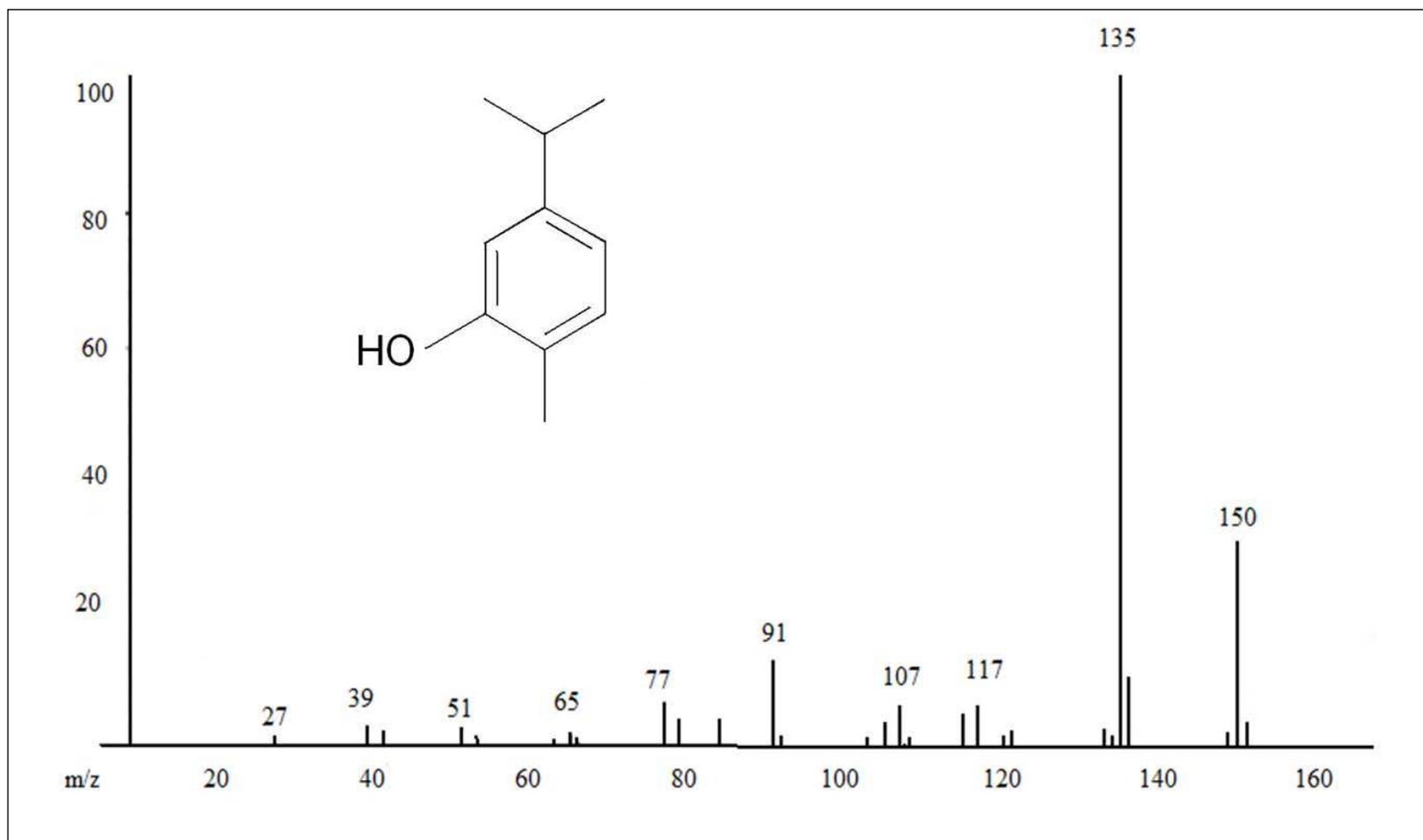
**Compuesto 8.**

$\alpha$ -cubebeno (TR: SRS= ausente, SRL=15.18, Zapotitlán= 16.32)



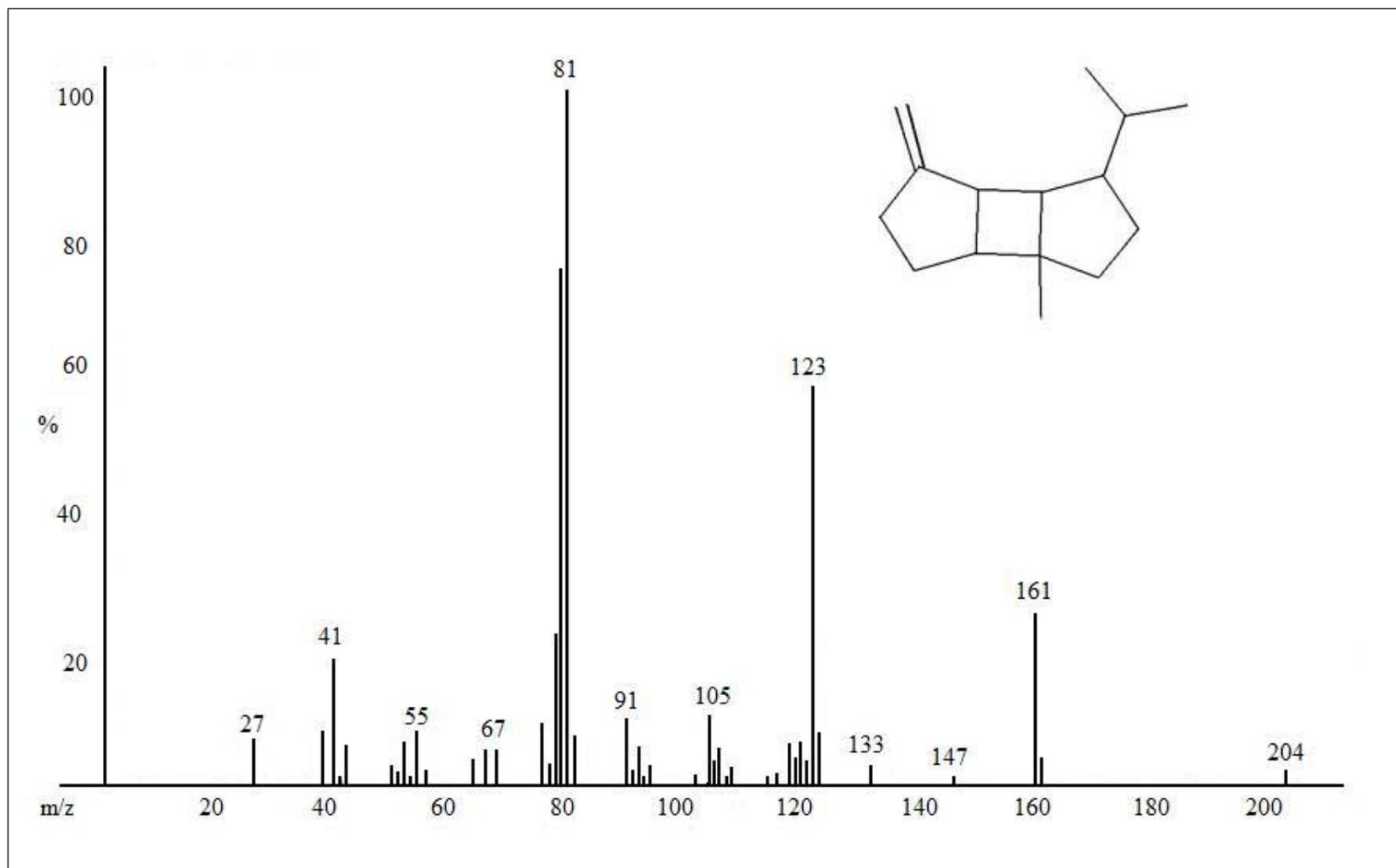
**Compuesto 9.**

Carvacrol (TR: SRS= 15.19, SRL= ausente, Zapotitlán= ausente)



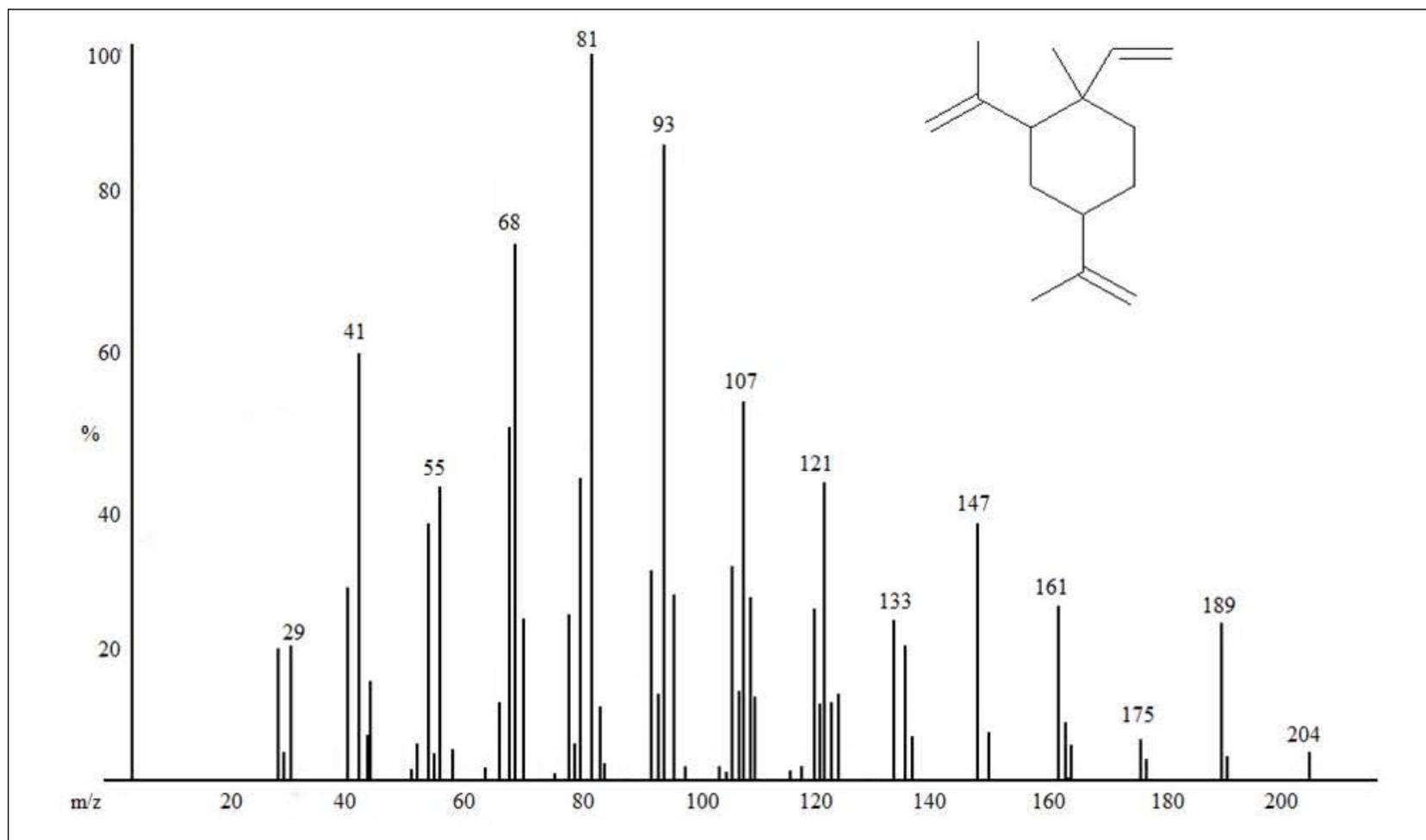
**Compuesto 10.**

decahidro-3a-metil-6-metileno-1-(1-metiletil)-, (1S-(1 $\alpha$ ,3 $\alpha\alpha$ ,3 $\beta\alpha$ ,& $\alpha\alpha$ ,& $\beta\alpha$ ))-Ciclobuta[1,2,3,4]diciclopenteno (TR: SRS= ausente, SRL=15.82, Zapotitlán= ausente)



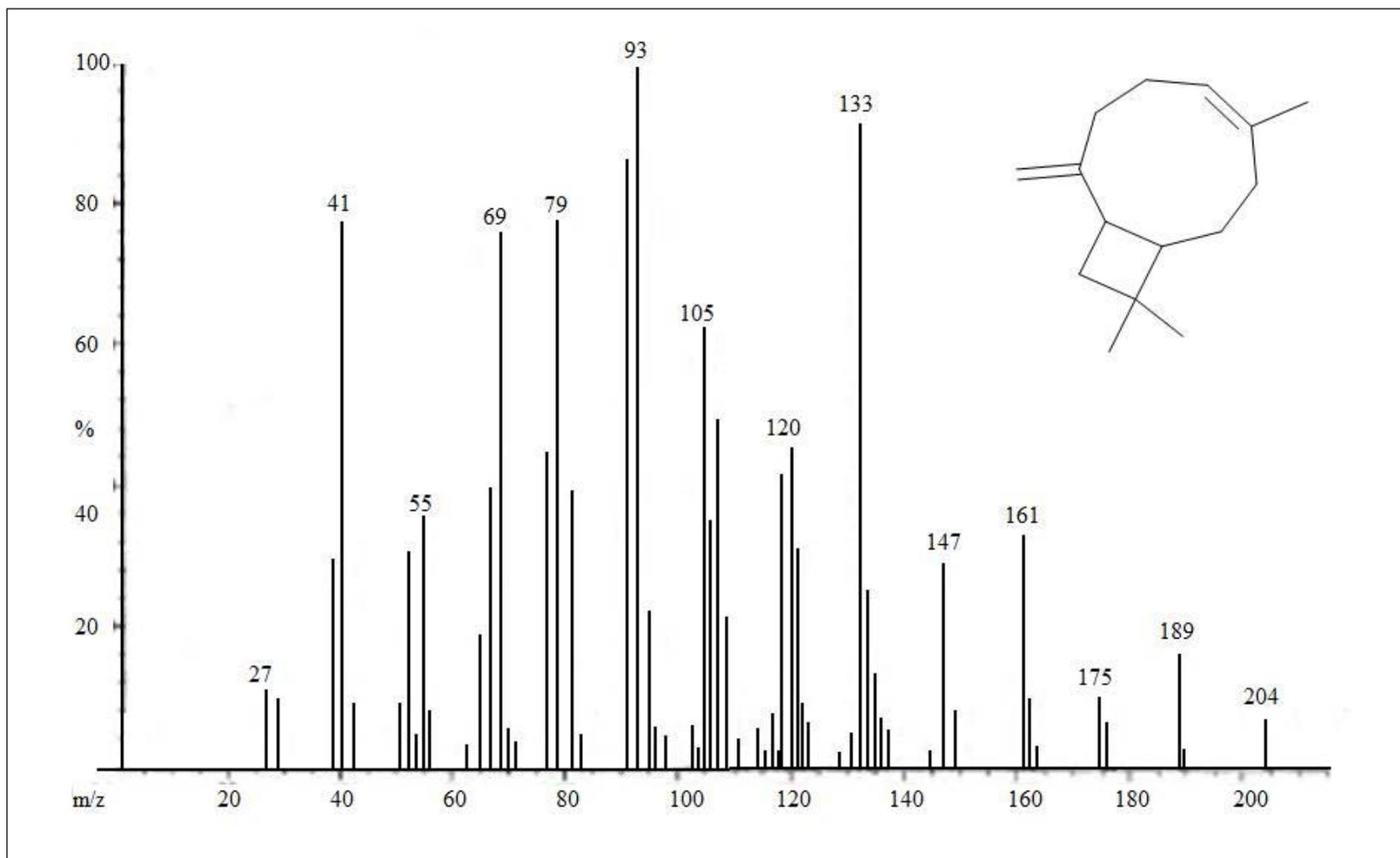
**Compuesto 11.**

1-etil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-, (1S-(1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ )- ciclohexano (TR: SRS= 16.9, SRL= 15.9, Zapotitlán= ausente)



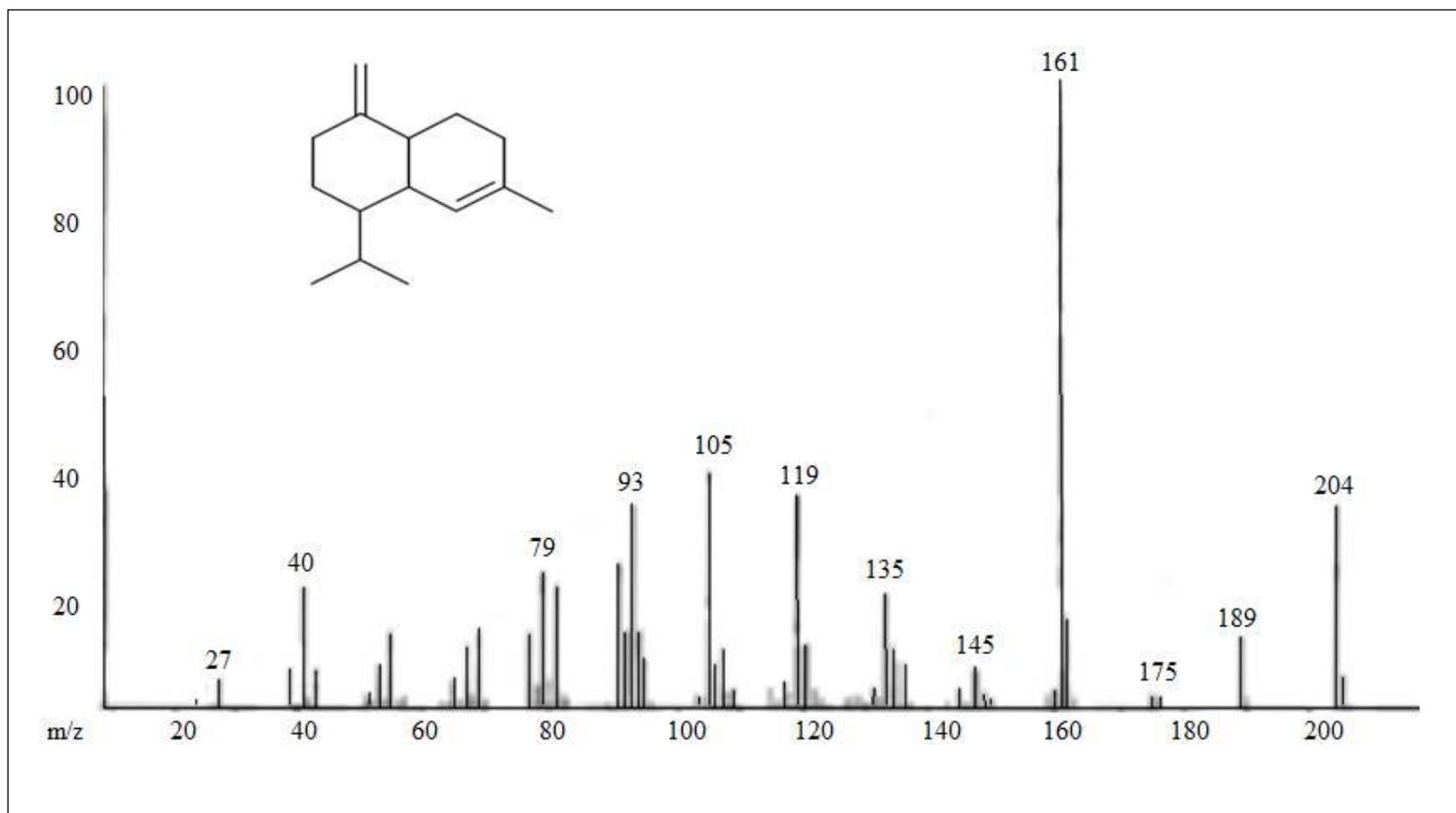
**Compuesto 12.**

Isocariofileno(TR: SRS= 17.45, SRL= 16.41, Zapotitlán= 17.97 )



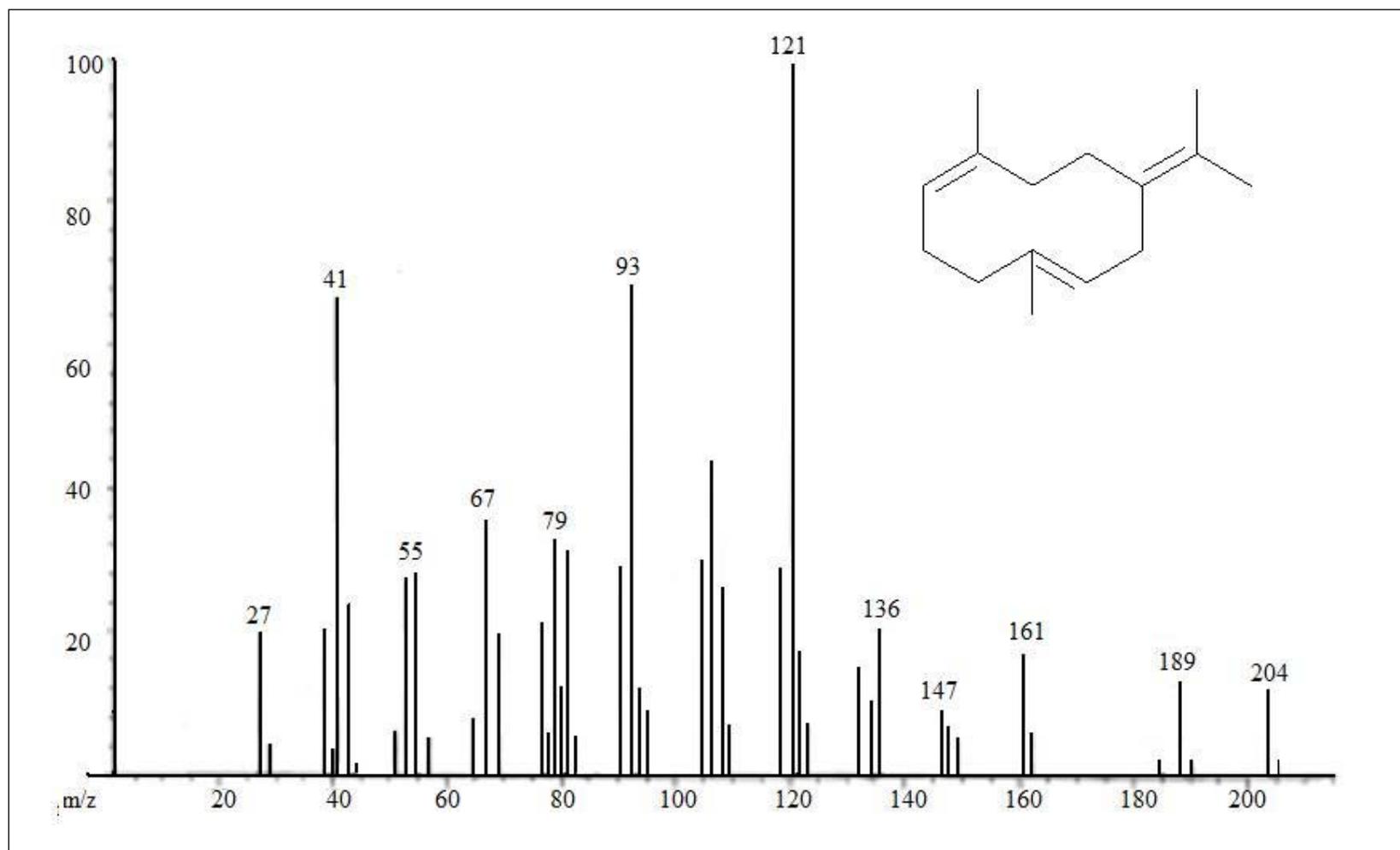
**Compuesto 13.**

Cadina 4(5), 10(4) dieno (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán=17.22 )



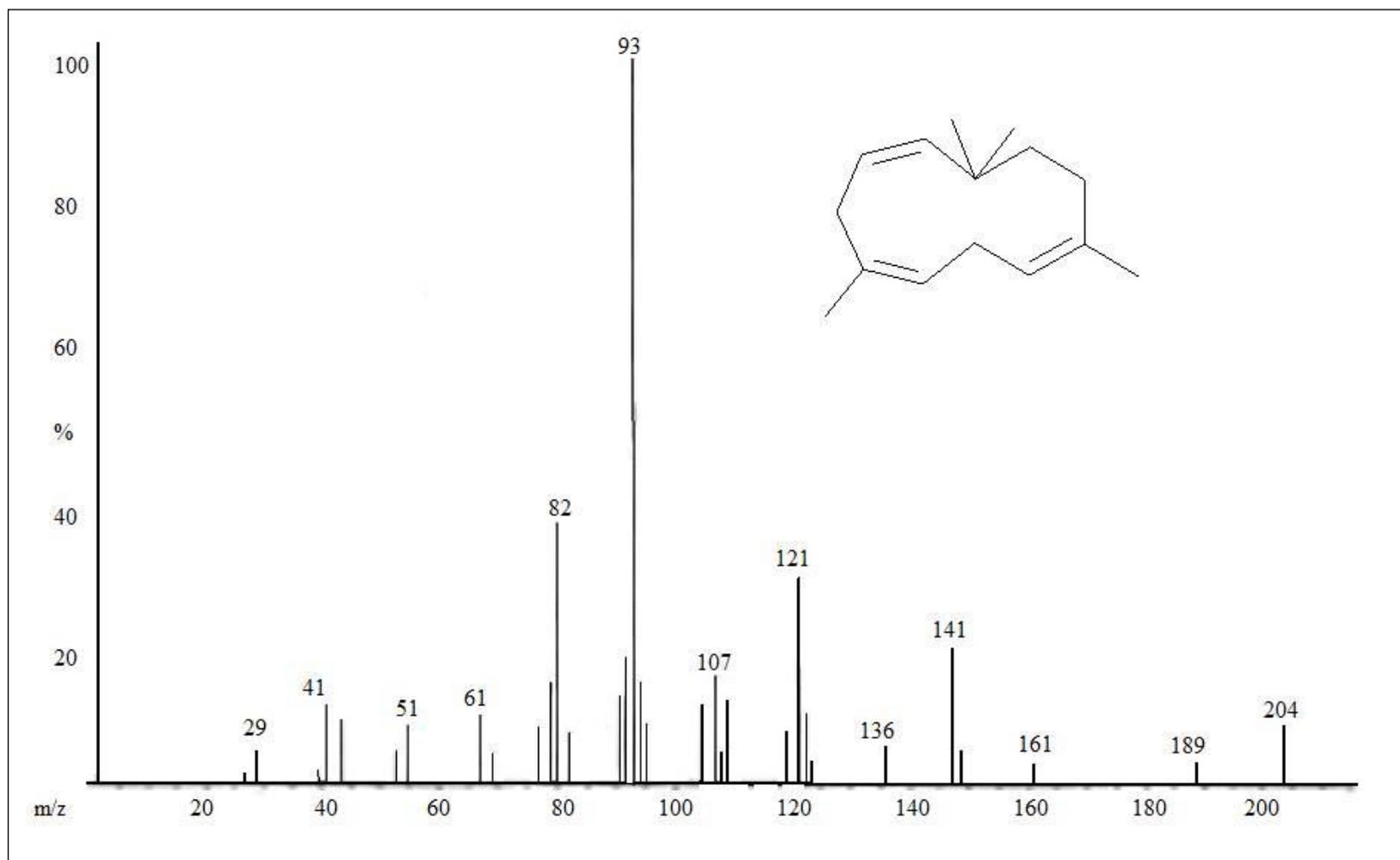
**Compuesto 14.**

1,5-dimetil-8-(1-metiletilideno)-, (E,E)-1,5-Ciclodecadieno (TR: SRS=17.61, SRL=18.58, Zapotitlán= ausente)



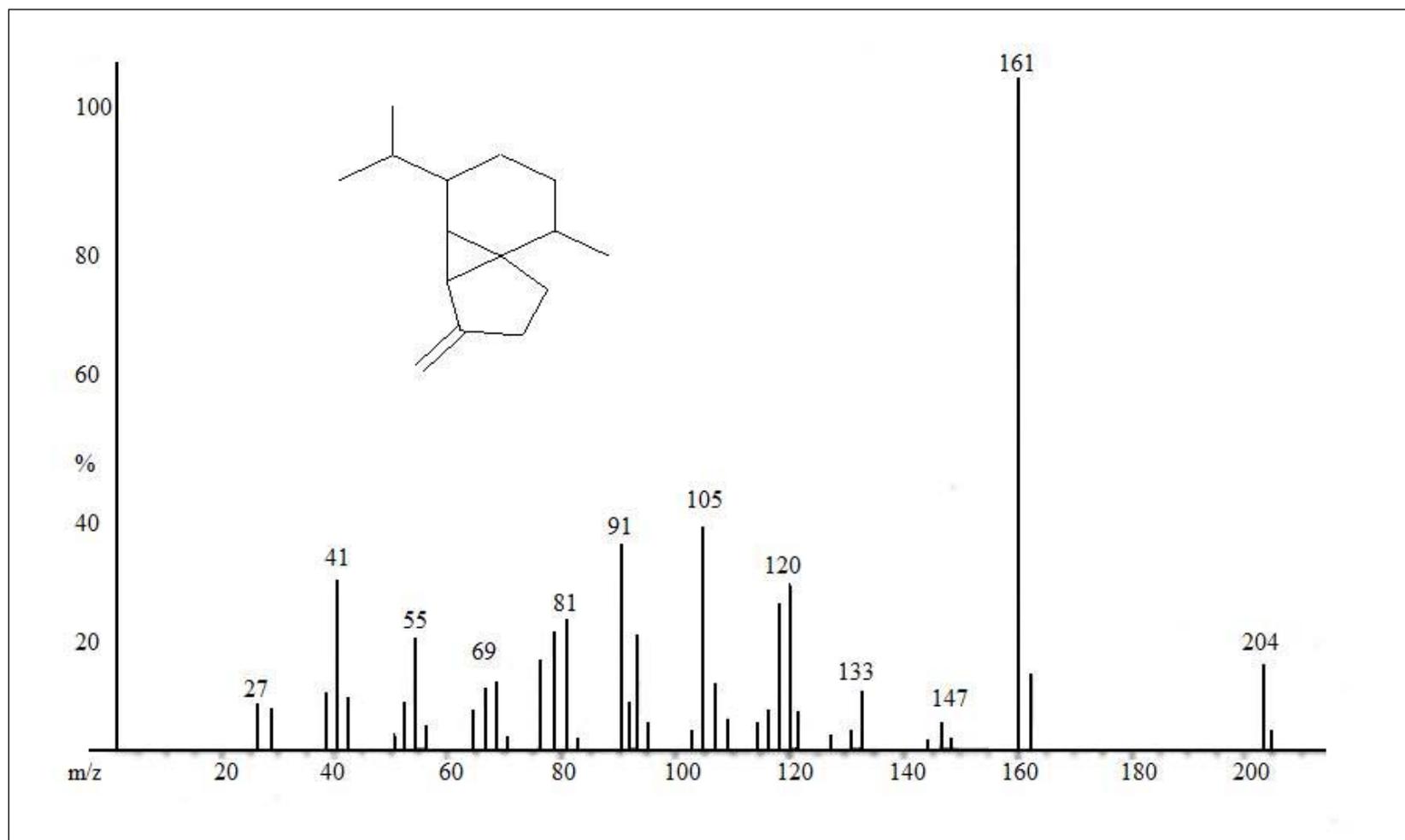
**Compuesto 15.**

Humuleno (TR: SRS= 18.02, SRL=16.95, Zapotitlán= ausente)



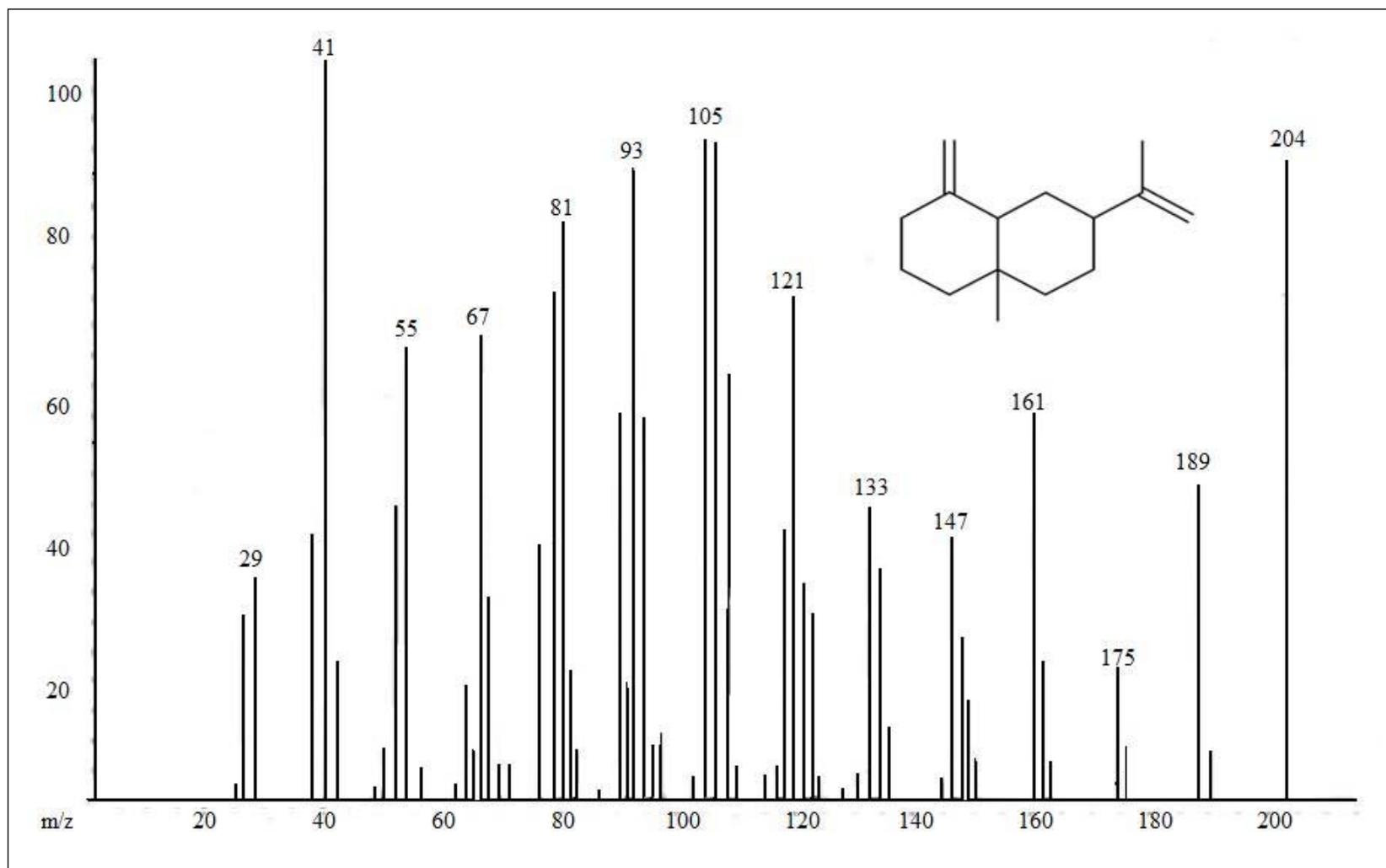
**Compuesto 16.**

$\beta$ -cubebeno (TR: SRS=18.48, SRL=17.37, Zapotitlán= ausente)



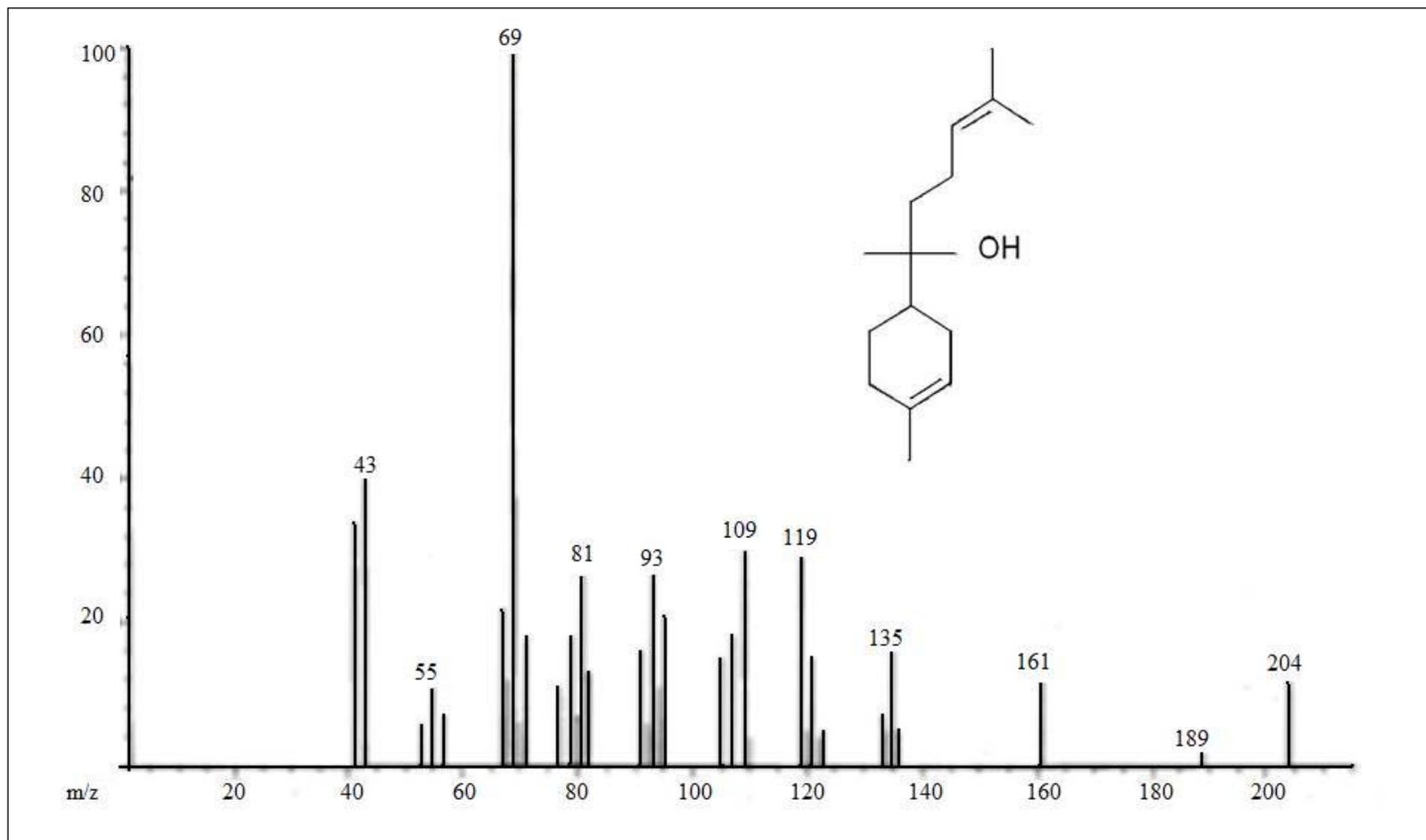
**Compuesto 17.**

Selineno (TR: SRS=18.58, SRL=17.47, Zapotitlán= 19.32)



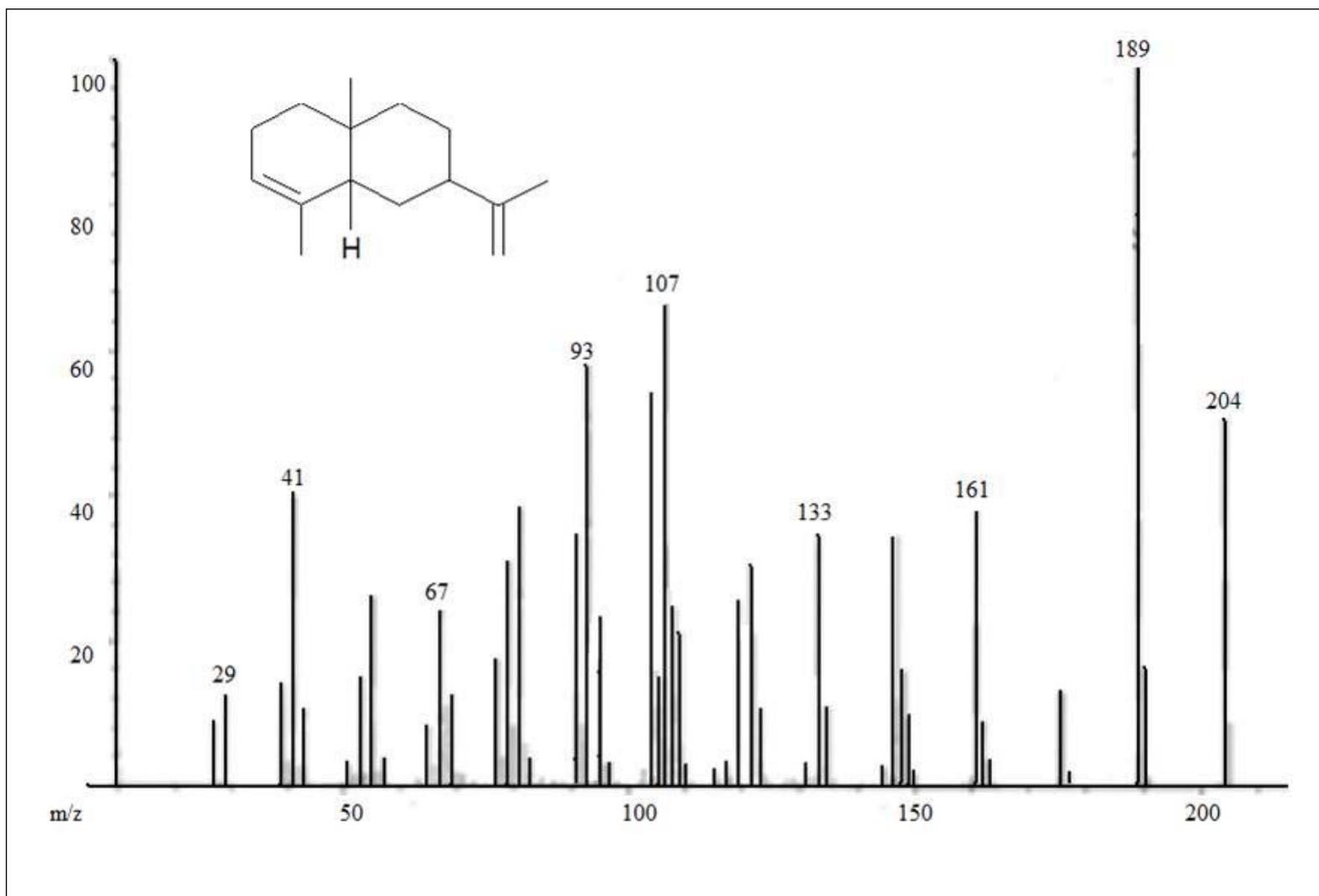
**Compuesto 18.**

$\alpha$ ,4-dimetil- $\alpha$ -(4-metil-3-pentenil)-,(R-(R\*,R\*))-3-ciclohexano-1-metanol (TR: SRS= ausente, SRL=18.22, Zapotitlán= ausente)



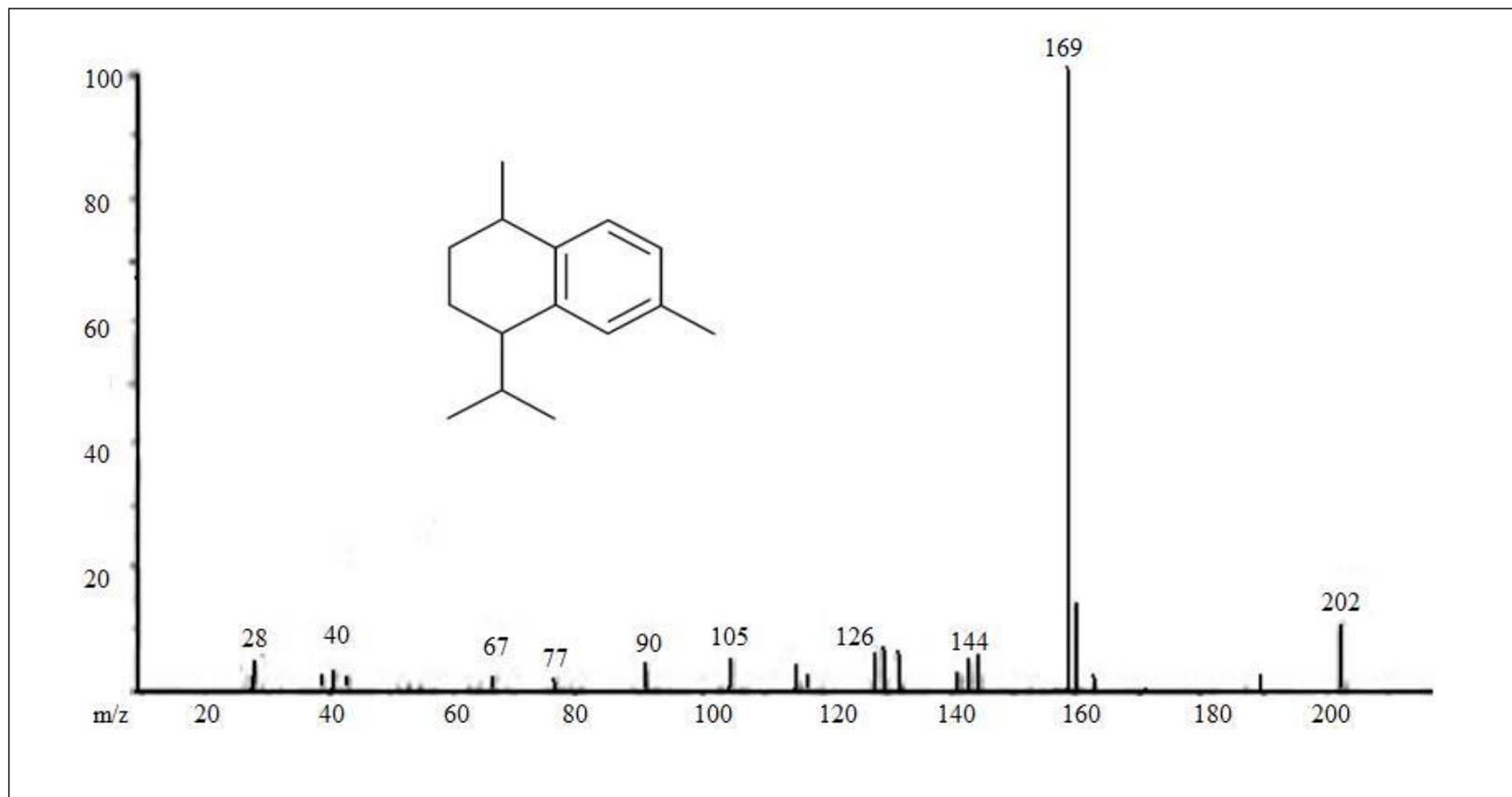
**Compuesto 19.**

2-isopropenil-4a,8-dimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno (TR: SRS= 18.71, SRL= ausente, Zapotitlán= ausente)



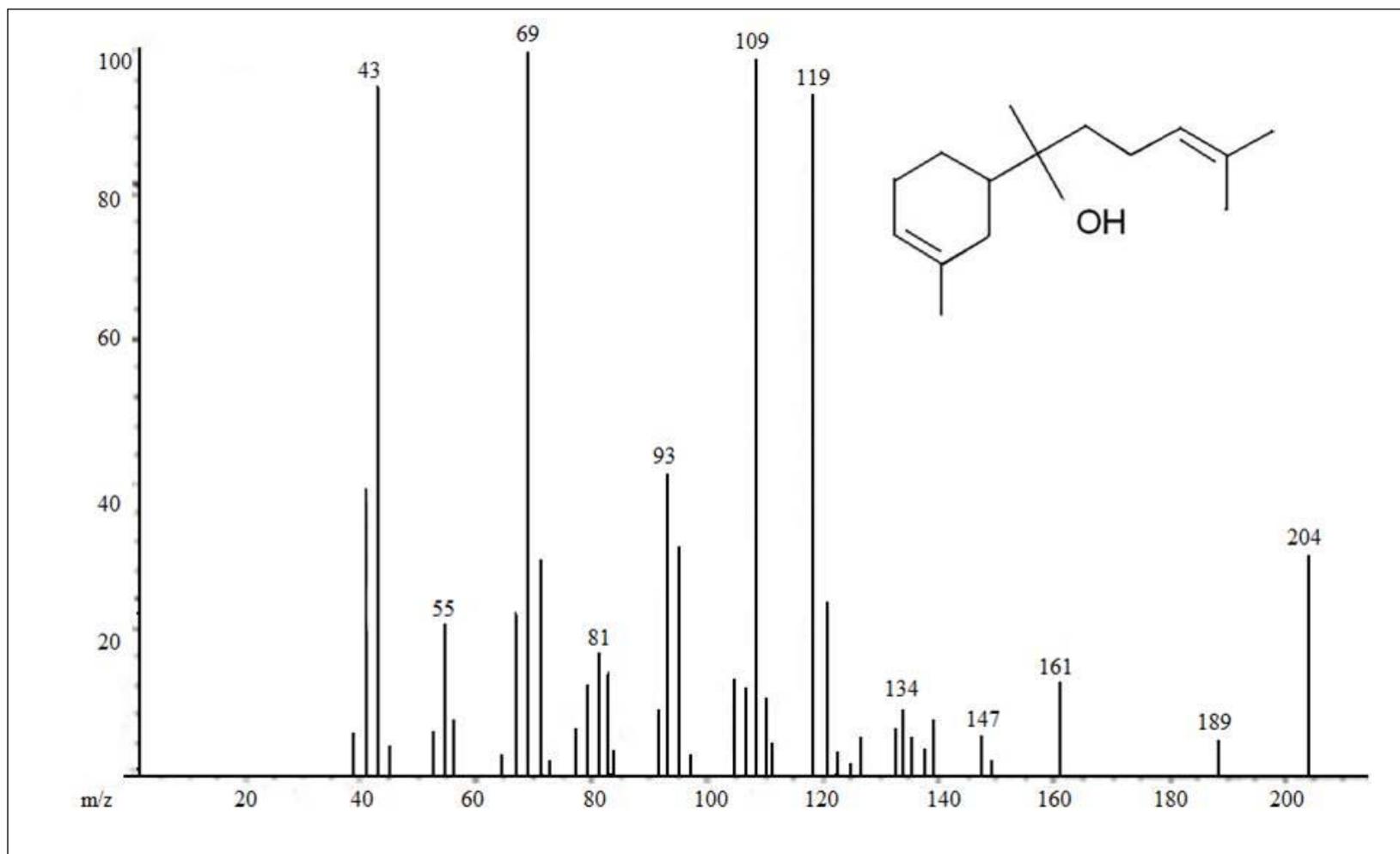
**Compuesto 20.**

Calameneno (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán= 19.88)



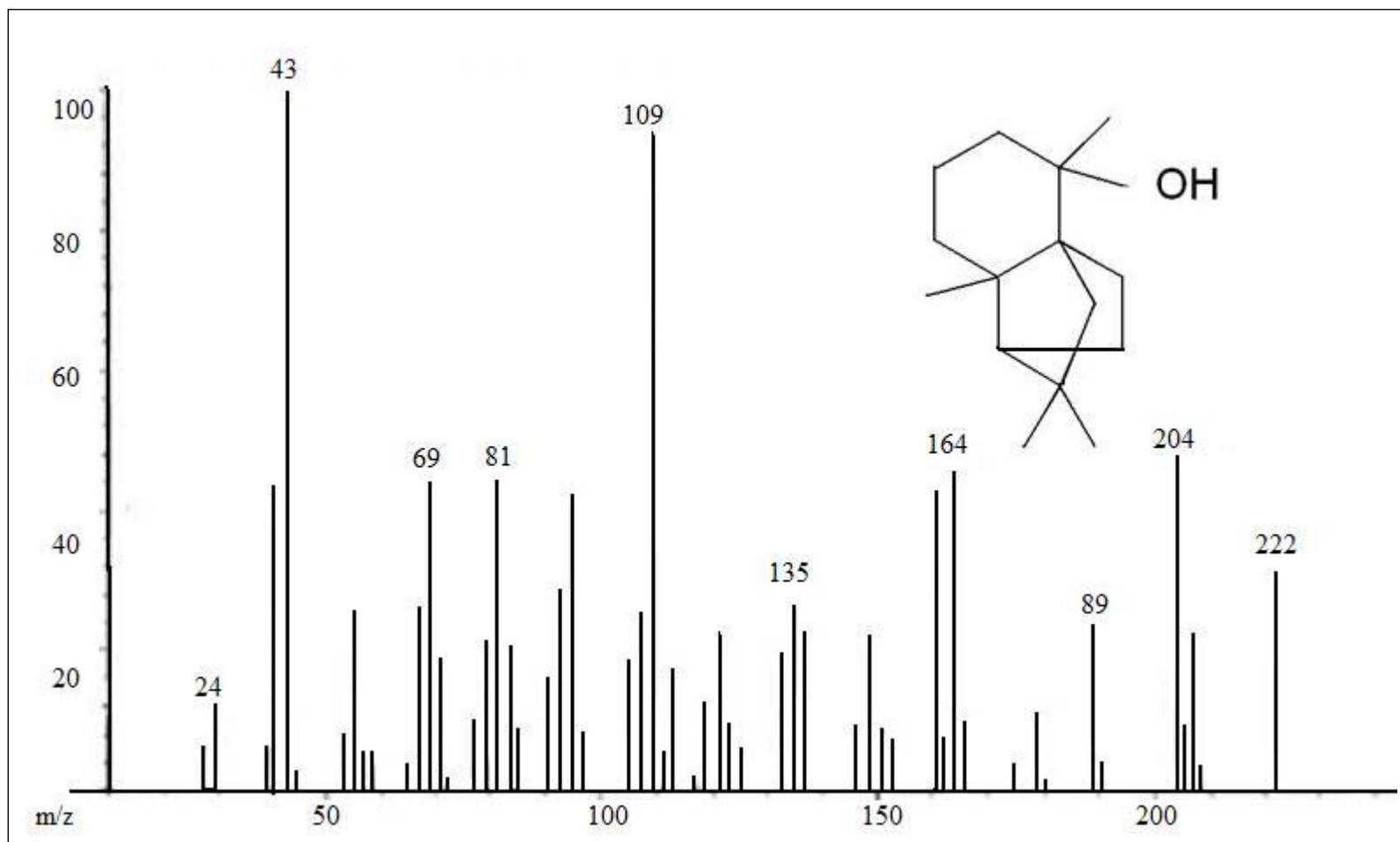
**Compuesto 21.**

$\alpha$ -bisabolol (TR: SRS= ausente, SRL= 20.36, Zapotitlán= ausente)



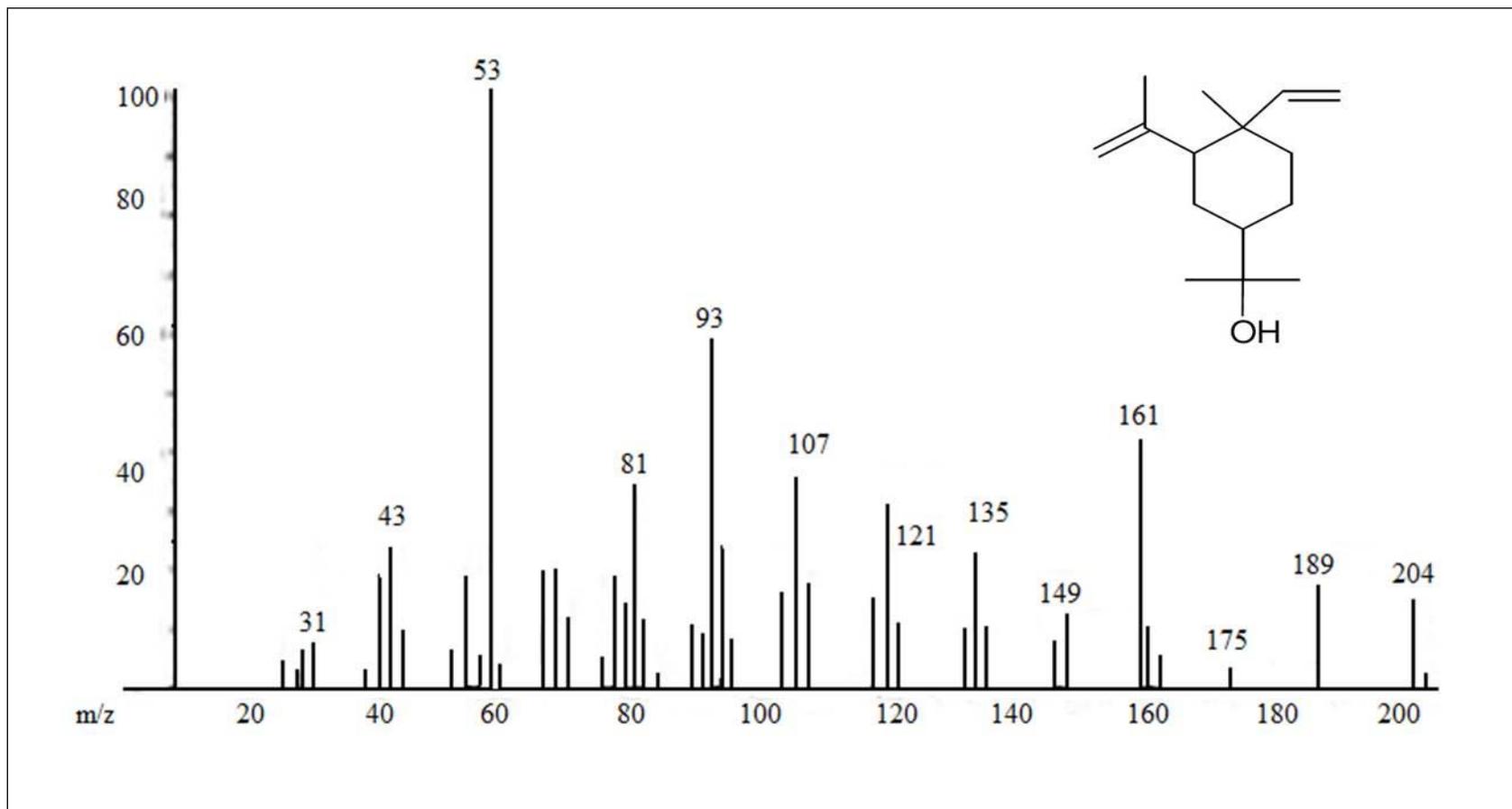
**Compuesto 22.**

Octahidro-2,2,4,7a-tetrametil-1,3a-etanol(1H)inden-4-ol (TR: SRS= 20.6, SRL= ausente, Zapotitlán= ausente)



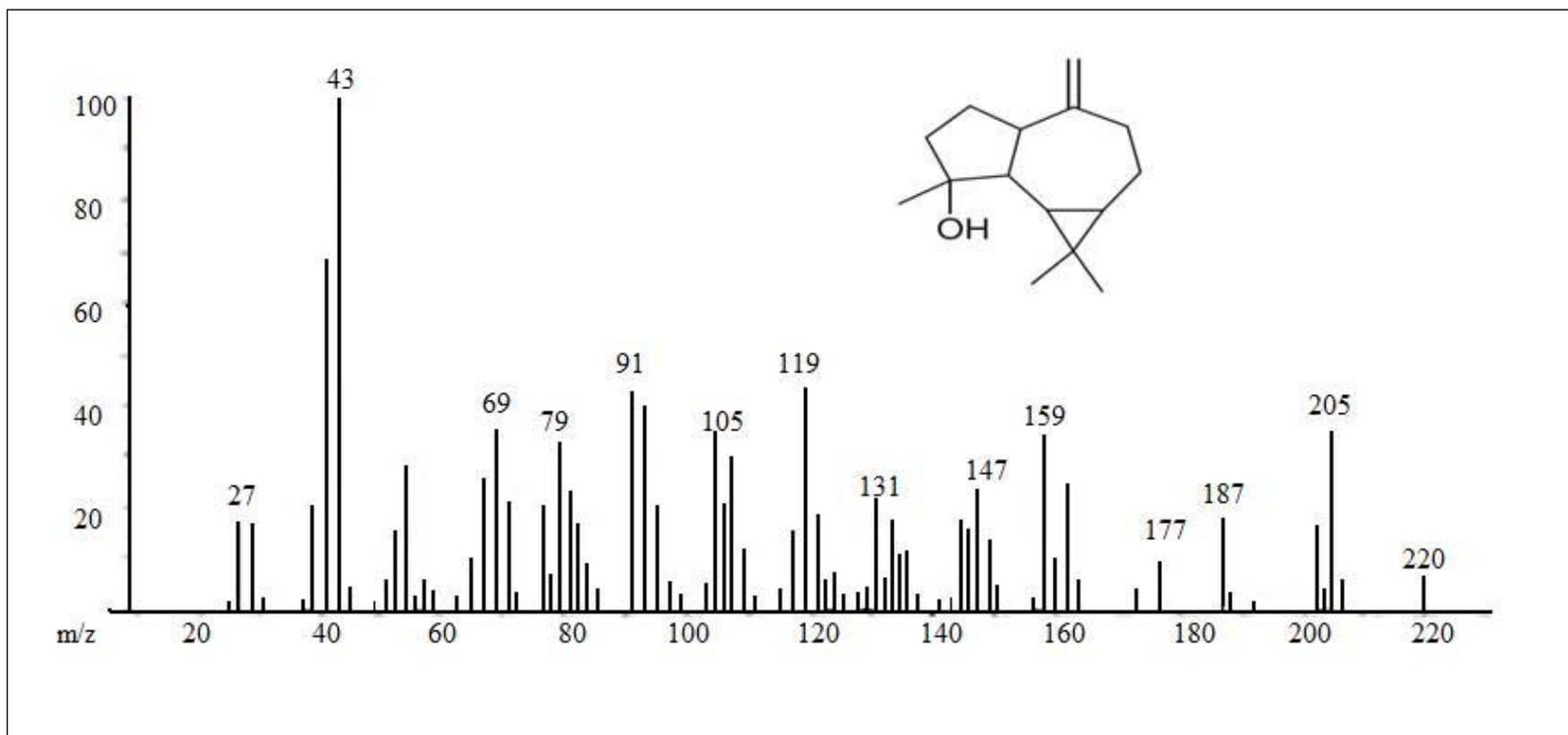
**Compuesto 23.**

4-metil,4-etenil-3-(1-metil etenil)1-(1-metil metanol)ciclohexano (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán= 20.66)



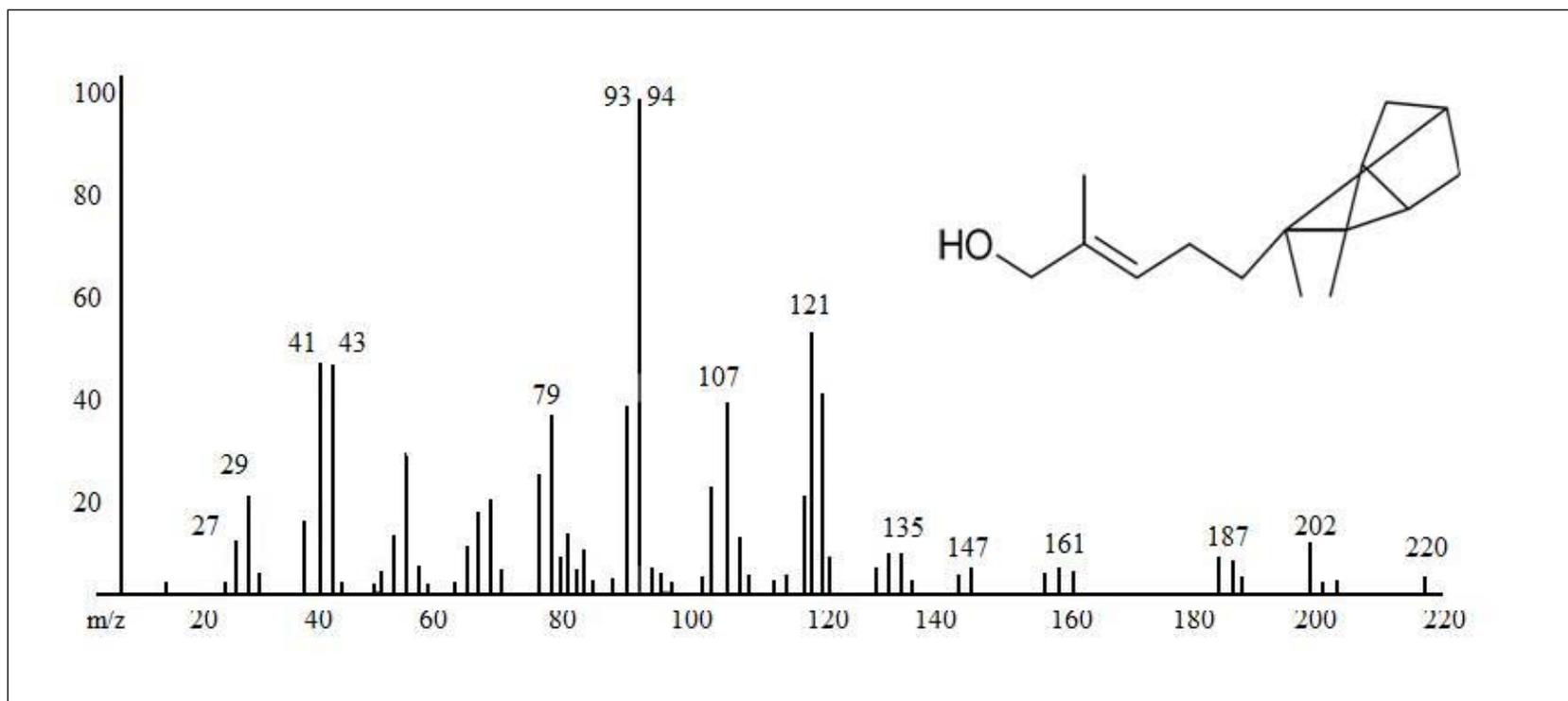
**Compuesto 24.**

Espatulenol (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán= 21.19)



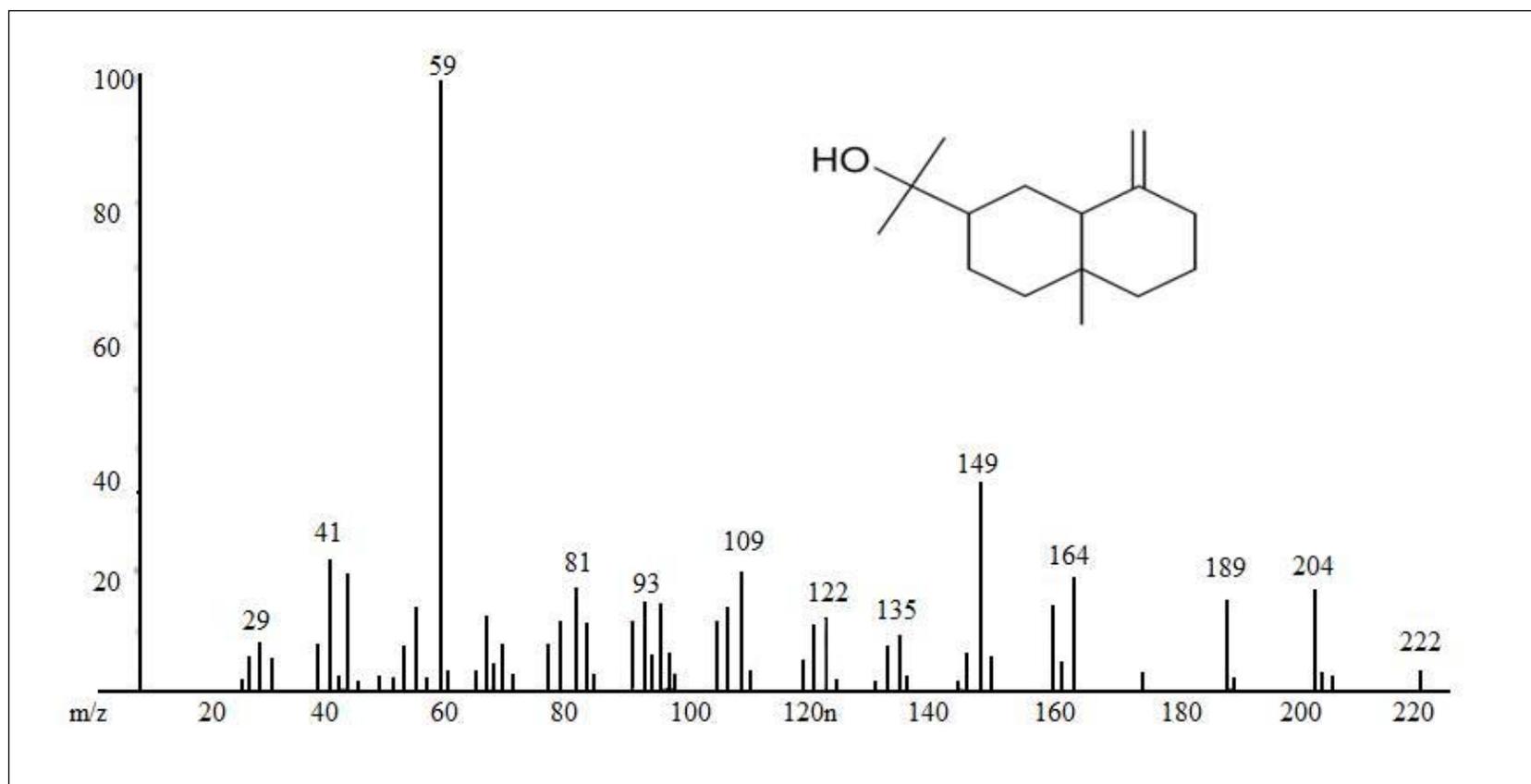
**Compuesto 25.**

5-(2,3-dimetiltriciclo 2.2.1.0<sup>2,6</sup> hept-3-y1)-2-metil-2-penten-1-ol (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán= 21.32)



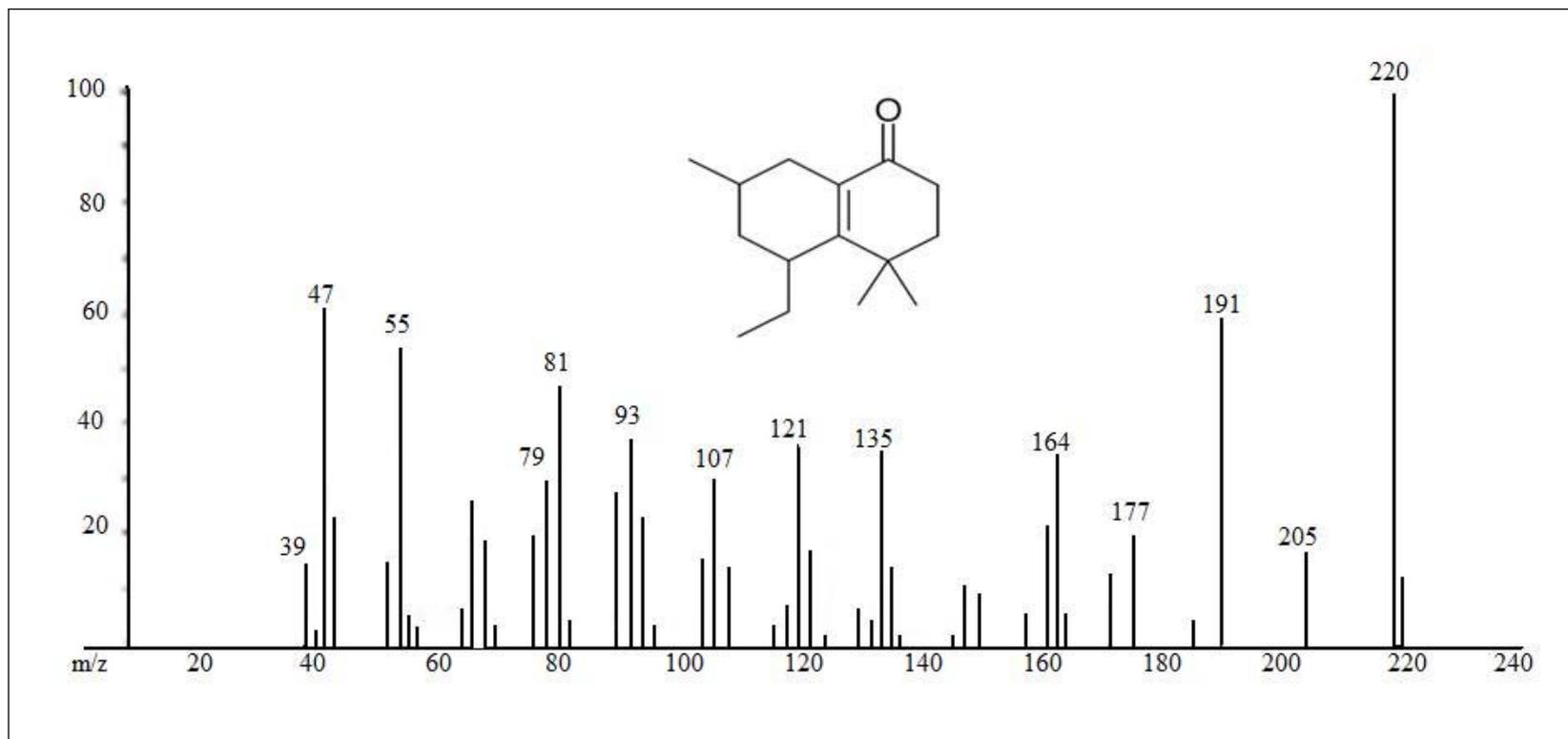
**Compuesto 26.**

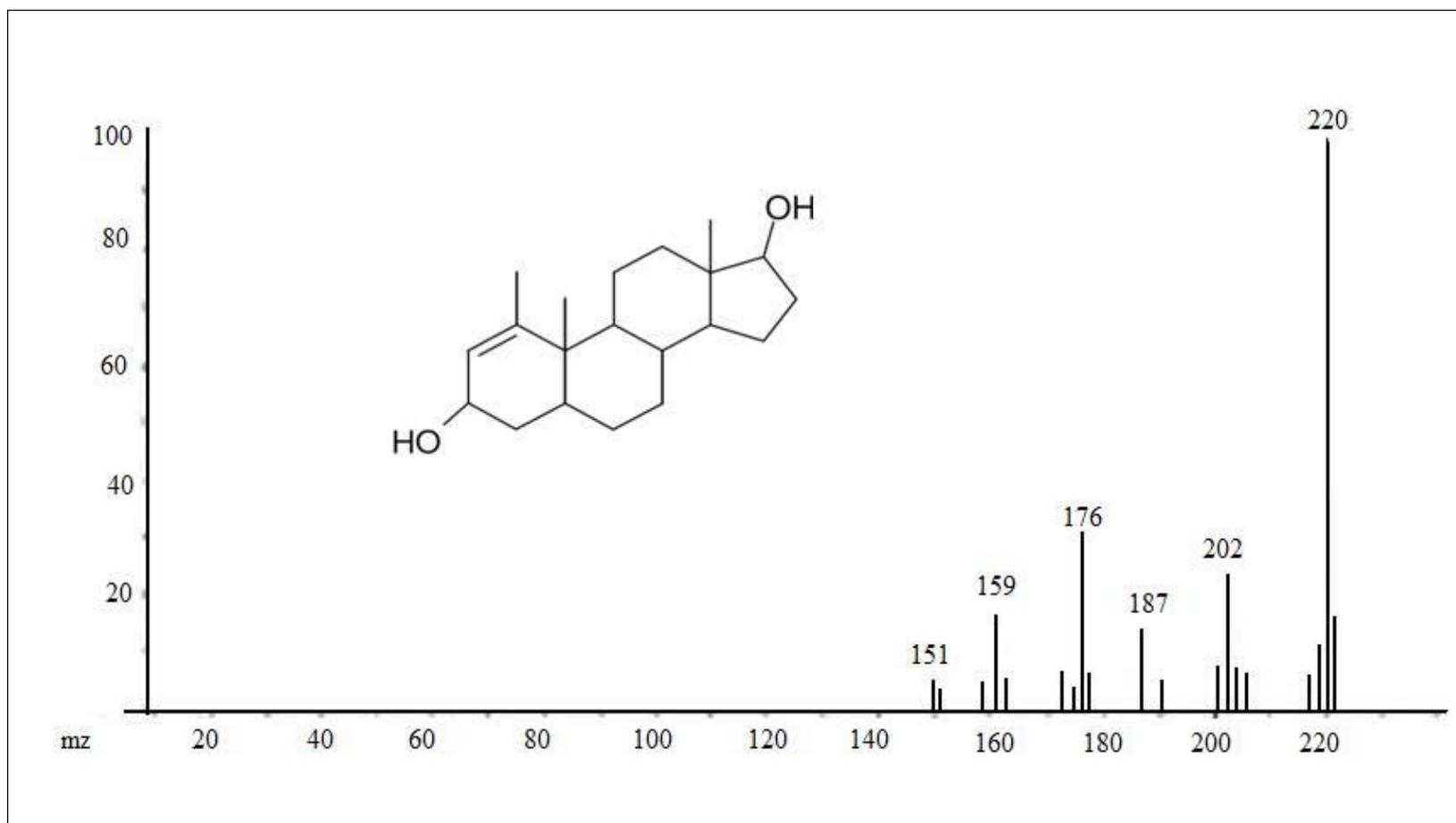
$\beta$ -eudesmol (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán= 22.67)



**Compuesto 27.**

Hexahidro-2,5,5-trimetil-2H-2,4a-etanonaftalen-8(5H)-ona (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán= 24.05)



**Compuesto 28.**1-metil-, $(3\beta,5\alpha,17\beta)$ -androst-1-ene-3,17-diol (TR: SRS= ausente, SRL= ausente, Zapotitlán= 26.25)

## BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar, C. A., Camacho, J. R., Chino, S., Jácquez, P. y López, M. E. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social: Información Etnobotánica. Edición del IMSS México. 129-130pp
- Aguilar, N. M. G. 2000. Determinación de la actividad antimicrobiana en algunas plantas medicinales. Tesis. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 46 pp.
- Andriole, V. T. 1999. The Garrod lecture; Current and future antifungal therapy, new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44:151-162.
- Argueta, V. A. y Cano, A. J. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. 1193pp.
- 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. 111pp.
- Ávila, O. 2006. Composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cordia Curassavica* (Jacq) Roemer & Schultes: Boraginaceae: (Barredor). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 57pp.
- Berdonces, J. L., Preciado, I., Ródenas, P., Sanés, A. y Uriarte, X. 1995. Las plantas medicinales hoy día. *Natura Medicatrix*. 34: 37-38.
- Beyra, A., León, M., Iglesias, E., Ferrándiz, D. Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Guimaraes, M. y Álvarez, R. 2004. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camaguey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 61(2):185-204

- Bruneton, J. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Ed. Acribia. México. 593 pp.
- Carson, C. F., Hammer, K. A. & Riley, T. V. 2006. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*. 19: 50-62.
- Carvalho, P. M., Rodríguez, R. F. O., Sawaya, A. C. H. F., Márquez, M. O. M. y Shimizu, M. T. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*. 95: 297-301.
- Coelho de Souza, G., Haas, A. P. S., Von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., Elisabetsky, E. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 90:135-143.
- Conner, D. E. 1993. Naturally occurring compounds. In Davidson y A. L. Brunen (Eds). *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker, Inc. 441-468 pp.
- Dávila, P., Arizmendi, M. C., Valiente, B. A., Villaseñor, J. L., Casas, A. y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México, *Biodiversity Conservation*. 11: 421-442.
- Dávila, A. P., Lira, S. R., Paredes, F. M., Blanckaert, I. y Rosas, L. R. 2002. La flora útil de dos comunidades del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Zapotitlán Salinas y San Rafael Coxcatlán, Puebla. Informe final del proyecto TO15. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- De la Cruz, G. R. 1986. Mecanismos de resistencia de las enterobacterias a los antibióticos betalactámicos (segunda parte). *Infectología*. 192-203pp.
- Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Revisión: Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16(4): 385-393

- Domínguez, S., Xorge, A. 1973. Métodos de Investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 pp.
- Donald, L., Mortensen, J., Fraimow, H.S. y Calandra, G.B. 1995. Antimicrobial resistance: A crisis in health care. New York: Plenum. 248 pp.
- Dorman, H. J. D. y 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.
- García, L. C. 2006. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila. 104 pp.
- Gillén, M. D. and Manzanos, M. J. 1998. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. *Plant Food Chemical* 63:373-383.
- Gómez, N. E., Witte, L. Y Hartmann, T. 1999. Chemical defense in larval tortoise beetles: Essential oil composition of fecal shields of *Eurypedus nigrosignata* and foliage of its host plant, *Cordia curassavica*. *Journal of Chemical Ecology*. 25:1007-1027.
- Gómez, P. A. 1985. Los recursos bióticos de México (Reflexiones). INIREB. Xalapa, Veracruz. Alhambra Mexicana. 122 pp.
- Griffin, S. G., Wyllie, S. G. Markham, J. L. y Leach, D. N. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavor and Fragrance Journal*. 14:322-332.

- Groombridge, B. 1992. Global biodiversity, status of the earths living resources. Chapman y Hall, Londres. 585 pp.
- 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.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V. 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53:1081- 1085.
- Harborne, J. B. 1988. Introduction to ecological biochemistry. Editorial Academia Press. USA. 354 pp.
- Harborne, J. B. y Tomas- Barberan, F. A. 1991. Ecological Chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Editorial Clarendon Press-Oxford. USA. 439 pp.
- Harborne, J. B. and Baxter, H. 1993. *Phytochemical Dictionary- A Handbook of Bioactive Compound from Plants*. London. 976 pp.
- Harborne, J. B. y Williams, A. C. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55:481-504.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Durán, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A and Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants use in tradicional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México), *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 181-188.

- Hernández, T., Canales, M., Terán, B., Ávila, O., Duran, A., García, A. M., Hernández, H., López, A.O., Fernández, A. M y Avila, G. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 111:137–141.
- Huerta, C., 2002. La Herbolaria, Mito o Realidad. *Conabio* (12), México. 3:1-7
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeol, K., Akao, M., Nishiyama, Y. y Yamaguchi, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact mycoses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43:17-23.
- Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47:565-573.
- Ioset, J. R., Marston, A., Gupta, M. P., y Hosteitmannt, K. 1998. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnaei*. *Phytochemistry*. 47(5): 729-734.
- Ioset, J. R., Marston, A., Gupta, M. P. y Hostettmann, K. 2000. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry*. 53:613-617.
- 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, W. E. 1985. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México. 461 pp.
- Kubo, Y. 1993. Antimicrobial activity of green tea flavor components. En bioactive volatile compounds from plants. Editores American Chemical Society. E. U. A.

- Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega, Barcelona. 515 pp.
- Lans, C., Harper, T., Georges, K. y Bridgewater, E. 2000. Medicinal plants used for dogs in Trinidad y Tobago Preventive Veterinary Medicine. 45:201-220.
- Medina, S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (cactaceae) a lo largo de una cronosecuencia edáfica en un avanico aluvial en Coxcatlán, Valle de Tehuacán. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 90 pp.
- Mesa, A. A. C., Bueno, S. J. G. y Betancur, G. L.A. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. Revista Especializada de Química terapéutica 17:325-331.
- Morales de Godoy, V. 1996. Extracción y caracterización del aceite esencial de Lima Thaltí *Citrus acrantifolia* (Chritms) Swingle. Trabajo especial de grado. Facultad Experimental de Ciencias, Mara Calbo, Venezuela. 18-19 pp.
- Nakamura, N., Kojima, S., Lim, A. L., Meselhy. M. R., Hattori, M., Gupta, M. P., y Correa, M. 1997. Dammarane type triterpenes from *Cordia spinescens*. Phytochemistry. 46: (6): 1139-1141.
- Olarte, J. and de la Torre, J. 1959. Resistencia of *Shigella flexneri* to tetracyclines, chloramphenicol and streptomycin. A study of 131 freshly isolated strains. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 8:324-326.
- Osorio, D. E. J. 2009. Aspectos básicos de farmacognosia. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. 129 pp.
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. y Kreg, N. R. 1998. Control of microorganisms, the control of

- microorganisms by physical agents. In Microbiology. New York: Mc Graw-Hill International. 469-509 pp.
- Ramirez, M. R. 2006. Rastreo de la actividad antimicobacteriana de los extractos de plantas medicinales de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Posgrado de Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. 125 pp
- 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* (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 98: 195-200.
- Rios, J. L. y Recio, M. C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:80-84.
- Romo de Vivar, A. 1985. Productos naturales de la flora Mexicana. Limusa. México. pp. 59-67.
- Rzedowski, J. 1973. Geographical relationships of the flora of Mexican dry regions. In *Vegetation and vegetational history of northern Latin America*. Elsevier Scientific Company. Amsterdam. 61-62.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México. 432 pp.
- Santos, P.R., Nunez, P.E., Nascimento, F.R., Santiago, P. G. M., Menezes, A, H, G, Silveira, R. E. y Pessoa, L. O. D. 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the northeast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 17:1027-1030.
- [Secretaria de Salud. 2007. Comisión nacional de vigilancia epidemiológica. http://portal.salud.gob.mx/contenidos/alertas/alertas.html.](http://portal.salud.gob.mx/contenidos/alertas/alertas.html)

- Sikkema, J., de Bont, J. A. M. and Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269:8022-8028.
- Shiva R. C. M. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Facultad de veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Skrubis, B., Markakis, P. 1976. The effect of photoperiodism on the growth and essential oil of *Ocimum basilicum* (sweet basil). *Economic Botany*. 30:389-393.
- Smith, P. A., Stewart, J. y Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26:118-122.
- Terán, C. B. 2006. Actividad antibacteriana y antifúngica de *Cordia curassavica* (Jacq) Roemer y Schultes (barredor). Tesis de Licenciatura de Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México. 60 pp.
- Ultee, A., Kets, E. P. y Smid, E. J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4606-4610.
- Vanden Berghe, D. A., y Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. In: *Methods in plant biochemistry*. Vol.6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. 47-71 pp.
- Wang, H. Y Bun, T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61:1-6.
- Zahner, H. and Maas, W. K. 1972. *Biology of antibiotics*. Springer-Verlag, New York. 125 pp.