



UNAM IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**"Actividad antimicrobiana del aceite esencial de
Cordia globosa (Jacq.) Kunth."**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
MELISSA ILIAN MIGUEL ESPEJEL

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. Rafael Lira Saade.

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Dra. Claudia Tzásna Hernández Delgado.

M.C. Ana María García Bores.

Biól. Luis Barbo Hernández Portilla.

*Este trabajo contó con el apoyo de:
Plantas útiles de San Rafael,
Coxcatlán (MGU / Useful Plants
Project Mexico).*

AGRADECIMIENTOS

En especial a la dra. Izásna mi directora de tesis por toda la confianza, paciencia, apoyo, consejos, esfuerzo y dedicación que me ofreció por guiarme durante la realización de este trabajo.

A la dra. Margarita por los consejos, apoyo y aciertos.

A la maestra Ana María por los aciertos en la revisión de este estudio.

Al maestro Ángel por el apoyo, consejos y observaciones dadas en la realización del este trabajo.

Al dr. Rafael por los consejos y observaciones tan acertadas en este trabajo.

Al maestro Luis por su dedicación y observaciones dadas.

A mi madre por todo el apoyo que me dio durante toda la vida.

DEDICATORIAS

A toda mi familia por todo el apoyo y cariño que me han brindado durante toda mi formación.

En especial a mi madre Yolanda por la paciencia, cariño, comprensión, consejos y por ser el soporte en mis logros.

A mi padre Navor por el apoyo y cariño.

A mi hermana Jenny por su amistad, consejos, cariño y comprensión.

A mi hermano Javier por su apoyo y amistad.

A mis tíos Javier y Martha por el cariño y apoyo que me brindan.

A Eduardo, Alper, Tania, Jair, Bety, Tania, Juan, Salvador por su amistad, consejos y momentos de alegría durante la carrera.

A mis compañeros de la carrera Jaqueline, Claudia, Lidia, Mónica, Jovanni, Cuauhtémoc, Selma, Josué y Roberto.

A mis compañeros del laboratorio en especial a Javier, Felipe, Lupita, Ana, Rebeca, Pilar, Guadalupe y Karla.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Metabolitos secundarios y funciones.	4
Aceites esenciales y funciones.	5
ANTECEDENTES	8
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Colecta de la planta.	13
Extracción y composición del aceite esencial.	13
Determinación de la densidad.	13
Evaluación de la actividad antimicrobiana.	14
Microorganismos utilizados.	14
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.	15
Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.	15
Efecto del aceite esencial sobre la curva de crecimiento bacteriano.	15
Evaluación cualitativa de la actividad levaduriforme.	16
Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica (hongos miceliados).	16
Evaluación cuantitativa de la actividad levaduriforme.	16
Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica (hongos miceliados).	16
Pruebas estadísticas.	17
RESULTADOS Y ANÁLISIS	18
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS	42

APÉNDICE I	43
Descripción de <i>C. globosa</i> .	
APÉNDICE II	45
Área de estudio.	
APÉNDICE III	47
Extracción por arrastre de vapor de aceites esenciales.	
APÉNDICE IV	48
Análisis en cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.	
APÉNDICE V	49
Método de difusión en agar de Kirby-Baüer.	
APÉNDICE VI	51
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM).	
APÉNDICE VII	52
Efecto del aceite esencial sobre la curva de crecimiento bacteriano.	
APÉNDICE VIII	53
Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos.	
APÉNDICE IX	54
Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos.	
APÉNDICE X	55
Espectros de masas de los componentes del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	
REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Estudios realizados sobre el género <i>Cordia</i> .	8
Cuadro 2.	Estudios realizados de la especie <i>C. globosa</i> .	9
Cuadro 3.	Datos etnobotánicos de la especie.	18
Cuadro 4.	Compuestos principales del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	20
Cuadro 5.	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	22
Cuadro 6.	Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	25
Cuadro 7.	Actividad levaduriforme del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	27
Cuadro 8.	Concentración mínima inhibitoria y concentración fungicida mínima del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	29
Cuadro 9.	Actividad antifúngica del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	29
Cuadro 10.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	30
Cuadro 11.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del Ketoconazol.	32
Cuadro 12.	Concentración fungicida media y concentración fungicida mínima del aceite esencial de <i>C. globosa</i>	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cromatograma del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	19
Figura 2.	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	23
Figura 3	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C. globosa</i> en las cepas bacterianas.	23
Figura 4.	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C. globosa</i> en bacterias Gram positivas y Gram negativas.	24
Figura 5.	Efecto del aceite esencial de <i>C. globosa</i> sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> caso clinico.	26
Figura 6.	Efecto del aceite esencial de <i>C. globosa</i> sobre la curva de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> .	26
Figura 7.	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C. globosa</i> en cepas levaduriformes.	28
Figura 8a.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	31
Figura 8b.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de <i>C. globosa</i> .	31
Figura 9.	Efecto del ketoconazol sobre el crecimiento radial de siete cepas de hongos.	33
Figura 10.	<i>Cordia globosa</i> (Jacq.) Kunth.	43
Figura 11.	Distribución de <i>C. globosa</i> en América.	44
Figura 12.	Distribución de <i>C. globosa</i> en México.	44
Figura 13.	San Rafael Coxcatlán, Puebla.	46
Figura 14.	Aparato utilizado para la extracción de aceites.	47
Figura 15.	Aceite esencial.	47

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth.

RESUMEN

La medicina tradicional y natural forma parte importante del acervo cultural de la humanidad. Debido a que se basa en el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de una infinidad de enfermedades del cuerpo humano, utilizándose principalmente en las zonas rurales. Un ejemplo de éstas es *Cordia globosa* que es utilizada para el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana (bacterias y hongos) del aceite esencial de *C. globosa*. La planta fue colectada en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla en el mes de agosto del 2009, el aceite esencial se obtuvo por medio de una extracción por arrastre de vapor. Posteriormente, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se identificaron 5 compuestos del aceite: cariofileno, α pineno, β pineno, humuleno y epóxido de humuleno, de los cuales el 51.54% corresponde a los sesquiterpenos y el 28.41% a monoterpenos; siendo los componentes mayoritarios el α pineno y el humuleno.

La actividad antibacteriana se evaluó en 21 cepas bacterianas (7 Gram positivas y 14 Gram negativas) de acuerdo al método de difusión en agar de Kirby-Baüer. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se determinó por el método de dilución en agar. La actividad antifúngica fue evaluada en 15 cepas fúngicas (7 levaduras y 8 hongos miceliados) mediante el método de inhibición del crecimiento radial (cualitativo y cuantitativo), determinándose la concentración fungicida media (CF_{50}) y la concentración fungicida mínima (CFM).

El aceite esencial de *C. globosa* mostró actividad antibacteriana tanto en bacterias Gram positivas (6) como en Gram negativas (9) siendo las cepas más sensibles *Streptococcus pneumoniae* y *Vibrio cholerae* caso clínico (CMI= 0.25 y 0.06

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

mg/mL respectivamente). El aceite esencial presentó una actividad bactericida para estas dos especies de bacterias. Además, también posee actividad antifúngica en 4 cepas de hongos levaduriformes mostrando un mayor efecto en *Criptococcus neoformans* (CMI= 1.00 mg/mL) y 8 cepas de hongos filamentosos, siendo *Trichophyton mentagrophytes* la cepa fúngica más sensible pues requiere una concentración de 0.5 mg/mL para alcanzar el 100% de inhibición del crecimiento radial. Con los resultados obtenidos se concluye que el aceite esencial de *C. globosa* presenta actividad antimicrobiana por lo tanto se valida su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

INTRODUCCIÓN

México es considerado un país megadiverso por albergar una gran riqueza de especies en cuanto a flora y fauna. Se reporta que el 10% de las especies existentes en el mundo se encuentran en nuestro país, y que de estas el 1% son endémicas (Soberón y Sarukhan, 1994).

En México se tiene estimado que existen cerca 30,000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, lo que representa el 10% del total de la riqueza florística del país (Betancourt y Gutiérrez, 1999).

Estudios realizados por Betancourt y Gutiérrez (1999) reportan que, de manera cotidiana, se comercializan frescas y deshidratadas cerca de 250 especies provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país.

El estudio sistemático o científico de las plantas medicinales del territorio que hoy ocupa México es un tema que se aborda desde la llegada de los conquistadores españoles. Sin embargo, la historia del conocimiento, el uso y manejo de estas plantas se remonta mucho más allá de esa época: en los mercados prehispánicos las plantas medicinales constituían una de las principales mercancías, ya que existían los jardines botánicos especializados en este tipo de plantas como el de Netzahualcóyotl en Tetzcotzinco y el de Moctezuma Ilhuicamina en Huaxtepetl, por lo tanto, con la conquista de México, la herbolaria mundial se enriqueció notablemente (González *et al.*, 2004).

La medicina tradicional y natural forma parte importante de un acervo cultural de la humanidad. Se ha desarrollado en cada país y región del mundo con características propias, en franca dependencia de los recursos disponibles en ellos, tomando como base la idiosincrasia de sus habitantes. Es por tanto, el resultado de la evolución lenta, pero avalada por la experiencia práctica (Hernández, 1999).

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

Parte del conocimiento autóctono sobre las plantas medicinales quedó registrado en el *Libellus de medicinalibus indorum herbis* o Códice Badiano, en donde su autor, el médico indígena Martín de la Cruz, expone sus conocimientos de herbolaria medicinal, poniendo de manifiesto los adelantos de su cultura. Entonces desde los tiempos antiguos la medicina tradicional se basó en el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de una infinidad de enfermedades del cuerpo humano y se utilizaban principalmente en las zonas rurales (González *et al.*, 2004).

La protección de la salud a través del uso de las plantas medicinales está asumiendo un alto valor económico en el mundo. Más del 80% de la población mundial depende de las plantas silvestres para la atención de enfermedades (González *et al.*, 2004).

Las plantas medicinales se han sometido a diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos para verificar su efectividad, y han demostrado tener propiedades terapéuticas gracias a ciertos compuestos químicos llamados metabolitos secundarios (Cowan, 1999).

Metabolitos secundarios y funciones.

Las plantas poseen dos tipos de metabolismo denominados primario y secundario. El primero incluye clorofilas, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, los cuales son comunes en todas las plantas (Gros *et al.*, 1985; Croteau *et al.*, 2000). El segundo incluye compuestos orgánicos (Bruneton, 1991) de bajo peso molecular (Sepúlveda *et al.*, 2003) que por lo general se biosintetizan a partir de los primarios (Gros *et al.*, 1985; Croteau *et al.*, 2000).

Los metabolitos secundarios participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente (Sepúlveda *et al.*, 2003), son sintetizados como defensa cuando la planta es expuesta a condiciones adversas tal como el consumo y ataque por herbívoros y microorganismos (artrópodos, vertebrados, moluscos,

virus, bacterias y hongos) (Bruneton, 1991), la competencia ante otras por el espacio, suelo, luz y nutrientes, etc., así como la atracción de animales para la polinización y dispersión de semillas (Gros *et al.*, 1985; Croteau *et al.*, 2000; Sepúlveda *et al.*, 2003).

La característica más importante de muchos metabolitos secundarios es su distribución relativamente restringida en la naturaleza que, en algunos casos, se limita a especies o subespecies únicas y, en consecuencia, son una manifestación de la individualidad del organismo y la especie que lo contiene (Gros *et al.*, 1985).

Dependiendo de su composición y grado de toxicidad, los metabolitos secundarios son utilizados en agroquímicos, medicamentos y cosméticos (Davis *et al.*, 1996). A veces tienen acción tóxica sobre la germinación y también le confieren diversas propiedades útiles para el hombre como poder antiséptico, espasmolítico, sedante, expectorante, antimicrobiano (Bruneton, 1991, Croteau *et al.*, 2000) y antioxidante (Croteau *et al.*, 2000, Sepúlveda *et al.*, 2003).

De los metabolitos secundarios se conocen aproximadamente 20,000 estructuras que por su composición química son clasificados en 2 grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los primeros incluyen alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los segundos incluyen poliacetilenos, policétidos, fenilpropanoides y terpenoides. La síntesis de estos compuestos se efectúa en distintas partes de la planta. Algunos alcaloides y monoterpenos se sintetizan en los plástidos; mientras que los esteroides, sesquiterpenos y dolicoles, en el retículo endoplásmico, y las aminas y la mayoría de los alcaloides en la mitocondria (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Aceites esenciales y funciones.

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles (Palá, 2002) y están constituidas por mezclas complejas de más de 100 sustancias químicas biosintetizadas por las plantas generalmente destilables con agua o en corriente

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

de vapor, siendo éstas sustancias las responsables del aroma característico de ellas (Palá, 2002; Strasburger *et al.*, 2002;). Los aceites esenciales también son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (principios activos y saborizantes) (Palá, 2002).

Los aceites esenciales pueden tener la siguiente naturaleza química: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides, compuestos oxigenado, residuos no volátiles y de poca densidad. Son insolubles en agua, levemente solubles en ácido acético (vinagre), y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire (Croteau *et al.*, 2000; Strasburger *et al.*, 2002).

Los aceites esenciales están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio), semillas de los frutos (Martínez *et al.*, 2003) y la cáscara de éstos, en la raíz, la resina o también pueden estar presentes en toda la planta (Bruneton, 1991; Wink, 1999).

Las plantas elaboran los aceites esenciales con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización (Bruneton, 1991; Wink, 1999). Son característicos de los Magnoliales, los Laurales, los Austrobaileyales, y los Piperales, y también de algunas familias no emparentadas con estos órdenes, como Myrtaceae, Rutaceae, así como en las familias de Apiales, Lamiaceae, Verbenaceae y Asteraceae (Bruneton, 1991; Wink, 1999).

Existen en México diferentes familias de plantas, cuyos géneros se caracterizan por poseer diversas actividades biológicas y/o son atractivos desde el punto de vista farmacológico.

Una de las familias a la que se le atribuyen múltiples propiedades es la familia Boraginaceae (Ortega *et al.*, 2007), la cual está compuesta por 130 géneros y 2300 especies (Takhtajan, 1996; Mabberley, 1997) de plantas herbáceas o leñosas de los países templados y cálidos. Dentro de ella, el género *Cordia* es uno de los más importantes, distribuido en zonas tropicales y subtropicales alrededor del mundo y está constituido por cerca de 250 especies (Ortega *et al.*, 2007).

A partir de este género se han aislado triterpenos, sesquiterpenos, benzoquinonas, naftoquinonas, hidroquinonas, cromenos, flavonoides, otros compuestos fenólicos y alcaloides (Ortega *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior, este es uno de los géneros que se encuentran en la Reserva Tehuacán-Cuicatlán y es utilizada por los habitantes de esa región para diversos padecimientos (Hernández *et al.*, 2003), como es el caso de San Rafael Coxcatlán donde *Cordia globosa* (Apéndice I) comúnmente conocida como yerba de la sangre, es utilizada en forma de té o infusión (parte aérea) dos o tres veces al día. Es usado como antitusígeno, astringente, hemostático, depurativo, en baños contra las erupciones cutáneas, para resolver problemas respiratorios y de circulación (Apéndice II).

Se han realizado diversos estudios acerca del género *Cordia* (cuadro 1) y específicamente de *C. globosa* destacando los estudios descritos en el cuadro 2, donde se puede observar que los componentes principales de *C. globosa* son 7-metoxiflavona y la quercetina 3-metil éter (5,7,30,40-tetrahidroxi-3-metoxiflavona) el biciclogermacreno, β cariofileno, α humuleno β -cariofileno y el δ -elemeno. Encontrándose actividad antibacteriana (tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas), larvicida y antioxidante.

ANTECEDENTES.

Cuadro1. Estudios realizados sobre el género *Cordia*.

Autor	País	Aportación
Longuefosse y Nossin (1996)	Francia	Elaboran un listado de plantas medicinales acerca de la forma de preparación, uso y parte utilizada, entre ellas <i>C. martinicensis</i> empleada en el tratamiento de dolores torácicos y de matriz, por medio de la decocción de la hoja y suministrándola por vía oral.
Ávila (2005)	México	Evaluó la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> en 13 cepas bacterianas y 5 fúngicas. Las cepas más sensibles al efecto fueron <i>Sarcinia lutea</i> , <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> ; e identifican al 4-metil, 4-etenil-3-(1-metil etenil)-1-(1-metil-metanol) ciclohexano (37,34%), β -eudesmol (19,21%), espatulenol (11,25%) y candina 4 (5), 10 (14) dieno (7,93%) como componentes principales del aceite esencial.
Ortega et al. (2007)	Venezuela	Realizan un estudio fitoquímico y la evaluación antimicrobiana del extracto neutro de las hojas de <i>C. cylindrostachya</i> , obteniendo actividad inhibitoria contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Micrococcus spp</i> y <i>Bacillus subtilis</i> e identifican: el ácido-3 α -hidroxiolean-12-en-27-oico presentando actividad inhibitoria en <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Micrococcus spp</i> y <i>B. subtilis</i> , separan el β -sitosterol, que presenta actividad antimicrobiana y aíslan 5-hidroxi-3,7,4'- trimetoxi-flavona la cual no presentó actividad.
Hernández (2009)	México	Estudió la variación espacio temporal de la composición química, actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de <i>C. curassavica</i> de 2 localidades del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Identificando en la zona de San Rafael Coxcatlán, 12 compuestos en la época de sequía y 17 en la de lluvia, compartiendo 9, mientras que en la zona de Zapotitlán Salinas se encontraron 11. La actividad antibacteriana del aceite en San Rafael en época de sequía fue activa en 9 cepas y 4 en época de lluvia; en Zapotitlán presentó actividad en 9 cepas. Las cepas más sensibles fueron <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>V. cholerae</i> cc. El aceite presentó actividad en hongos filamentosos. La cepa más sensible fue <i>R. solani</i> en ambas zonas.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

Cuadro 2. Estudios realizados de la especie *C. globosa*.

Autor	País	Aportación
Díaz (1976)	México	Es utilizada para resolver problemas de circulación y respiratorios, como antitusígeno, astringente, hemostático (para contener las hemorragias y los esputos de sangre), depurativo y en baños contra las erupciones cutáneas.
Scull <i>et al.</i> , (1998)	Cuba	Realizan una encuesta y un listado sobre el uso tradicional de las plantas medicinales, donde mencionan a la especie para el tratamiento de intoxicaciones.
Souza <i>et al.</i> , (2004)	Brasil	Es utilizada en la medicina tradicional para síntomas de reumatismo, dolores menstruales y dispepsia, con actividad espasmolítica en el íleon de caballo y en el duodeno de conejo y actividad vasodilatadora en ratas. Reportan por primera vez para la familia y el género la 7-metoxiflavona y la quercetina 3-metil éter (5,7,30,40-tetrahidroxi-3-metoxiflavona) para el género.
De Menezes <i>et al.</i> , (2006)	Brasil	Realizan un estudio acerca de los componentes químicos y la actividad larvicida del aceite esencial, identificando 23 constituyentes (10 mono y 13 sesquiterpenos) en el período de floración y 26 (8 mono y 19 sesquiterpenos) en el de frutificación, de los cuales 32 componentes son terpenoides. Los mayores constituyentes son: el bicilogermacreno, β -cariofileno y el δ -elemeno. La actividad larvicida presentó un efecto moderado.
Campos <i>et al.</i> , (2007)	Brasil	Extrajeron 215 compuestos aislados de las plantas de flora del noreste de Brasil y fueron evaluadas en <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontrando ocho compuestos que pertenecen a cuatro especies diferentes entre ellas <i>C. globosa</i> las cuales mostraron actividad significativa y aislaron un benzoquinolínico de origen terpenoide de esta especie.

Cuadro 2. Estudios realizados de la especie *C. globosa* (Continuación).

Autor	País	Aportación
David <i>et al.</i> , (2007)	Brasil	Extractos de <i>C. multispicata</i> y <i>C. globosa</i> son utilizados como laxantes, sedantes, para dermatitis, antiinflamatorio, fríos, asma, gripe, antihemorroidal, diurético, antirreumático, para desórdenes menstruales, antihipertensivo, infecciones gastrointestinales, enfermedad capilar tónica y de riñón. Se verificó actividad antioxidante.
De Albuquerque <i>et al.</i> , (2007)	Brasil	Realizan investigaciones fitoquímicas y farmacológicas de plantas medicinales usadas por los indígenas y comunidades rurales, mencionan a <i>C. pentrandra</i> , <i>C. leucocephala</i> y <i>C. globosa</i> , como las principales plantas usadas en problemas respiratorios y sanguíneos.
De Oliveira <i>et al.</i> , (2007)	Brasil	Extraen y analizan el aceite esencial de <i>C. globosa</i> y <i>C. curassavica</i> . Encontrando en la primera 38 componentes entre ellos el β cariofileno, α humuleno y en la segunda 47 como el α pineno, espatulenol, β felandreno entre otros compuestos. Siendo los sesquiterpenos los de mayor proporción en ambas especies. Es utilizada por los habitantes de la región por sus propiedades analgésicas, anti- inflamatorias, antirreumáticas y abortivas.
Godínez-Caraballo y Volpato (2008)	Cuba	Realizan un listado acerca de las plantas medicinales utilizadas en la región, mencionando a <i>C. globosa</i> como una de las más usadas por la población, de la cual hacen la decocción de la parte aérea suministrándola como purificador de la sangre y hemostático aplicándola externamente en forma de lavado.

JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales han sido una alternativa desde tiempos antiguos y el conocimiento acerca de su forma de uso ha pasado de generación en generación para el tratamiento de diversas enfermedades, sin embargo la efectividad de muchas de ellas no ha sido comprobada debido a la poca información que se tiene o a la pérdida de ésta. Debido a lo anterior y a que los problemas de salud se han incrementado con el tiempo por la aparición de cepas resistentes a los antibióticos y a la mala dosificación, surge la necesidad de evaluar la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) del aceite esencial de *C. globosa* de la localidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla, ya que en México, no se cuentan con estudios fitoquímicos previos acerca de los componentes principales del aceite esencial de la especie. De tal manera que este estudio tiene como fin contribuir al conocimiento de la especie como una nueva alternativa en el control de enfermedades infecciosas y la efectividad en el ser humano, así como la validación de su uso en la medicina tradicional.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana (bacterias y hongos) del aceite esencial de *C. globosa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar el rendimiento y densidad del aceite esencial de *C. globosa*.
 - ❖ Identificar los principales componentes químicos del aceite esencial de *C. globosa*.
 - ❖ Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *C. globosa*.
 - ❖ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de *C. globosa*.
 - ❖ Determinar el efecto del aceite esencial de *C. globosa* sobre la curva de crecimiento de una bacteria Gram positiva y una Gram negativa.
 - ❖ Determinar la concentración fungicida mínima (CFM) y concentración fungicida media (CF₅₀) del aceite esencial de *C. globosa*.
-

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Colecta de la planta.

La planta *C. globosa* se colectó en el mes de agosto del 2009, en la localidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla, con número de colecta HCM 60 (Apéndice II).

2. Extracción y composición del aceite esencial.

La obtención del aceite esencial (2.7365 Kg. de hojas frescas) 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. globosa* se realizó en el Instituto de Química, UNAM, mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Apéndice IV).

3. Determinación de la densidad.

La densidad del aceite de *C. globosa* se determinó por medio de la fórmula $\bar{\delta} = m/v$.

Se tomaron 10 μ L de aceite y se pesaron en una balanza analítica determinándose así la relación masa volumen (g/mL.)

4. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

➤ **Microorganismos utilizados.**

Bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán (UNAM). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* aislada de un caso clínico donadas por el Hospital Angeles (Metropolitano).

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

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

Hongos Filamentosos: *Fusarium sporotricoides* ATCC NRLL3299, *Fusarium moniliforme*, *Trichophyton mentagrophytes* donadas por el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO de la FES Iztacala (UNAM), *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.

4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana.

➤ **Evaluación cualitativa.**

La evaluación 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 4 µL de aceite esencial; como control positivo se utilizó cloramfenicol (25 µg por disco). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice V).

➤ **Evaluación cuantitativa.**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se determinaron utilizando el método modificado de dilución en agar (Koneman, 1991). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 3.0, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL del aceite; realizándose por triplicado cada bioensayo (Apéndice VI).

4.2 Efecto del aceite sobre la curva de crecimiento bacteriano.

La determinación del efecto del aceite esencial sobre las curvas de crecimiento se realizó de acuerdo al método propuesto por Kubo *et al*, 1993, citado en Avila, 1996, por lo cual se eligió una bacteria Gram positiva (*S. pneumoniae*) y una Gram negativa (*V. cholerae* caso clínico) (Apéndice VII).

4.3 Evaluación de la actividad antifúngica.

➤ **Evaluación cualitativa.**

a. Evaluación de la actividad levaduriforme

La evaluación cualitativa de la actividad levaduriforme se realizó de acuerdo con el método de difusión en agar papa y dextrosa (PDA) (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991). Se impregnaron sensidiscos con 4 μ L de aceite esencial; como control positivo se utilizó nistatina (150 μ g por disco). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

b. Evaluación de la actividad antifúngica (hongos miceliados).

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 4 μ L de aceite esencial; como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Ketoconazol (25 μ g por disco), realizándose todos los bioensayos por triplicado (Apéndice VIII).

➤ **Evaluación cuantitativa.**

a. Evaluación de la actividad levaduriforme.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM) se determinaron utilizando el método modificado de dilución en agar papa y dextrosa (PDA) (Koneman, 1991).

Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 3.0, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL del aceite; realizándose por triplicado cada bioensayo.

b. Evaluación de la actividad fúngica (hongos miceliados).

La concentración fungicida media (CF₅₀) y la concentración fungicida mínima (CFM) se determinaron 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: 3.00, 2.00, 1.00, 0.50, 0.25 y 0.125 mg/mL. Realizándose cada bioensayo por triplicado (Apéndice IX).

5. Pruebas estadísticas.

Los resultados obtenidos de los bioensayos de la actividad antibacteriana fueron analizados mediante un análisis de varianza factorial, en donde los factores fueron: tratamientos, cepas bacterianas y tipo bacteriano; mientras que para la actividad antifúngica se realizó un análisis de regresión de concentración del aceite esencial contra inhibición del crecimiento radial, para cada especie. El análisis se hizo con el paquete de cómputo Minitab versión 15 (Durán *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Los datos etnobotánicos de la especie se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Datos etnobotánicos de la especie.

Familia	Boraginaceae
Nombre científico	<i>Cordia globosa.</i>
Nombre común	Yerba de la sangre
Número de colecta	HCM 60
Parte utilizada	Hojas
Forma de uso	Te o infusión.
Colector	Héctor Cervantes.

Extracción y composición química del aceite esencial.

El rendimiento obtenido a partir de la extracción del aceite esencial de *C. globosa* fue de 0.0677%, mostrando una densidad de 0.79 g/mL.

En el cromatograma obtenido (figura 1) de la cromatografía de gases se muestran 6 picos principales, de los cuales por el tiempo de retención y el patrón de fragmentación se identificaron 5 compuestos: cariofileno, α pineno, β pineno, humuleno y epóxido de humuleno. Del 79.95% de los compuestos identificados el 51.54% corresponde a los sesquiterpenos y el 28.41% a monoterpenos; siendo el humuleno (31.76%), α -pineno (15.04%) y β -pineno (13.37%) los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *C. globosa*. Los resultados obtenidos de la composición del aceite esencial se muestran en el cuadro 4.

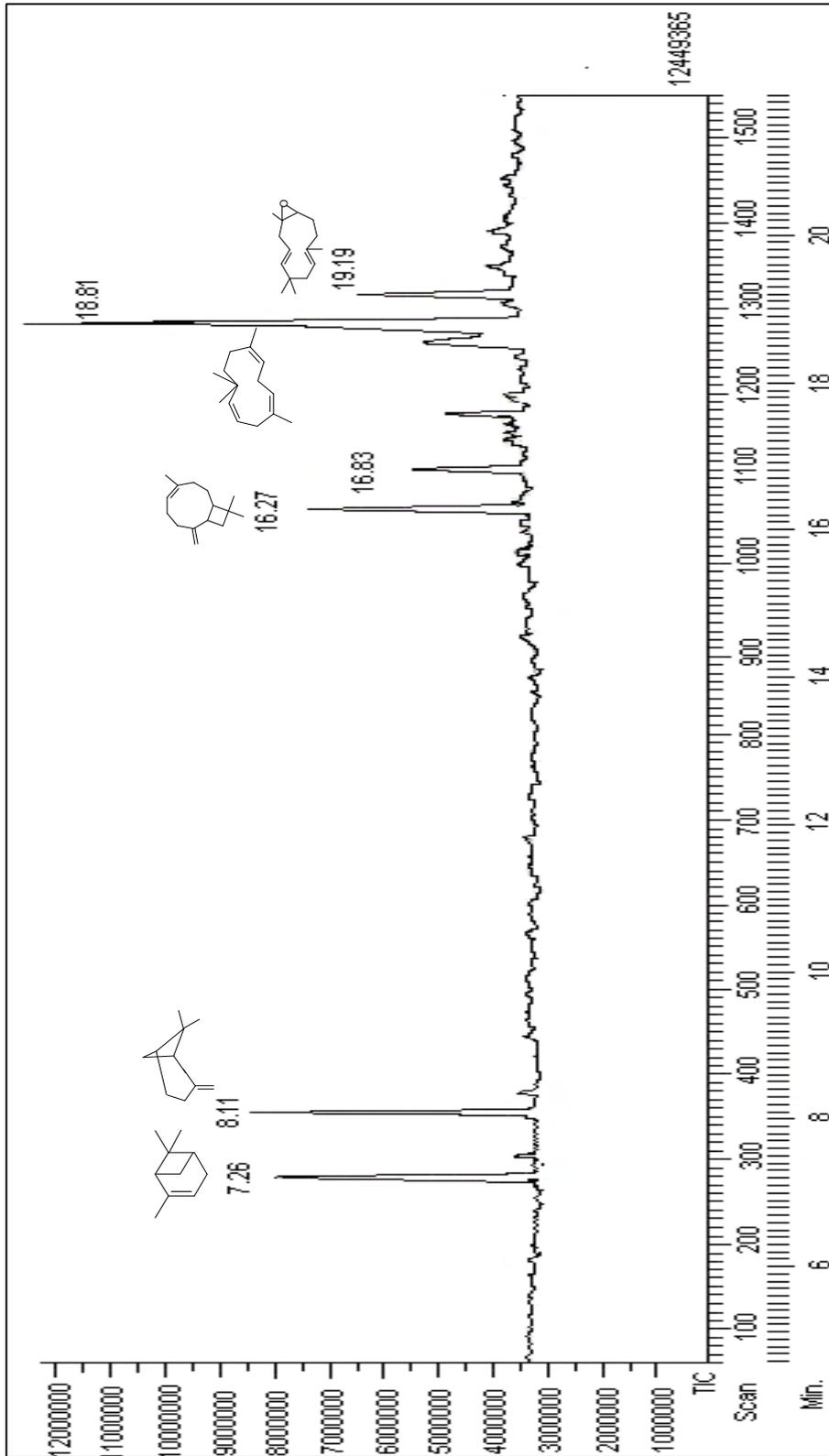
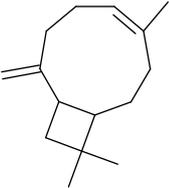
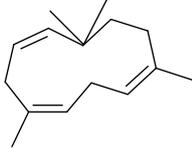
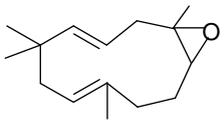


Figura 1. Cromatograma del aceite esencial de *C. globosa*.

Cuadro 4. Compuestos principales del aceite esencial de *C. globosa*.

Compuesto	Estructura	T.R.	P.M.	%
α -Pinoeno		7.26	136	13.37
β -Pinoeno		8.11	136	15.04
Cariofileno		16.27	204	11.42
Humuleno		16.83 18.81	204	31.76
Epóxido de humuleno		19.19	138	8.36
			Total	79.95

T.R.: Tiempo de retención (Apéndice X), P.M.: Peso molecular.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Evaluación cualitativa.

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. globosa* se presentan en el cuadro 5 y figura 2. El aceite esencial mostró actividad en 15 de las 21 cepas presentando los mayores halos de inhibición *B. subtilis* y *V. cholerae* (aislada de un caso clínico) y el menor halo *V. cholerae* NO-01. De forma contraria, el aceite esencial de *C. globosa* no mostró actividad en las cepas *S. lutea*, *V. cholerae* CDC V12, *E. agglomerans* ATCC 27155, *E. aerogenes*, *Y. enterocolitica* y *Y. enterocolitica* (aislada de un caso clínico).

El análisis de varianza determinó que en cuanto al tamaño del halo de inhibición con relación a las cepas bacterianas y los tratamientos ($F=81.26$, $P=0.000$) (figura 3), el tipo bacteriano (bacterias Gram positivas y Gram negativas) y tratamientos ($F=16.30$, $P=0.000$) (figura 4) y entre tratamientos ($F=2037.60$, $P=0.000$) sí se encontraron diferencias significativas; esto quiere decir que la actividad del aceite esencial depende de la especie de bacteria en particular.

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

Bacteria	Halos de inhibición (mm)	
	Cloramfenicol	Aceite esencial
<i>S. a.</i> ATCC 12398	10.00 ± 1.00	10.00 ± 0.00
<i>S. a.</i> ATCC 29213	9.00 ± 0.00	10.00 ± 0.70
<i>S. e.</i>	6.66 ± 1.15	10.00 ± 0.70
<i>E. f.</i> ATCC 29212	7.00 ± 1.00	8.50 ± 0.70
<i>S. pn.</i> Cc	6.66 ± 0.577	7.00 ± 0.00
<i>B. s.</i>	29.33 ± 2.62	15.00 ± 1.41
<i>S. l.</i>	32.00 ± 0.50	N.A.
<i>V. ch.</i> NO-01	7.33 ± 0.577	6.50 ± 0.00
<i>V. ch.</i> agua	8.33 ± 0.577	7.00 ± 0.00
<i>V. ch.</i> cc	27.67 ± 0.47	13.00 ± 2.83
<i>S. t.</i> ATCC 19430	28.00 ± 1.63	7.00 ± 0.00
<i>E. c.</i> ATCC 25922	21.67 ± 1.70	7.00 ± 0.00
<i>E. c.</i> ATCC 53218	21.67 ± 1.70	7.00 ± 0.00
<i>P. ae.</i> ATCC 27853	27.60 ± 0.11	8.50 ± 0.70
<i>S. m.</i> cc	22.30 ± 0.25	7.00 ± 0.00
<i>P. m.</i> cc	13.33 ± 4.16	7.00 ± 0.00
<i>V. ch.</i> CDC V12	32.67 ± 0.47	N.A.
<i>E. agg.</i> ATCC 27155	19.67 ± 0.47	N.A.
<i>E. ae.</i>	19.33 ± 0.47	N.A.
<i>Y. e.</i>	25.67 ± 0.47	N.A.
<i>Y. e.</i> cc	25.67 ± 0.47	N.A.

Simbología: *S. a.* ATCC 12398 = *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *S. a.* ATCC 29213 = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. e.* = *Staphylococcus epidermidis*, *E. f.* ATCC 29212 = *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *S. pn.* cc = *Streptococcus pneumoniae* caso clínico, *B. s.* = *Bacillus subtilis*, *S. l.* = *Sarcina lutea*, *V. ch.* NO-01 = *Vibrio cholerae* NO-01, *V. ch.* agua = *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *V. ch.* cc = *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico, *S. t.* ATCC 19430 = *Salmonella typhi* ATCC 19430, *E. c.* ATCC 25922 = *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. c.* ATCC 53218 = *Escherichia coli* ATCC 53218, *P. ae.* ATCC 27853 = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. m.* cc = *Proteus mirabilis* (aisladas de caso clínico), *S. m.* cc = *Serratia marcescens* (aisladas de caso clínico). *V. ch.* CDC V12 = *Vibrio cholerae* CDC V12, *E. agg.* ATCC 27155 = *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *E. ae.* = *Enterobacter aerogenes*, *Y. e.* = *Yersinia enterocolitica*, *Y. e.* cc = *Yersinia enterocolitica* aislada de caso clínico. N. A. = No presentó actividad.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kuntf.

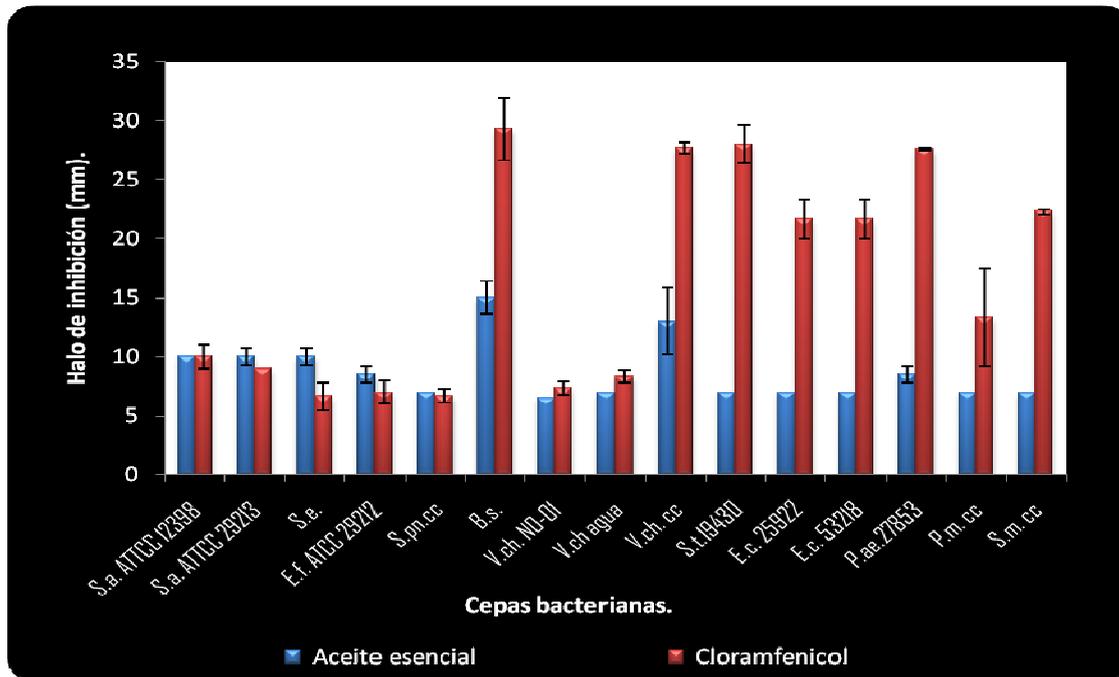


Figura 2. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. globosa*. Simbología: igual al cuadro 5.

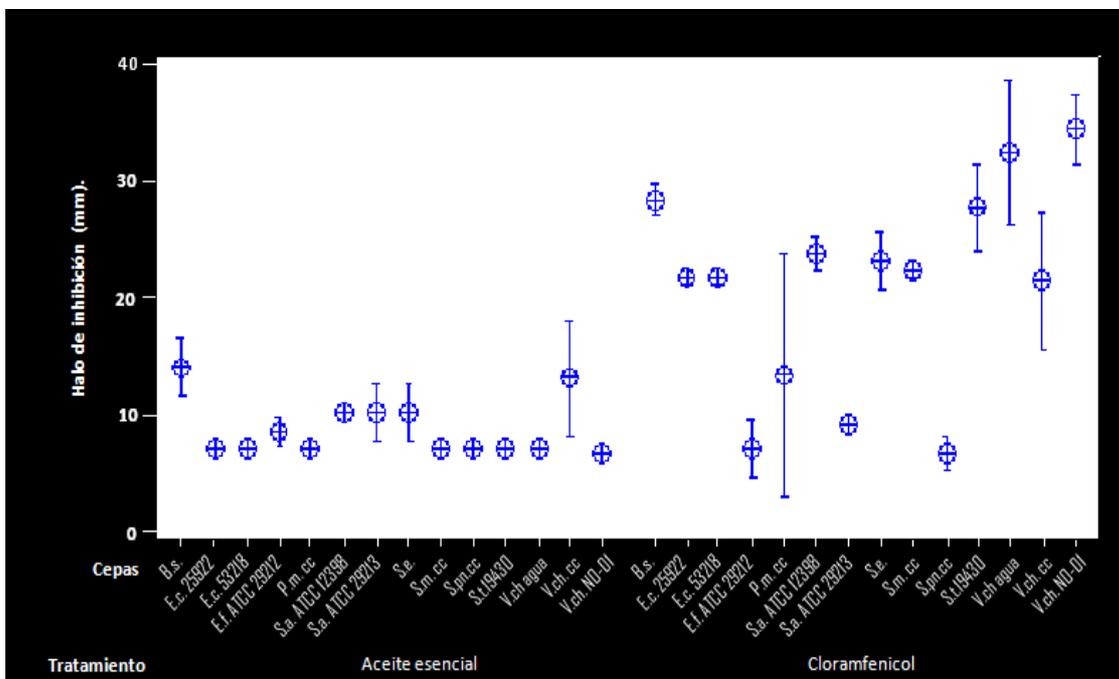


Figura 3. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. globosa* en las cepas bacterianas. Simbología: igual al cuadro 5.

Como se puede observar en la figura 4 tanto bacterias Gram positivas y Gram negativas son sensibles al efecto del cloramfenicol, aunque se presenta un mayor efecto en bacterias Gram negativas.

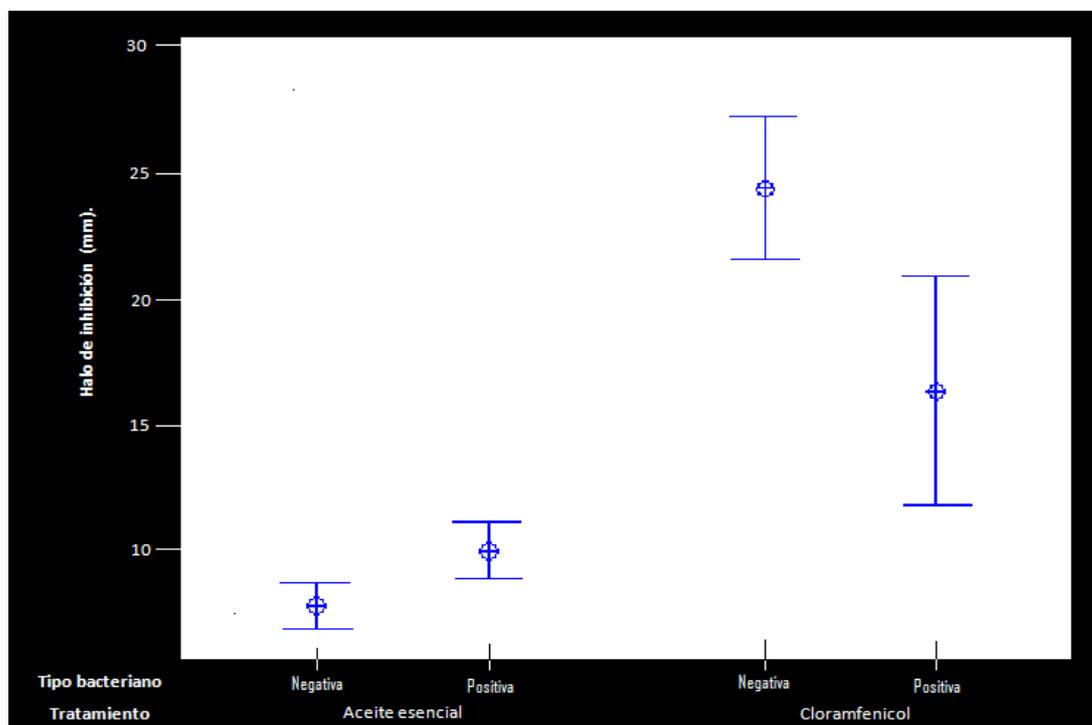


Figura 4. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. globosa* en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Evaluación cuantitativa.

Los resultados de la determinación de CMI y CBM se muestran en el cuadro 6, en donde las cepas *S. pneumoniae* y *V. cholerae* (caso clínico) son las cepas más sensibles; pues requieren concentraciones de 0.25 y 0.06 mg/mL de aceite esencial para inhibir su crecimiento (CMI). En contraste, las cepas más resistentes al efecto del aceite son *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 12398, *S. typhi* ATCC 19430. *E. coli* ATCC 53218, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. marcescens* ya que se inhibe su crecimiento con concentraciones mayores a 3.0 mg/mL (CMI).

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kuntz.

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

Bacteria	Cloramfenicol (mg/mL)		Aceite esencial (mg/mL)	
	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. a.</i> ATCC 12398	0.001	0.002	2.00	>3.00
<i>S. a.</i> ATCC 29213	0.008	0.016	3.00	>3.00
<i>S. e.</i>	0.002	0.004	3.00	>3.00
<i>E. f.</i> ATCC 29212	0.008	0.016	3.00	>3.00
<i>S. pn.</i> cc	0.016	0.032	0.25	0.50
<i>B. s.</i>	0.002	0.004	3.00	>3.00
<i>V. ch.</i> NO-01	0.001	0.002	1.50	2.00
<i>V. ch.</i> cc	0.001	0.002	0.06	0.12
<i>S. t.</i> ATCC 19430	0.002	0.004	3.00	>3.00
<i>E. c.</i> ATCC 25922	0.004	0.008	3.00	>3.00
<i>E. c.</i> ATCC 53218	0.064	0.128	3.00	> 3.00
<i>P. ae.</i> ATCC 27853	0.008	0.016	0.75	1.00
<i>P. m.</i> cc	0.064	0.128	1.50	2.00
<i>S. m.</i> cc	0.008	0.016	3.00	>3.00

Simbología: igual al cuadro 5.

Efecto del aceite esencial sobre la curva de crecimiento bacteriano.

Los resultados obtenidos indican que el efecto del aceite esencial sobre las cepas de *V. cholerae* y *S. pneumoniae* es similar, observándose que a concentraciones menores o iguales a $\frac{1}{2}$ CMI, se presenta un efecto bacteriostático, mientras que en concentraciones iguales o mayores a CMI y CBM el efecto es bactericida,

presentándose la muerte celular a los 10 minutos para *V. cholerae* (caso clínico) (figura 5) y a las 2 horas para *S. pneumoniae* (figura 6).

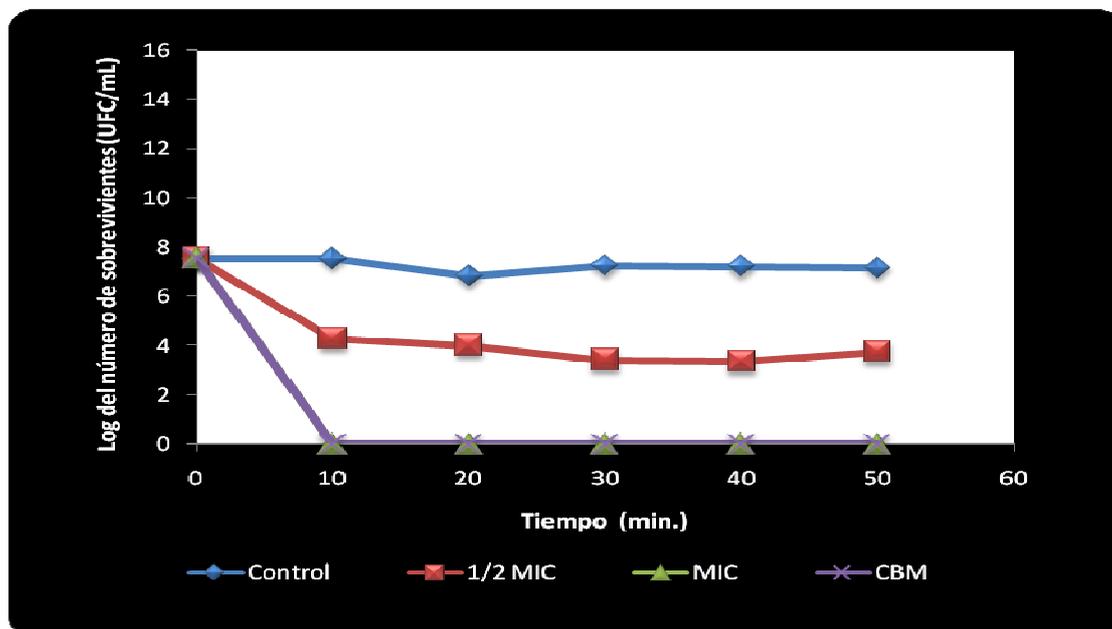


Figura 5. Efecto del aceite esencial de *C. globosa* sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* caso clínico. Se utilizaron las siguientes concentraciones $\frac{1}{2}$ CMI= 0.031 mg/mL, CMI= 0.0625 mg/mL y CBM= 0.125 mg/mL.

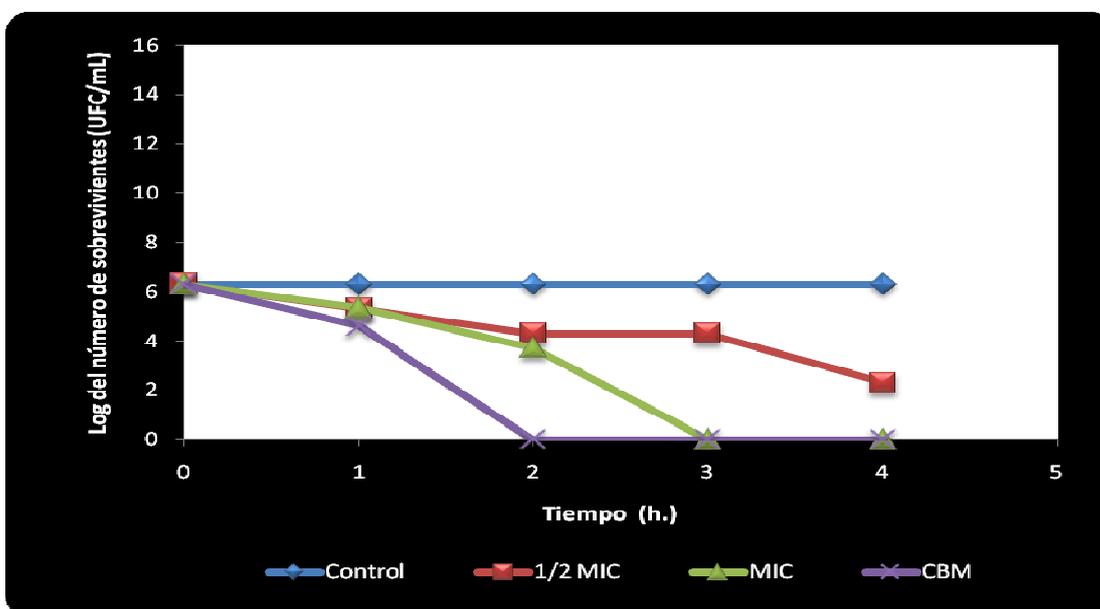


Figura 6. Efecto del aceite esencial de *C. globosa* sobre la curva de crecimiento de *S. pneumoniae*. Se utilizaron las siguientes concentraciones $\frac{1}{2}$ CMI= 0.125 mg/mL, CMI= 0.25 mg/mL y CBM= 0.50 mg/mL.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kuntz.

Para poder producir la inhibición total del crecimiento de *V. cholerae* (caso clínico) es necesario la acumulación de 9 impactos; mientras que para *S. pneumoniae* fue necesaria la acumulación de 10 impactos.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

a) HONGOS LEVADURIFORMES.

Evaluación cualitativa.

El efecto del aceite esencial de *C. globosa* sobre hongos levaduriformes se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Actividad levaduriforme del aceite esencial de *C. globosa*.

Bacteria	Halos de inhibición (mm)	
	Nistatina (µg/mL)	Aceite esencial (µg/mL)
<i>C. glab.</i>	7.67 ± 0.58	8.50 ± 0.70
<i>C. trop.</i>	9.00 ± 1.00	7.00 ± 0.00
<i>C. alb.</i> ATCC 10231	9.67 ± 0.58	7.00 ± 0.00
<i>C. neof.</i>	8.67 ± 0.58	7.00 ± 0.00
<i>C. alb.</i> ATCC 14065	11.83 ± 2.02	N.A.
<i>C. alb.</i> Uro	9.33 ± 0.580	N.A.
<i>C. alb.</i> Cusi	9.33 ± 0.58	N.A.

Simbología: *C. glab.*= *Candida glabrata*, *C. trop.*= *Candida tropicalis*, *C. alb.* ATCC 10231= *Candida albicans* ATCC 10231, *C. neof.*= *Cryptococcus neoformans*, *C. alb.* ATCC14065= *Candida albicans* ATCC 14065, *C. alb.* Uro= *Candida albicans* urocultivo y *C. alb.* Cusi =*Candida albicans* CUSI. N. A. = No presentó actividad.

El aceite esencial mostró actividad en 4 de las 7 cepas levaduriformes siendo *C. glabrata* la cepa más sensible presentando los mayores halos de inhibición, *C. tropicalis*, *C. albicans* ATCC 10231 y *Cryptococcus neoformans* presentaron halos de igual tamaño y *C. albicans* ATCC 14065, *C. albicans* aislada de un urocultivo y *C. albicans* CUSI son las cepas en donde el aceite esencial no presentó actividad.

En el análisis de varianza se determinó que hay diferencias significativas entre la cepa y el tratamiento ($F=12.48$, $P=0.000$) y entre tratamientos ($F=40.33$, $P=0.000$), lo que sugiere que la actividad del aceite esencial depende de la especie de cepa levaduriforme en particular (figura 7).

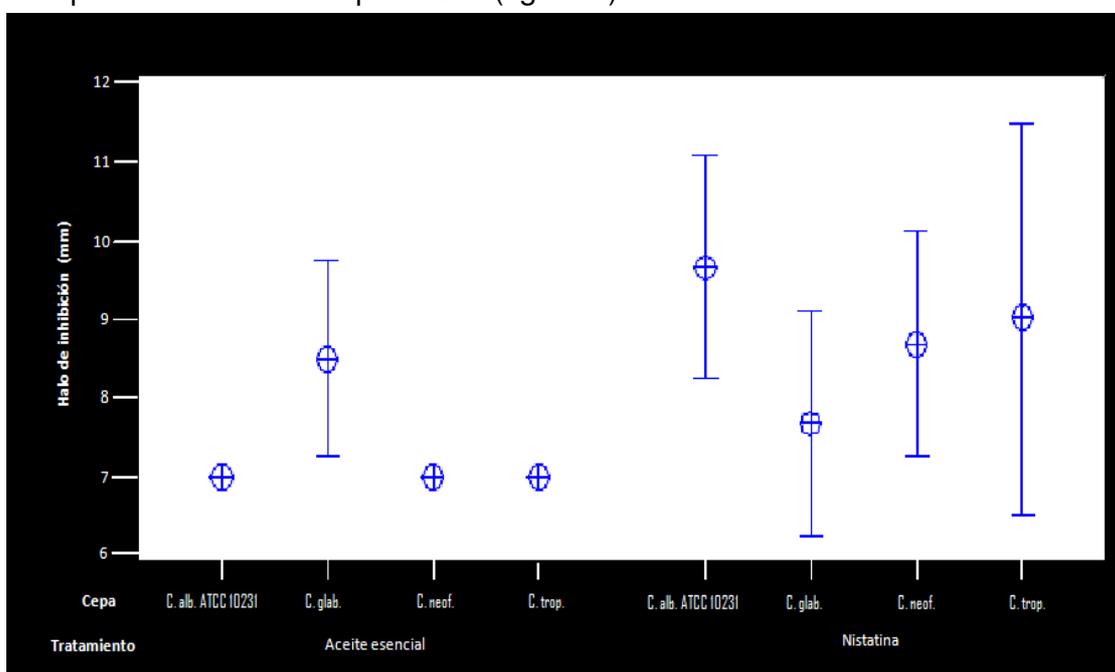


Figura 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. globosa* en cepas levaduriformes. Simbología: igual al cuadro 7.

Evaluación cuantitativa.

Los resultados de la determinación de CMI y CFM de las cepas levaduriformes se muestran en la cuadro 8. La cepa *C. neoformans* es la cepa más sensible; es decir que se requieren concentraciones de 1.0 mg/mL para inhibir drásticamente su crecimiento y 1.5 mg/mL para inhibirlo completamente. Mientras que las cepas

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kuntz.

más resistentes al efecto del aceite fueron *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. albicans* ATCC 10231, ya que se requieren de concentraciones mayores a 3.0 mg/mL para poder inhibir su crecimiento.

Cuadro 8. Concentración mínima inhibitoria y concentración fungicida mínima del aceite esencial de *C. globosa*.

Levaduras	Nistatina (µg/mL)		Aceite esencial (mg/mL)	
	CMI	CFM	CMI	CFM
<i>C. glab.</i>	7.8	15.6	3.00	>3.00
<i>C. trop.</i>	7.8	15.6	3.00	>3.00
<i>C. alb.</i> ATCC 10231	3.9	7.8	3.00	>3.00
<i>C. neof.</i>	3.9	7.8	1.00	1.50

Simbología: Igual al cuadro 7.

b) HONGOS FILAMENTOSOS

Evaluación cualitativa.

El aceite esencial de *C. globosa* mostró actividad antifúngica sobre las 8 cepas desafiadas (cuadro 9).

Cuadro 9. Actividad antifúngica del aceite esencial de *C. globosa*.

Cepa Tratamiento	<i>Rs</i>	<i>Rl</i>	<i>Tm</i>	<i>TmC</i>	<i>Fs</i>	<i>An</i>	<i>Fm</i>	<i>FmC</i>
	Aceite esencial	√	√	√	√	√	√	√
Ketoconazol	√	√	√	√	√	√	√	√

Simbología: *Rs*, *Rhizoctonia solani*; *Rl*, *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *TmC*, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112; *Fs*, *Fusarium sporotrichum* ATCC NRLL3299; *An*, *Aspergillus niger* CDBB-H-179; *Fm*, *Fusarium moniliforme*; *FmC*, *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265. √: mostró actividad.

Evaluación cuantitativa.

El aceite esencial presentó actividad antifúngica sobre las 8 cepas, los porcentajes de inhibición se muestran en la cuadro 10 y figura 8 (a y b).

Como se puede observar la cepa que presenta el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial es *T. mentagrophytes* ya que requiere una concentración de 0.5 mg/mL para alcanzar el 100% de inhibición. Mientras que para el resto de las cepas se necesita aplicar una concentración mayor a 3.0 mg/mL de aceite esencial para alcanzar el 100% de inhibición. La cepa más resistente es *R. solani* en donde el porcentaje de inhibición alcanzado es solo 54.54% a una concentración de 3.0 mg/mL (figura 8a y cuadro 10). Se observa que existen diferencias significativas entre la actividad del aceite esencial y las cepas fúngicas ($F=2037.60$, $P=0.000$), esto quiere decir que el efecto del aceite depende de cada cepa de hongo en particular.

Cuadro 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *C. globosa*.

Concentración (mg/mL)	Hongos (% inhibición)							
	<i>Rs</i>	<i>RI</i>	<i>Tm</i>	<i>TmC</i>	<i>Fs</i>	<i>An</i>	<i>Fm</i>	<i>FmC</i>
0.125	6.06	32.25	12.12	29.41	24.32	27.02	21.87	11.11
0.25	12.12	32.25	18.18	29.41	35.13	29.72	25.00	22.22
0.50	42.42	74.19	34.48	100	54.05	37.83	40.62	29.62
1.00	45.45	80.64	39.39	100	54.05	40.54	43.75	55.55
2.00	45.45	87.09	51.51	100	59.45	48.64	53.12	55.55
3.00	54.54	90.32	60.60	100	81.08	62.16	59.37	77.77

Simbología: igual al cuadro 9.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

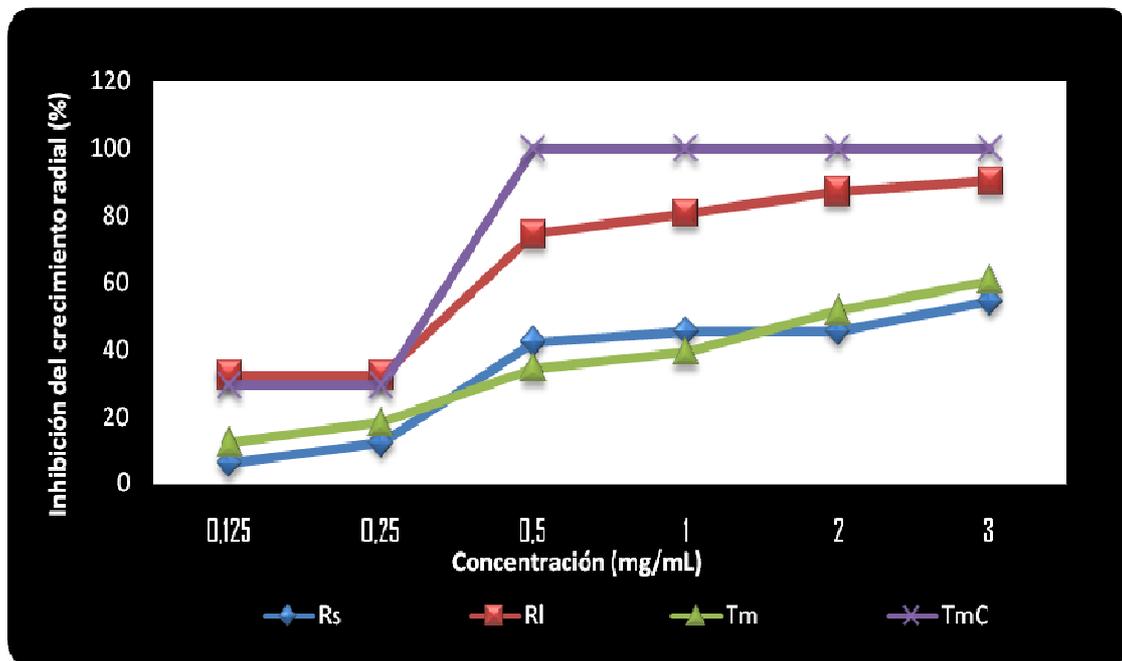


Figura 8a. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *C. globosa*. Simbología: igual al cuadro 9.

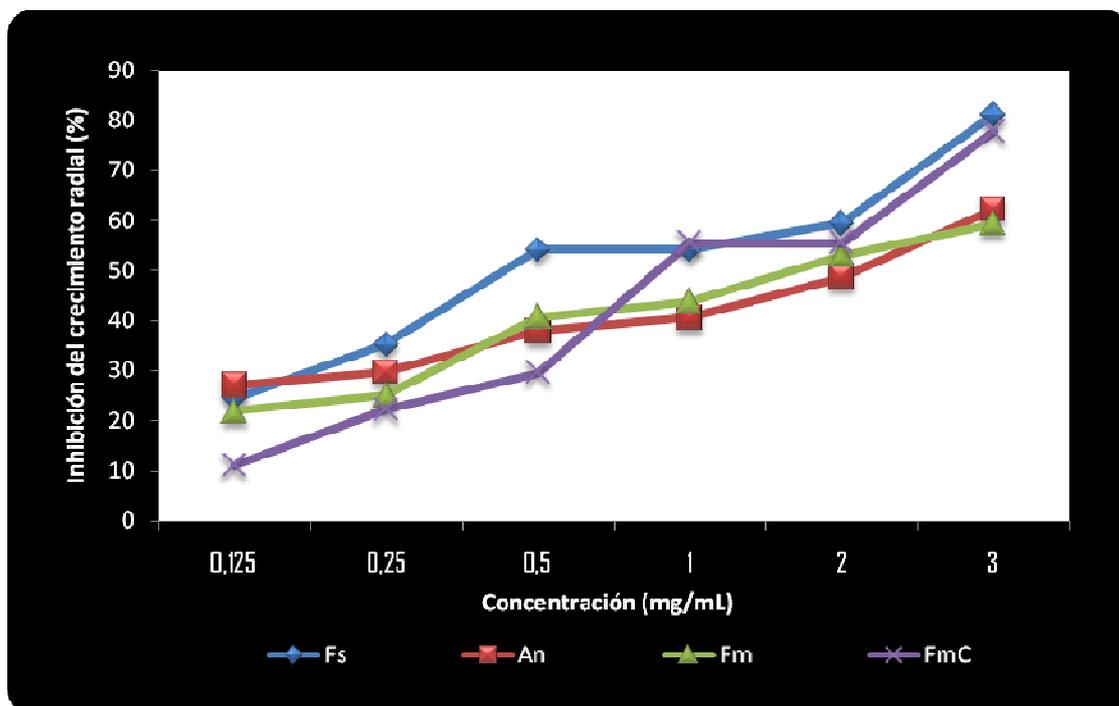


Figura 8b. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del aceite esencial de *C. globosa*. Simbología: igual al cuadro 9.

Como se puede observar en la figura 9 y cuadro 11, *T. mentagrophytes*, *F. sporotrichum*, *A. niger* y *F. moniliforme* son las cepas más sensibles al ketoconazol ya que requieren concentraciones de 40 µg/mL para alcanzar el 100% de inhibición del crecimiento radial. Mientras que *R. solani* resultó ser la cepa más resistente requiriendo concentraciones de 70 µg/mL para poder alcanzar el 100% de inhibición.

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del Ketoconazol.

Concentración (µg/mL)	Hongo (% de inhibición)						
	<i>TmC</i>	<i>Fs</i>	<i>An</i>	<i>FmC</i>	<i>Rs</i>	<i>Rl</i>	<i>Fm</i>
1.25	53.34	0	0	33.34	6.67	20.00	13.34
2.5	62.20	42.20	0	37.80	31.14	26.67	26.67
5	68.87	46.67	20.00	48.87	35.54	31.14	37.80
10	80.00	64.47	33.34	57.80	44.47	42.20	53.34
20	88.87	86.67	62.27	80.00	53.34	66.67	66.67
40	100	100	100	100	71.33	82.20	86.67
50	-	-	-	-	86.66	100	100
60	-	-	-	-	96	100	100
70	-	-	-	-	100	100	100

Simbología: igual al cuadro 9.

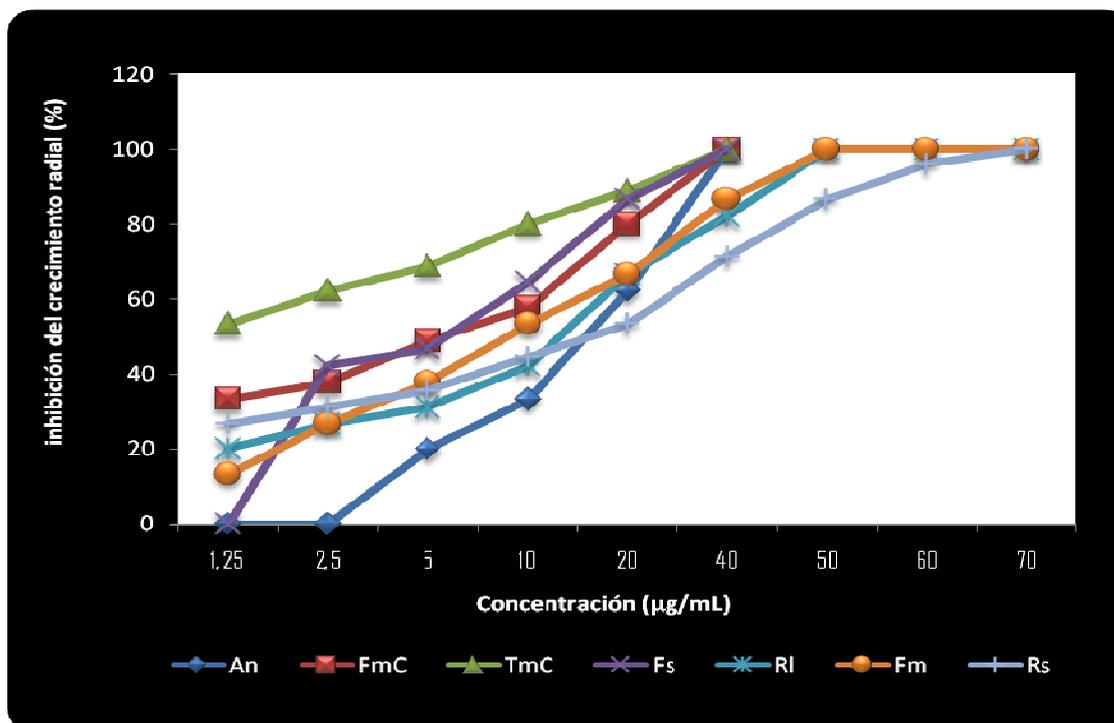


Figura 9. Efecto del ketoconazol sobre el crecimiento radial de siete cepas de hongos. Simbología: igual al cuadro 9.

Los resultados obtenidos para la determinación de CF_{50} y CFM, indican que *T. mentagrophytes* (TmC), *F. sporotrichum* (Fs) y *R. lilacina* (RI) son las cepas más sensibles al efecto del aceite esencial, debido a que alcanzan el 50% de inhibición a concentraciones de 0.35, 0.76 y 0.82 mg/mL respectivamente (cuadro 12). La cepa más resistente es *R. solani* ya que esta requiere de una concentración de 1.73 mg/mL para poder alcanzar el 50% de inhibición.

Cuadro 12. CF_{50} y CFM del aceite esencial de *C. globosa*.

Cepa fúngica	Aceite esencial (mg/mL)		Ketoconazol (µg/mL)
	CF_{50}	CFM	CF_{50}
Rs	1.73	50.26	19.67
RI	0.82	3.53	21.56
Tm	1.72	45.94	N. D.

Cuadro 12. CF₅₀ y CFM del aceite esencial de *C. globosa* (Continuación).

Cepa fúngica	Aceite esencial (mg/mL)		Ketoconazol (µg/mL)
	CF ₅₀	CFM	CF ₅₀
TmC	0.35	1.71	1.16
Fs	0.76	15.92	3.90
An	1.65	234.84	15.29
Fm	1.55	94.20	7.55
FmC	1.17	12.45	3.47

Simbología: Igual al cuadro 9. N. D.: No determinado.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

DISCUSIÓN.

C. globosa es utilizada en San Rafael Coxcatlán, Puebla, para tratar diversos padecimientos sanguíneos, cutáneos y respiratorios, por medio de té y baños (Díaz, 1976). Con los resultados obtenidos se valida el uso de esta planta en la medicina tradicional de la región, ya que presenta actividad antibacteriana. Esto concuerda con lo reportado por De Albuquerque *et al.* (2007) y Godínez-Caraballo y Volpato (2008) que mencionan que la planta es utilizada para el tratamiento de problemas respiratorios, sanguíneos y en general para enfermedades de posible origen infeccioso en diversas culturas.

La forma de uso, preparación y vía de suministro de *C. globosa* en el tratamiento de diversos padecimientos concuerda con lo reportado por Díaz (1976), Scull *et al.* (1998), David *et al.* (2007), De Albuquerque *et al.* (2007), De Oliveira *et al.* (2007), Campos-Vieira *et al.* (2007) y Godínez- Caraballo y Volpato (2008) para la especie y con Longuefosse y Nossin (1996) para *C. martinicensis* en donde mencionan la vía de dosificación y los tipos de tratamientos de las diversas enfermedades que se le atribuyen a la especie.

Como por ejemplo en la región Noreste de Brasil se hace la decocción, infusión de las hojas y raíz para tratar síntomas de influenza, reumatismo, dolores menstruales y abortivos, dispepsia, espasmolítico, vasodilatador, anti-inflamatorio, cicatrizantes, expectorante, astringente y diurético.

En Cuba, la decocción de la parte aérea se administra como purificador de sangre y hemostático. Mientras que en Jamaica el té o infusión de las hojas es utilizado en dolores menstruales.

El aceite esencial de *C. globosa* está compuesto principalmente por sesquiterperenos (51.54%) lo cual concuerda con lo reportado por Ávila (2005) (93.00%) y Hernández *et al.* (2009) (59.00% en época de sequía y 55.00% en lluvia) para dicho género, y De Menezes *et al.* (2006) en los períodos de floración (13 compuestos) y fructificación (10 compuestos) y De Oliveira *et al.* (2007) (84.2%) para la misma especie. También se encuentra compuesta por

monoterpenos (28.41%) aunque en menor proporción como lo menciona Hernández *et al.* (2009) (41.00 y 45.00%) en *C. curassavica* y De Menezes *et al.* (2006) (10 y 8 compuestos en periodo de floración y frutificación respectivamente) en *C. globosa*.

En cuanto a los diferentes estudios que se han realizado con otras especies del género en la misma zona, como lo es *C. curassavica* (Ávila, 2005 y Hernández *et al.*, 2009) se encontró que *C. globosa* comparte 2 sesquiterpenos (cariofileno y humuleno) y un monoterpeno (α -pineno) (cuadro 4). El componente mayoritario es el humuleno (31.76%) seguido de β y α pineno (15.04 y 13.37% respectivamente) y en menor proporción cariofileno(11.42%) y epóxido de humuleno (8.36%), aunque son diferentes a los encontrados por De Menezes *et al.* (2006) y De Oliveira *et al.* (2007) es una contribución al estudio de los componentes de *C. globosa*.

Las diferencias encontradas en el patrón de composición de las diferentes especies (*C. curassavica* y *C. globosa*) del aceite esencial probablemente se deban a la época del año en que fueron colectadas, la edad de la planta, la localización geográfica de los sitios de colecta.

La proporción de los constituyentes principales de los aceites esenciales varía entre la misma especie y más aún cuando provienen de regiones geográficas diferentes. Es un hecho reconocido que las especies vegetales sometidas a estrés hídrico presentan una mayor variedad de compuestos en los aceites, en comparación de aquellas bajo condiciones fisiológicas óptimas. Tal variedad le confiere protección contra factores bióticos (invasión de microorganismos) y abióticos (estrés hídrico, fotónico, etc), antagonistas, aunque un compuesto con una actividad detectada puede estar presente sin requerirse su uso por parte de la planta. Algunas especies se caracterizan por producir determinados compuestos en determinadas proporciones, lo cual es producto de las condiciones ambientales y la intrapolinización a lo largo de generaciones (Agelopoulos *et al.*, 2000; Echeverrigaray *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002).

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

Con respecto al rendimiento del aceite esencial el porcentaje fue de 0.0677%, el cual es un valor bajo con respecto a lo obtenido por De Oliveira *et al.* (2007) (0.5 y 1.1% en tallo y hojas). Esto puede deberse las condiciones físicas y biológicas de cada zona; así como la cantidad de planta utilizada; como se sabe, se produce una mayor cantidad de compuestos con funciones protectoras cuando las plantas se encuentran sometidas a un gran estrés hídrico, de lo cual el ambiente es árido, pues preferentemente éstas elaboran monoterpenos que son sustancias que inhiben el crecimiento y germinación de otras especies (Harborne y Baxter, 1993).

En la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana el aceite esencial de *C. globosa* mostró actividad en 15 cepas bacterianas (cuadro 5, figura 2); presentándose un efecto mayor en las bacterias Gram positivas; siendo *B. subtilis* y *V. cholerae* (caso clínico) son las cepas que presentaron los mayores halos de inhibición.

El aceite esencial de *C. globosa* presenta actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (figura 4), lo cual concuerda con los estudios realizados con compuestos terpenicos por Maguna *et al.* (2006) y con *C. cylindrostachya* por Ortega *et al.* (2007) y con *C. curassavica* por Ávila (2005) y Hernández *et al.* (2009). Estadísticamente se encontraron diferencias significativas en la actividad de estos 2 grupos bacterianos, al determinar CMI y CMB se observa que las bacterias Gram positivas (cuadro 6), son más sensibles, esto tal vez se deba a las diferencias estructurales (tipo de membrana y pared celular) entre ambos tipos bacterianos lo cual concuerda con lo evaluado por Ortega *et al.* (2007) para *C. cylindrostachya* en donde ambos grupos evaluados muestran actividad y se presenta un mayor efecto en bacterias Gram positivas. Las cepas más sensibles al efecto del aceite esencial de *C. globosa* fueron *S. pneumoniae* y *V. cholerae* (caso clínico) presentando CMI= 0.25 y 0.0625 mg/mL respectivamente.

Se realizó un análisis estadístico para comprobar si existen diferencias significativas entre el control positivo (cloramfenicol) y el aceite esencial, se

determinó que si existen diferencias significativas, lo cual nos dice que el cloramfenicol (control positivo) presenta una mayor efectividad aunque si es utilizado por periodos prolongados causa efectos colaterales como daño hematológico, anemia aplásica, trombocitopenia, neuritis óptica y neurotoxicidad (Morales *et al.*, 2007) en tanto *C. globosa* puede consumirse en infusiones sin causar daños o efectos secundarios, razón por la cual es utilizada para tratar infecciones del cuerpo humano.

Como se observa en el cuadro 6 las cepas que presentan los mayores halos de inhibición no son las más sensibles al efecto del aceite esencial. La razón por la cual las cepas presentan mayores halos de inhibición no es que sean las más sensibles (valores de CMI más bajos), es debido a que el tamaño de la zona de inhibición no refleja la efectividad antimicrobiana de un compuesto ya que ésta es afectada por la solubilidad del aceite, el rango de difusión en el medio, la evaporación (puede afectar la dosis), etc. (Cimanga *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1995),

El efecto del aceite esencial de *C. globosa* sobre la población bacteriana de *S. pneumoniae* (figura 6) y *V. cholerae* caso clínico (figura 5) es bacteriostático a dosis iguales o menores a $\frac{1}{2}$ CMI (0.12 y 0.03 mg/mL) y bactericida en dosis iguales o mayores a CMI (0.25 y 0.06 mg/MI) y CBM (0.50 y 0.12 mg/mL). Al utilizar concentraciones bacteriostáticas solo se inhibe el crecimiento bacteriano, permitiendo así una respuesta inmunológica, mientras que al utilizar concentraciones bactericidas se deprime o elimina la respuesta inmunológica al suprimir rápidamente el estímulo antigénico, lo que puede impedir la generación de inmunidad (Aguilar, 2000).

El aceite esencial causó la muerte celular de ambas cepas bacterianas como lo menciona Hernández *et al.* (2009) en donde el aceite de *C. Curassavica* de la zona de San Rafael presenta el mismo efecto en ambas cepas; en este caso el aceite de *C. globosa* presentó un efecto similar pero en un tiempo menor en *V. cholerae* (caso clínico) (10 min.), debido a que es una bacteria Gram negativa, probablemente esto se deba a la disrupción de la doble membrana celular

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kuntz.

bacteriana debido a que puede aumentar la permeabilidad de la membrana dando paso a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana o desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica además de que presenta una capa simple (red de mureína) mientras que en las Gram positivas presentan una capa muy desarrollada de mureína (Maguna *et al.*, 2006), por lo cual la reacción al efecto del aceite esencial en la cepa *S. pneumoniae* haya sido más tardado en está (2 horas). La razón por la cual el aceite esencial de *C. globosa* causó la muerte celular de ambas cepas se deba probablemente al sinergismo de los componentes de dicho aceite y por lo cual la población la utilice 2 o 3 veces al día para síntomas relacionados a infecciones cutáneas, gastrointestinales y respiratorias.

En la evaluación cualitativa de la actividad levaduriforme el aceite esencial de *C. globosa* presentó efecto en 4 cepas levaduriformes. Siendo la cepa más sensible al efecto fue *C. glabrata* presentando los mayores halos de inhibición (cuadro y figura 7).

Mientras que en la evaluación cuantitativa se observa que al determinar CMI y CFM (cuadro 8), *C. glabrata* es una de las cepas más resistentes al efecto, mientras que la más sensible es *C. neoformans* ya que a una concentración de 1.0 mg/mL se inhibe drásticamente su crecimiento y para las cepas *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. albicans* ATCC 10231 se necesitan concentraciones mayores a 3.0 mg/mL esto puede deberse al tipo de estructura que presentan estas cepas. Debido a que la nistatina se fija a los esteroides de la membrana celular de las levaduras, desorganiza su configuración espacial, lo que lleva a una modificación de la permeabilidad de la membrana con pérdida de aminoácidos, iones y purinas causando una alteración en el metabolismo celular. En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre el control positivo (nistatina) y el aceite esencial, lo que sugiere que la nistatina es un antibiótico eficaz pero si se suministra en un tiempo largo causa náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal.

En la evaluación cualitativa de las cepas fúngicas el aceite esencial de *C. globosa* fue activo en las ocho cepas utilizadas, y en la evaluación cualitativa inhibió el crecimiento radial de hongos filamentosos en más del 54.54 %.

El aceite esencial logró inhibir el 100% del crecimiento de *T. mentagrophytes* a una concentración de 0.5 mg/mL (cuadro 10 y figura 8a) siendo la cepa más sensible al efecto del aceite esencial de *C. globosa*, demostrando su actividad antifúngica. A los resultados se les aplicó un análisis de varianza (concentración del aceite y hongo) y se encontraron diferencias significativas lo que sugiere que el aceite actúa de manera particular en cada cepa. Cabe mencionar que el ketoconazol es más efectivo en las cepas ya que a concentraciones muy pequeñas (de 40 a 70 µg/mL) inhibe el 100% de crecimiento radial (Cuadro 11).

El actividad antifúngica del aceite esencial de *C. globosa* probablemente se deba a la presencia del α pineno y cariofileno, concordando con lo reportado por Ávila (2005) para *C. curassavica* ya que presentan estos compuestos en ambas especies y con Ricci *et al.* (2005) donde menciona que el cariofileno presenta actividad antifúngica, aunque en el presente estudio la cepa *R. solani* es la más resistente al efecto del aceite en contraste con lo mencionado por Ávila (2005) y Hernández *et al.* (2009). Probablemente el mecanismo de acción de los aceites esenciales en los hongos, se deba a que actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol que es un triterpeno presente en la membrana fúngica, interrumpiendo de esta manera la formación de la membrana (Ricci *et al.*, 2005), razón por la cual la población la utiliza en el tratamiento de infecciones cutáneas.

El aporte principal del presente estudio es dar a conocer las propiedades medicinales, los compuestos presentes en el aceite esencial de *C. globosa*, la actividad antimicrobiana y validar el uso de la planta para el tratamiento de enfermedades de origen infeccioso.

CONCLUSIONES

- ❖ El aceite esencial de *C. globosa* mostró actividad antibacteriana tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas.
 - ❖ El aceite esencial de *C. globosa* está conformado principalmente por humuleno, α y β pineno.
 - ❖ El aceite mostró actividad antifúngica al inhibir el crecimiento radial en más del 50% en las cepas desafiadas.
 - ❖ Se puede validar el uso de la planta en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos problemas respiratorios y padecimientos cutáneos.
-

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar un estudio comparativo de los aceites esenciales de *C. globosa* en las dos épocas del año, tomando en cuenta las distintas variables, como edad de la planta, el ciclo vegetativo (floración y frutificación), condiciones ambientales y las distintas partes de la planta.

 - ❖ Realizar un estudio comparativo de los extractos y del aceite esencial de *C. globosa* con distintas partes de la planta.

 - ❖ Hacer estudios de toxicidad del aceite o de los principios activos para ver el efecto que presenta en organismos vivos como la artemia y ratones.
-

APÉNDICE I. Descripción de la planta

(Aguilar *et al.*, 1994)

Cordia globosa (Figura 10)

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Boraginaceae

Genero: *Cordia*

Especie: *Cordia globosa* Jacq. Kunth,

Varronia globosa Jacq. o *V. humilis*

Jacq.



Figura 10. *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth

Nombre común: Yerba de la sangre.

Otros nombres: ateje, copillo saraguaso prieto, cuajatinta, curazao bush, lagaña de aura, mierda de gallina, papita, rompe camisa hembra, sanguinaria, varronia globosa, varronia humilis, yerba de la sangre, zompoyo.

Descripción botánica: arbustillo de 1 a 3 m, muy ramoso, ramitas escabroso-hispídulas; hojas aovadas o aovado lanceoladas o aovado-oblongas, de 1,5 a 6 cm, agudas a obtusas, rugosas y papiloso-hípidas en el haz, pubescentes y fuertemente venosas en el envés.

Estas plantas crecen tomando las dimensiones de un árbol. El desarrollo es derecho; en general debajo, tienen un tronco bastante deshojado, mientras en alto, desarrollan muchas ramificaciones. Esta planta en verano toma una coloración violeta-rojo; es de la talla pequeña y puede alcanzar los 8 metros de grandeza. No mantiene las hojas en invierno.

Las principales enfermedades para la cual es utilizada es astringente, depurador y hemostático, el cocimiento de sus hojas se usa para contener las hemorragias y los esputos de sangre. En Cienfuegos (Cuba) lo usan como depurativo y en baños contra las erupciones cutáneas.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

El hábitat son terrenos calcáreos pedregosos, secos, en matorrales y faldas de colinas poco elevadas. Originaria de América tropical (Figura 11) y en México se localiza en el Estado de México, Veracruz, Puebla, Campeche, Michoacán y Oaxaca (Figura 12).



Figura 11. Distribución de *Cordia globosa* en América.



Figura 12. Distribución de de *Cordia globosa* en México.

APÉNDICE II. 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 km², presentando diversas comunidades vegetales como son: bosque tropical caducifolio, bosque espinoso, bosque de encino, bosque de pino-encino, pastizal y matorral xerófilo.

San Rafael Coxcatlán.

La localidad de San Rafael se encuentra situada en el municipio de Coxcatlán Puebla (Figura 13). Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 12' y 18° 14' latitud norte y los meridianos 97° 07' y 97° 09' longitud oeste.

El clima corresponde a un tipo seco, árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22°C (Médina, 2000). Los tipos de suelo predominantes son regosoles calcáreos, regosoles éutricos y xerosoles.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.



Figura 13. San Rafael Coxcatlán, Puebla.

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

El aceite esencial se obtiene por la técnica de destilación por arrastre de vapor (Figura 14) a partir de material fresco en este caso se usan las hojas; este método presenta 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. Empleando este aparato se pueden destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 850 grs. de planta fresca aproximadamente, con un buen rendimiento. En este método se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada y esto se da por medio de la inyección de vapor de agua, y su función es condensarse en el matraz. Posteriormente, dado este proceso se tendrán la presencia de dos fases una es el agua en su fase líquida y la otra el aceite (componente volátil) (Figura 15) que es insoluble en esta y se presenta a lo largo de la destilación.



Figura 14. Aparato utilizado para la extracción de aceites.



Figura 15. Aceite esencial.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

APÉNDICE IV. 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 diámetro interno y 0.25 µm de tamaño de partícula. Las condiciones de separación fueron: temperatura del horno 80-220°C a 8°C por minuto; 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 µl (Split 1:100); energía de ionización 70 eV.

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

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

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

Posteriormente se sumerge un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana, tratando de retirar el exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente se siembra por estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Para realizar la prueba de susceptibilidad, los sensidiscos se colocan en cada una de las zonas de la superficie del agar (en el cual ya se encuentra la bacteria) a una distancia de 22 a 25 mm. entre ellos y a 14 mm del borde de la caja utilizando una pinza estéril; los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

pinza, tratando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Posteriormente se toma la cantidad de aceite necesaria para evaluar la actividad (4 μ L) con la punta de la pipeta, y se agrega el aceite al sensidisco tratando de cuidar que la punta toque solo el sensidisco y este lo absorba, haciéndose de manera cuidadosa y rápida para que el aceite no se volatilice.

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

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

Interpretación de resultados.

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

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

➤ Método modificado de dilución en agar (Koneman, 1991).

Preparación de reactivos y diluciones.

La solución antimicrobiana se prepara diluyendo el aceite esencial en el agar Mueller-Hinton cuidando que esté no se encuentre demasiado caliente y el aceite se evapore. Se toma rápidamente el aceite (concentraciones a utilizar-3.0, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 y 0.062 mg/mL del aceite) y se agrega al agar, disolviéndolo perfectamente para que ambos se distribuyan uniformemente. Después se agrega la solución rápidamente a la caja petri, se tapa y se deja solidificar. Una vez que ya se haya solidificado el agar y se encuentre a temperatura ambiente, se prepara un inóculo que contenga 10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonia/mL) y se siembra por la técnica de punteo. Posteriormente las cajas se incuban a 36 - 37 °C 24horas. Cada bioensayo se realiza por triplicado.

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

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

APÉNDICE VII. Efecto del aceite esencial sobre la curva de crecimiento bacteriano (Avila, 1996).

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

Con la muestra restante del tubo se toman 50 μ L y se siembra en la caja, se agita suavemente y posteriormente se toman otros 50 μ L de la solución y se diluyen en 5 mL de solución salina al 8 % (dilución 1), agitando nuevamente se toman 50 μ L de muestra y se siembran, de esta solución (dilución 1) se toman otros 50 μ L de muestra y se vuelven a diluir en solución salina (dilución 2) y se repite el procedimiento, a partir de esta muestra se comienza el tiempo cero y se sigue el mismo procedimiento para todos los tiempos. Se prepara y rotula otro tubo sin antídoto que sirve como control del desarrollo. El inóculo se prepara con aproximadamente 1×10^6 bacterias/mL en un tubo de ensayo con caldo Mueller-Hinton y se repite el mismo procedimiento. A intervalos de cada 10 minutos durante una hora se realiza el procedimiento para la bacteria Gram negativa; y para la bacteria Gram positiva a intervalos de 30 minutos durante 4 horas.

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

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

El bioensayo de hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas de petri, que contienen agar PDA, en el cual se inocula 1mm² de micelio del hongo a ocupar. Posteriormente cuando el micelio se desarrolla se colocan los sensidiscos y se impregnan rápidamente con 4μL de aceite esencial a una distancia de 15 mm del límite micelial.

En la incubación, las cajas deben de tener una temperatura de 23°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se desarrolle para poder determinar si el aceite inhibe o no el crecimiento.

Como control positivo se usan sensidiscos de ketoconazol de 25 μg/disco esto es para evaluar la sensibilidad de las cepas experimentales. Realizándose el mismo procedimiento que en el caso del cloramfenicol.

Interpretación de resultados.

En este caso en donde existan zonas de inhibición del aceite se reporta como activo, realizándose este proceso por triplicado.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

APÉNDICE IX. 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 del aceite esencial, realizándose el procedimiento igual que en bacterias, pero solo que este cambia el tipo de caja, posteriormente se inocula con micelio del hongo a ensayar.

Incubación. Las cajas se incuban a 23°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado en la caja.

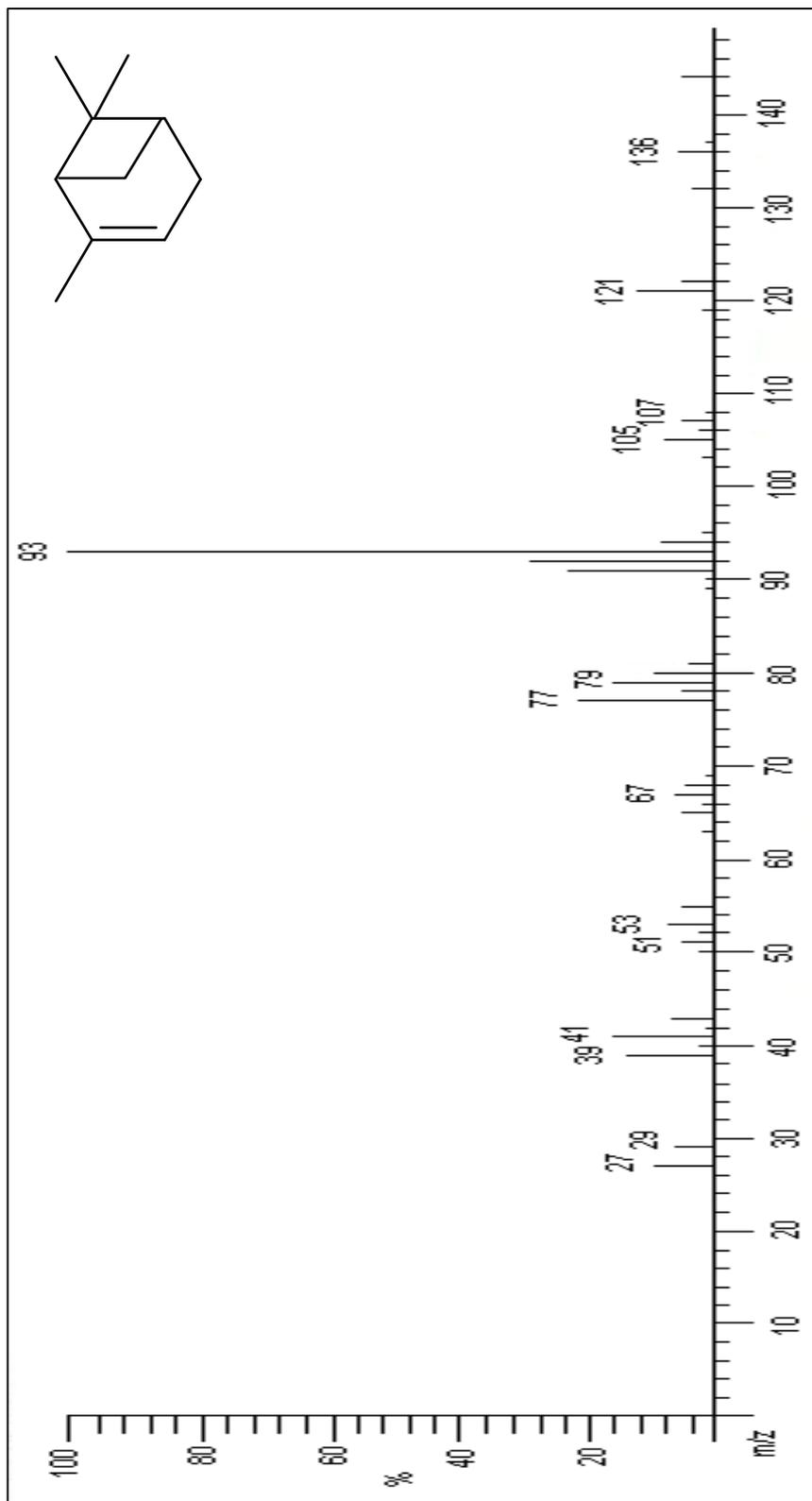
Control positivo. La sensibilidad de las cepas se evalúa con ketokonazol a las concentraciones predeterminadas y se realiza el procedimiento igual que con el aceite .

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 X. Espectros de masas de los componentes del aceite esencial de *C. globosa*.

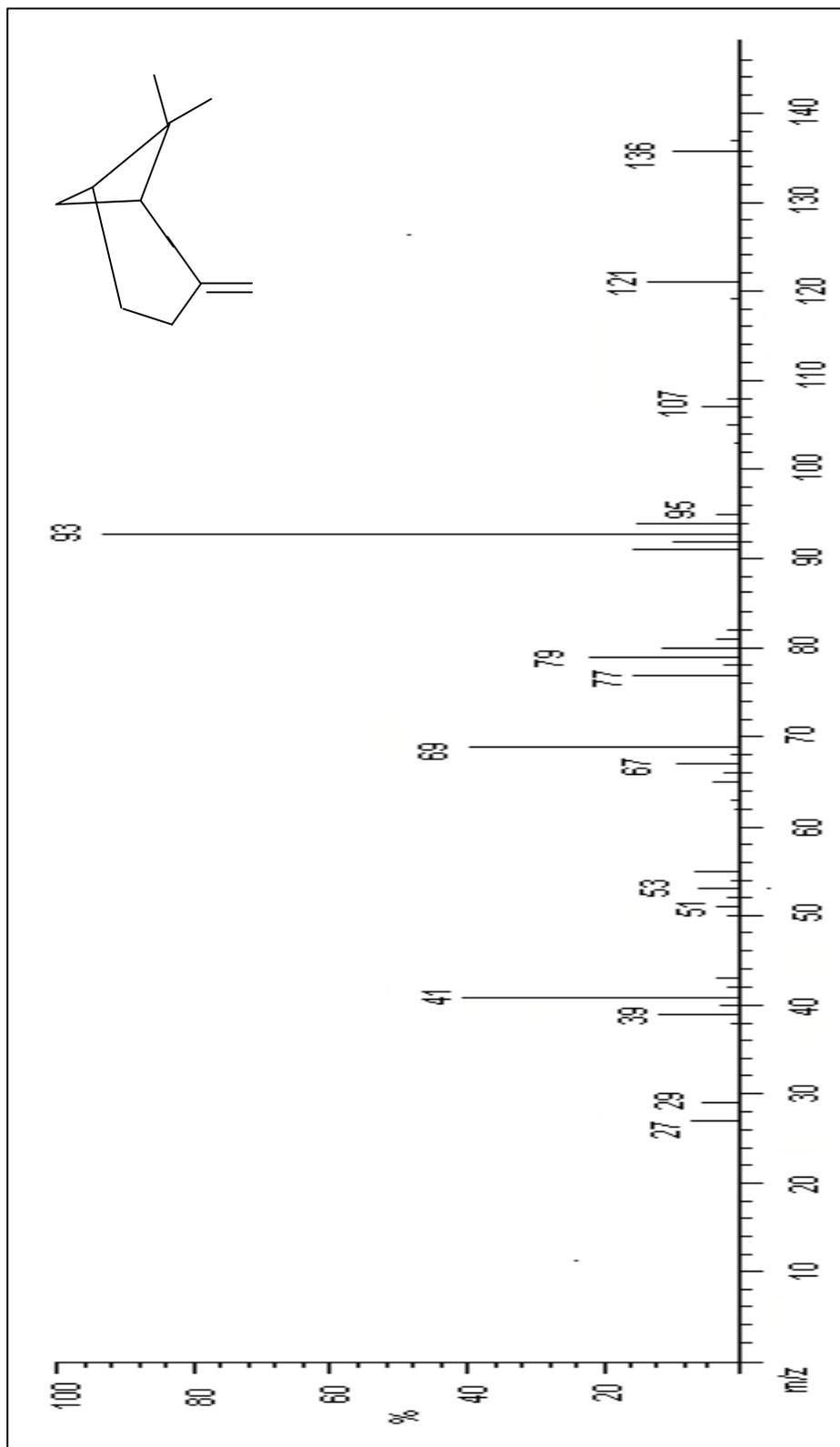
ESPECTRO 1. α -Pineno.

TR: 7.26 13.37%



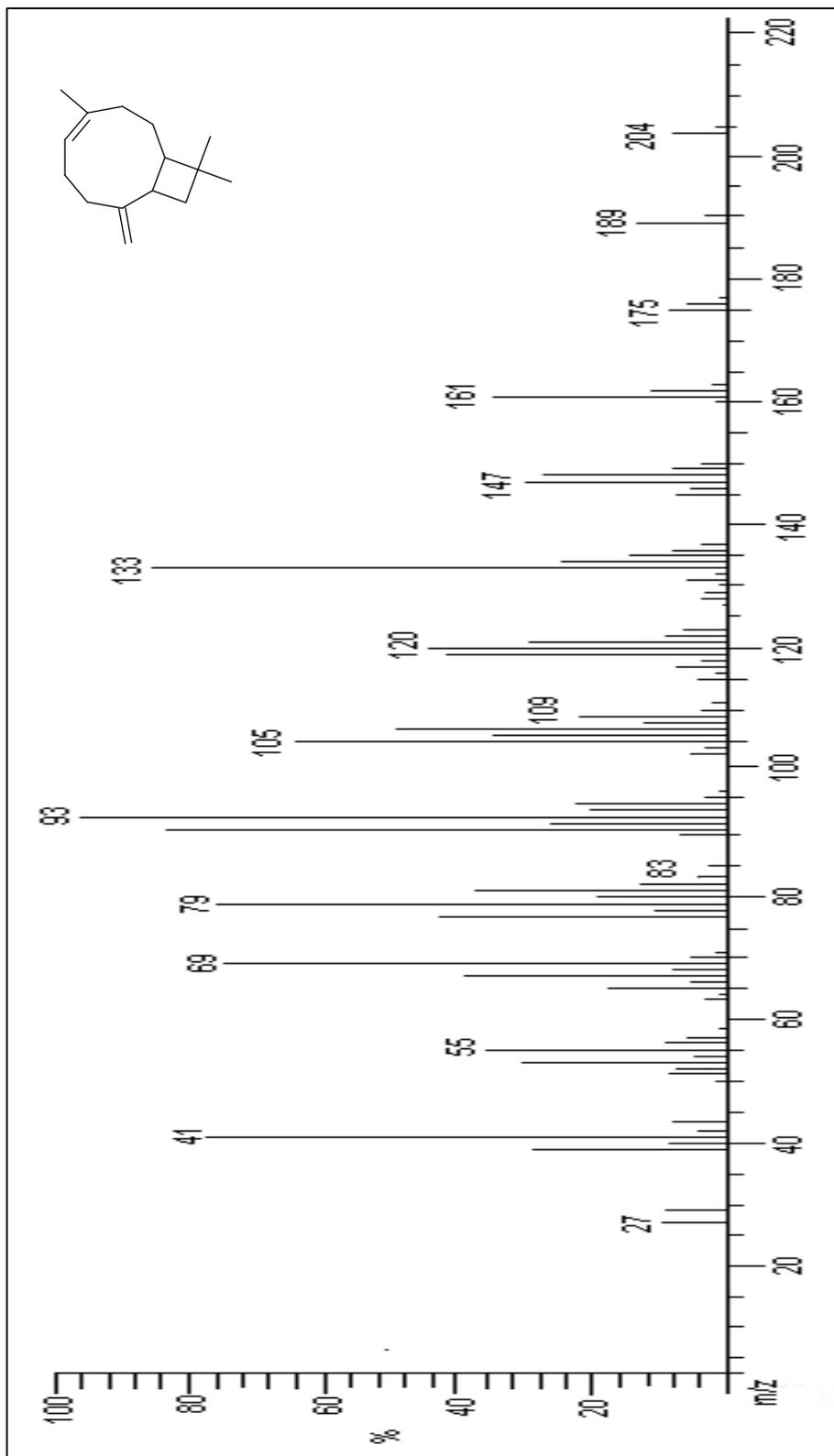
ESPECTRO 2. β - Pineno.

TR: 8.11 15.04%



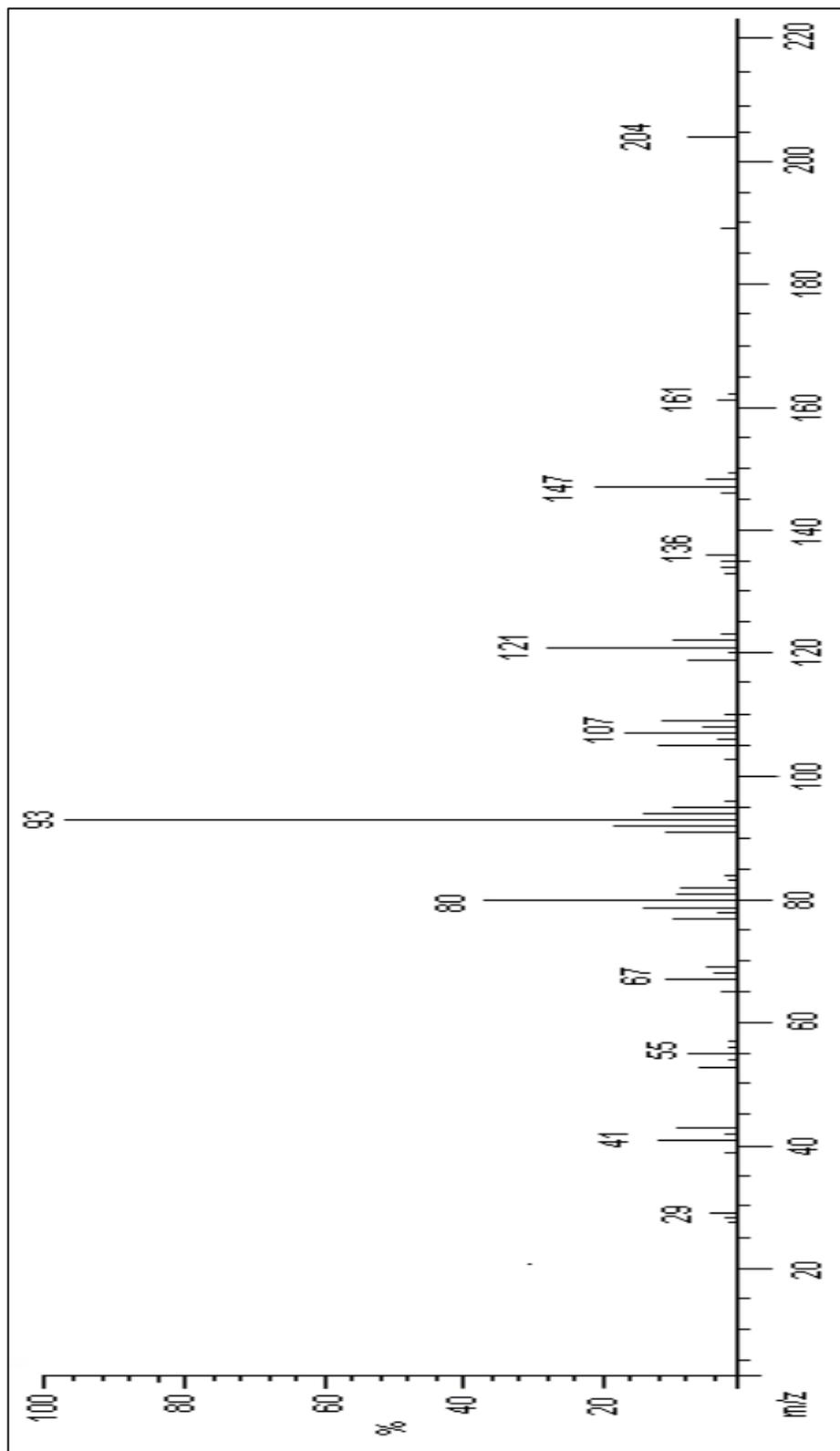
ESPECTRO 3. Cariofileno

TR: 16.27 11.42 %



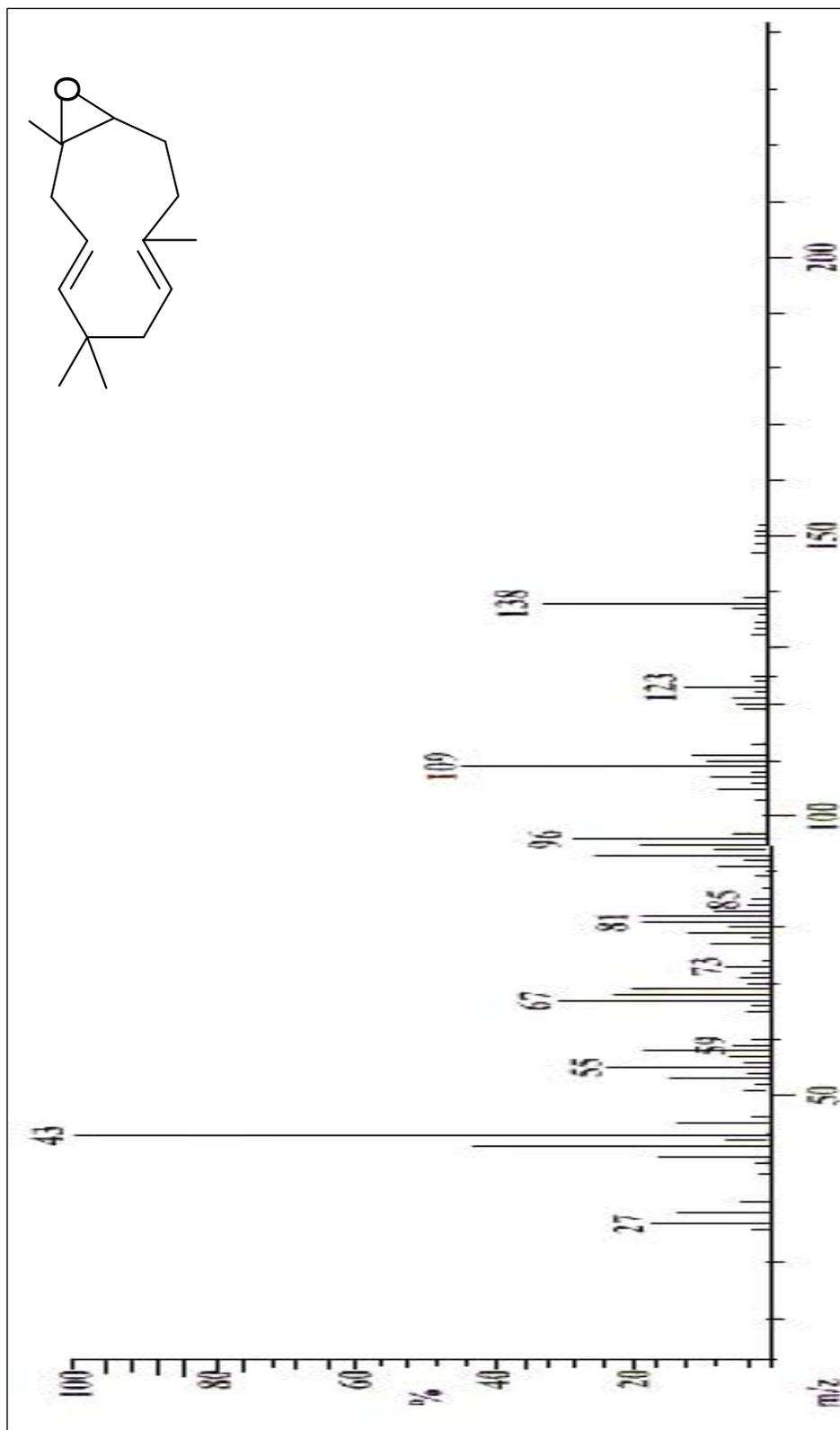
ESPECTRO 4. Humuleno

TR: 16.83 y 18.81 31.76 %



ESPECTRO 5. Epóxido de humuleno.

TR: 19.19 8.36 %



REFERENCIAS.

- Agelopoulos, N. G., Chamberlain, K. y Pickett, J. A. 2000. Factors affecting volatile emissions of intact potato plants, *Solanum tuberosum*. Journal of Chemical Ecology. 26(2):497-511.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez., P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. 1-20 pp.
- 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.
- Avila, J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis Maestría en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 111 pp.
- Ávila, O. 2005. 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. 57 pp.
- Betancourt, A.S. y Gutiérrez, D.M.A. 1999. *Proyecto Mercados Verdes Herbolarios*. Informe técnico final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología y Desarrollo de Tlaxcala y Puebla A.C. México, D.F. 250 pp.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. España. 594 pp.
-

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

- Campos, V. N., Salmen. E. L., Martins, S. J., Leopoldina V. M., Loiola, P. O., Moita, P. S., Mendonça de Araújo, R., Sousa, L. M. y Rocha, S. E. 2007. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. Science direct. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 16:1676–1682.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Aspers, S., De Bruyne, t., Hernans, N., Totté, J., Pietters, L. y Vlietinck, A. J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology. 79:213-220.
- Cowan, M. 1999. Plants Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Review. American Society for Microbiology. 12 (4):564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In : Buchanan, B., Grissem, W. y Jones, R. (Eds). Biology & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. 1250-1268 pp.
- David, J., Meira, M., David, J., Brandão, H., Branco, A., Agra, M. de F., Barbosa, V., de Queiroz, L.P. y Giulietti, A.M. 2007. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian *Caatinga* plants Fitoterapia. 78:215–218.
- Davis, B. D., Dulbeco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg, H. S. 1996. Tratado de microbiología. Ed. Masson. Barcelona. 1559 pp.
- De Albuquerque, U., de Medeiros, P., De Almeida, A., Monteiro, J., De Fretais, E., Gomes, J. y Dos Santos, J. 2007. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-
-

arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal de Ethnopharmacology*. 114:325-354.

De Menezes, J. E., Lemos, T. L., Silveira, E. R. y Pessoa, O. D. 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from leaves of *Cordia globosa* (Jacq.) H.B.K. from Northeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research*.

De Oliveira, J.C., Camara, C.A. y Schwartz, M.O. 2007. Volatile constituents of the stem and leaves of *Cordia* species from mountain forests of Pernambuco (North-eastern Brazil). *Journal of Essential Oil Research*.

Díaz, J.L. 1976. Estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. 10^a. Ed. IMEPLAM, A.C., México. 144 pp.

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

Durán, D. A., Vargas, V. A. y Cisneros, C. A. E. 2005. Bioestadística. Segunda edición. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 260 pp.

Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Atti, D. A. C., Paroul, N., Wasum, R. y Atti, S. L. 2003. Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31:467-475.

Godínez-Caraballo, D., y Volpato, G. 2008. Plantas medicinales que se venden en el mercado El Río, Camaguey, Cuba. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. México. 79(1):243-259.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

- González, M., López, I. L., González, M. S. y Tena, J., 2004. Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. Dirección de Publicaciones del Instituto Politécnico Nacional, México. 5 y 8 pp.
- Gros, G.E., Pomillo, A., Seldes, A. y Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaria General de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington. 147 pp.
- Harborne, J.B y Baxter, H. 1993. Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. London. 550-669 pp.
- Hernández, A. J. 1999. Programa nacional de medicina tradicional y natural. Ministerio de Salud Pública. Cuba. 8-9 pp.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Durán, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A y Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants use in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México), Journal of Ethnopharmacology. 88:181-188.
- Hernández, M.M. 2009. 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. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 87 pp.
- Kim, J., Marshall, M. R. y Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43:2839-2845.
- Koneman, W. E. 1991. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México. 461 pp.
-

- Lee, L. S., Brooks, L. O., Homer, L. E., Rossetto, M., Henry, R. J. y Baverstock, P. R. 2002. Geographic variation in the essential oils and morphology of natural populations of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 30:343-360.
- Longuefosse, J.L. y Nossin, E. 1996. Medycal ethnobotany survey in Martinique. *Journal of Ethnopharmacology*. 53:117-142.
- Mabberley, D. J. 1997. *The plant book*. Second. ed. Cambridge University. Press
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A. y Okulik, N. B. 2006. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- Martínez, J., Sulbarán de Ferrer, B., Ojeda de Rodríguez, G., Ferrer, A. y Nava, R. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 20:502-512.
- 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.
- Morales, Y., Herrera, M. C., y Muñoz, J. 2007. Cloranfenicol, un antibiótico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38 (001).
- Ortega, J., Barboza, A., Peña, N. y Ávila, D. 2007. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación antimicrobiana del extracto neutro de las hojas de *Cordia cylindrostachya* (Boraginaceae) Maracaibo. *Ciencia*. 15(2).
-

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de C. globosa (Jacq.) Kunth.

- 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.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México. 432 pp.
- Palá, P. J. 2002. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "*Eryngium*", en la península ibérica. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense De Madrid. Madrid. 269 pp.
- Sepúlveda, J. G., Porta, D. H. y Rocha, S. M 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3).
- Scull, R., Miranda, M. y Infante, R. 1998. Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río. Estudio etnobotánico I. *Revista Cubana Farmacológica*. 32(1):57-62
- Soberón, M. J. y Sarukhan, K. J., 1994. La biodiversidad de México. *Boletín de la ARRIF*. 1:1-6
- Souza, S. A., Lopes, M. S., Agra, M. de F., Leitão, E., Barbosa-Filho, J.M. y Sobral, M. 2004. Flavonoids from *Cordia globosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32:359
- Strasburger, E., Noll, F., Sdeneck, H. y Schimper, A. F. W. 2002. *Tratado de Botánica*. Octava Edición. Ediciones Omega. Barcelona. 381-385 pp.
- Takhtajan, A. 1996. *Diversity and classification of flowering plants*. Columbia University Press. Nueva York.
- 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.

Wink, M. 1999. Functions of plants secondary metabolites and their exploitation in Biotechnology. *Annual Plant Reviews*. 3:1-14.1
