



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**VARIACIÓN TEMPORAL EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Bursera arida* (Rose) Standl., Y VALIDACIÓN
DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

BRENDA ROJAS SORIANO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO DE MEX, 2012



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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Fue revisado por el siguiente jurado:

*Dr. Cesar Mateo Ortiz Flores
Dra. Ma. Margarita Canales Martínez
Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monrroy
M. en C. Ángel Durán Díaz
Biol. Luis Barbo Hernández Portilla*

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

*UNAM PAPIIT 218511-3
Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán (MGU/Useful Plants Project México)*

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que estuvieron conmigo apoyándome de cerca o lejos a quienes encontré a lo largo del camino de la carrera y sobre todo en la vida.

A mis tíos Ani, Flaco, Gris, Guigui, Lili, Mario y Rosa quienes estuvieron de tras de esto, brindándome tiempo espacio y apoyo en todo aspecto.

A mis peques Ise, Elías y Emiliano lo mejor de mi vida.

A mis amigos con quienes compartí grandes momentos, risas, emociones fuertes, chismes, trabajo, y demás, gracias.

A mi novio Ricardo por su apoyo incondicional, cariño, enseñanzas y acompañarme en esta etapa.

A mi directora y asesora de tesis Margarita Canales, quien me enseñó, orientó y apoyó en lo laboral y personal, un millón de gracias.

A los profesores Ángel, César, Luis y Marco quienes gentilmente y con dedicación me aportaron los adecuados comentarios y observaciones para mejorar la calidad de este trabajo.

Dedicatoria

Con mucho cariño a mi Abue Mamá Lina y a mi Mami.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| ANTECEDENTES | 5 |
| OBJETIVOS | 7 |
| Objetivo General: | 7 |
| Objetivos Particulares: | 7 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| Colecta de material | 9 |
| Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor | 9 |
| Determinación de la composición química del aceite esencial | 9 |
| Actividad Antibacteriana | 10 |
| Actividad Antifúngica. | 11 |
| Pruebas estadísticas. | 12 |
| RESULTADOS | 13 |
| I. Porcentaje de rendimiento | 13 |
| II. Composición química | 14 |
| III. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana del AE | 28 |

| | |
|---|----|
| IV. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana del AE | 31 |
| V. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica del AE | 31 |
| VI. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica del AE | 32 |
| DISCUSIÓN | 33 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| PERSPECTIVAS | 42 |
| APÉNDICE | 43 |
| APÉNDICE 1. Familia Burseraceae | 43 |
| APÉNDICE 2. <i>Bursera arida</i> (Rose) Standl. 1929. | 45 |
| APÉNDICE 3. Zona de Colecta | 48 |
| APÉNDICE 4. Método de arrastre de vapor (Domínguez 1973) | 51 |
| APÉNDICE 5. Cromatografía de Gases acoplada a E-M. | 52 |
| APÉNDICE 6. Constituyentes químicos del aceite esencial | 53 |
| APÉNDICE 7. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer. | 56 |
| APÉNDICE 8. Método de microdilución en agar | 57 |
| APÉNDICE 9. Inhibición del crecimiento radial | 59 |
| APÉNDICE 10. Estadística descriptiva | 60 |
| LITERATURA CITADA | 61 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Datos etnobotánicos de <i>B. arida</i> (Rose) Standl, 1929. | 6 |
| Cuadro 2. Rendimiento de los AEs | 13 |
| Cuadro 3. Constituyentes químicos \geq a 1% de los AEs por mes, abundancia relativa y naturaleza química. | 24 |
| Cuadro 4. Halos de inhibición (mm) del crecimiento sobre bacterias. | 28 |
| Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), y Concentración Bactericida Mínima (CBM)..... | 31 |
| Cuadro 6. Actividad cualitativa del AE de <i>B. arida</i> sobre Hongos levaduriformes | 31 |
| Cuadro 7. Actividad cualitativa del AE de <i>B.arida</i> sobre Hongos Filamentosos | 32 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diseño experimental..... | 8 |
| Figura 2. Separación del material biológico de <i>B. arida</i> | 9 |
| Figura 3. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Marzo 2010 | 16 |
| Figura 4. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Marzo 2011 | 17 |
| Figura 5. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Abril 2010 | 18 |
| Figura 6. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Abril 2011 | 18 |
| Figura 7. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Mayo 2010 | 20 |
| Figura 8. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Junio 2010 | 21 |
| Figura 9. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Agosto 2010 | 21 |
| Figura 10. Cromatograma del AE de <i>B. arida</i> Octubre 2010..... | 23 |
| Figura 11. Actividad antibacteriana de los AEs de <i>B. arida</i> | 29 |
| Figura 12. Actividad del AE sobre las cepas bacterianas..... | 30 |
| Figura 13. Actividad de los tratamientos sobre el tipo de cepa bacteriana Gram (+) y Gram (-) | 30 |
| Figura 14 . Concentración Fungicida Mínima (CFM); (A) testigo, (B) concentración 4 mg/mL del AE de <i>B. arida</i> ; 5: <i>Aspergillus</i> <i>niger</i> , 6: <i>Aspergillus</i> sp. | 32 |
| Figura 15. Anatomía vegetal de <i>B. arida</i> | 45 |
| Figura 16. Ejemplar de <i>B. arida</i> | 46 |
| Figura 17. Poblado de San Rafael | 48 |
| Figura 18. Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor..... | 51 |

RESUMEN

En el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, *Bursera arida*, (árbol de 50 cm.- 4 m.), se emplea tradicionalmente para aliviar infecciones de heridas, fuegos, algodoncillo, y granos en la piel. Por lo que se planteó como objetivo analizar la composición química por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas; y evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial (AE) de *B. arida* durante Marzo-Octubre 2010 a Marzo-Abril 2011. La actividad antimicrobiana se evaluó de forma cualitativa (método de difusión de agar de Kirby Bäuier para bacterias y hongos levaduriformes; inhibición del crecimiento radial para hongos filamentosos) y cuantitativa (método de microdilución en caldo). Dando como resultado una variación temporal en la composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (AEs) de tallos. El nonano (alcano) se muestra en mayor proporción y los terpenos canfeno, cariofileno, α -pineno, α -felandreno, γ -terpineno están presentes en todas las temporadas muestreadas. Estadísticamente existen diferencias significativas entre la actividad antibacteriana del AE de los diferentes meses de colecta. Marzo 2010, Marzo 2011(temporada de secas) y Octubre 2010 (temporada de lluvias), muestran los halos de inhibición de mayor diámetro. Durante Abril-Octubre 2010 a Marzo-Abril 2011, *Escherichia coli* fue la cepa que mostró halos de mayor diámetro (media= 15.2) y en Marzo 2010 la cepa que tuvo halos de mayor diámetro (media= 12.57) fue *Streptococcus pneumoniae*, sin embargo, estadísticamente el aceite actúa de igual manera sobre bacterias positivas y negativas. Por otra parte el hongo levaduriforme *Candida albicans* fue la cepa con mayores halos durante Marzo 2010 y Octubre 2010. En cuanto a los hongos filamentosos, *Aspergillus niger* y *Aspergillus* sp. mostraron inhibición de la esporulación frente al AE del mes de Marzo 2010.

Se concluye que el aceite esencial de *B. arida* muestra actividad antimicrobiana y que hay una variación temporal tanto en la composición química como en la actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

La investigación en etnobotánica constituye un valioso aporte para la conservación, rescate y difusión del conocimiento popular de las comunidades y la preservación de la biodiversidad (Puerta y León, 2009).

En México, las plantas medicinales responden a una tradición cultural acumulada a través de los siglos, utilizándolas para curar, tranquilizar, adornar, perfumar, sazonar y cocinar, contando así con una genealogía extensa en relación al conocimiento del uso tradicional de la flora (Méndez y Olaya, 2003; Olivas, 1999).

Las plantas medicinales y aromáticas son una parte fundamental de los sistemas de medicina tradicional y son a su vez, una importante fuente de materia prima y transformadores finales. Para algunos, la medicina natural y tradicional está constituida por un conjunto de prácticas y medicamentos, susceptible de explicación o no, utilizados para prevenir, diagnosticar y eliminar los desequilibrios físicos, mentales o sociales y que se basan exclusivamente en la experiencia y la observación práctica transmitido de generación en generación, oralmente o por escrito (Rodríguez et al., 2002).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que las plantas medicinales representan el único medio terapéutico para el 80% de la población mundial (Osorio, 2009).

Una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Akerlele, 1993).

Desde hace unos años, el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante. Esto se debe a una serie de factores,

el público hoy en día tiene más problemas con la sobre prescripción y el mal uso de antibióticos de patente (Araujo y Salas, 2008).

Actualmente la medicina se desarrolla en medio de una crisis global de resistencia a los antimicrobianos, descrita para patógenos tanto en el ambiente hospitalario como ambulatorio (La Barca y Araos, 2009), los cuales en su gran mayoría, son resistentes a los antibióticos y requieren tratamientos alternativos más costosos y, muchas veces, de mayor toxicidad. La resistencia se extiende a antimicóticos, antimaláricos y antivirales, haciendo cada vez menos efectivos los viejos medicamentos (Álvarez et al., 2005).

La medicina tanto tradicional como natural forman parte importante de cada país y región del mundo con características propias, dependiendo de los recursos disponibles en ellos, y teniendo en cuenta los rasgos, temperamento, carácter pensamiento, la manera de ser de sus habitantes (Del Pozo, 2006).

México no solamente se distingue por su diversidad de recursos naturales, y culturales sino también por su alto índice de endemismos, es decir, de especies que solamente se encuentran dentro de los límites geopolíticos del país (INE, 2007). Tal es el caso del valle de Tehuacán–Cuicatlán el cual está constituido por un mosaico de comunidades vegetales, generando un alto porcentaje de especies de plantas endémicas (Smith, 1965a; Smith, 1965b; Villaseñor, 1992; Dávila et al., 1995; Dávila et al., 2002a; Méndez et al., 2004).

Entre las cuales se encuentra el género *Bursera* el cual pertenece a la familia Burseraceae y cuenta con poco más de 100 especies a nivel mundial; sin embargo la mayoría de ellas son exclusivas del país, distribuyéndose principalmente a lo largo de la costa del Pacífico (Rzedowski y Kruse, 1979). Ha sido una fuente importante de perfumes, medicinas, resinas y aceites esenciales.

Los aceites esenciales se acumulan en estructuras secretoras especializadas ubicadas en diferentes partes de la anatomía de las plantas, en hojas, flores, tallos, raíces, corteza, frutos y semillas (Vargas y Bottia, 2008).

Los aceites esenciales son volátiles, naturales, son una mezcla de compuestos (terpenos, alcoholes, éteres, esteroides, fenoles, cetonas, aldehídos) caracterizados por tener un fuerte aroma y sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios, conocidos por sus propiedades antisépticas, como bactericidas, virucidas, fungicidas, también por sus propiedades medicinales y sus fragancias. Han sido utilizados por el hombre para embalsamar a los muertos, preservar los alimentos y como antimicrobianos, analgésicos, sedantes, antiinflamatorios, espasmolíticos y anestésicos locales.

En la naturaleza, los aceites esenciales juegan un papel importante para las plantas, dándoles protección contra las bacterias, virus, hongos, insectos y contra herbívoros. También atraen a los insectos para que sirvan como dispersores de polen y de semillas (Bakkali et al., 2008).

En diferentes estudios sobre la flora útil realizados en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán se menciona a *Bursera arida* (Apéndice 2) atribuyéndole diversos usos entre los que son de interés, se encuentra el uso medicinal. Cuya importancia se centra en la obtención de aceite esencial, esto se interpreta debido al uso y modo de empleo registrado en estudios etnobotánicos (Cuadro 1).

ANTECEDENTES

B. arida es endémica de México y sólo es conocida en el estado de Puebla y Oaxaca (Rzedowski et al., 2004).

Se ha llevado a cabo el registro de la distribución (Valiente et al., 2000, Méndez et al., 2004, Rzedowski et al., 2005), descripción botánica, claves de identificación, y aspectos ecológicos, (Rzedowski et al., 2004, Medina, 2008) en los estados de Puebla y Oaxaca.

Acerca del uso local y modo de empleo tradicional de *B. arida* (*Cuadro 1*), destaca Arias et al., 2000 quienes realizaron el registro de la flora del municipio de Zapotitlán Salinas, Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, donde la planta de *B. arida* se emplea como desinfectante utilizando la goma que exuda cuando es dañada mecánicamente, es utilizada, para el dolor de muelas y para torcer el ombligo de los recién nacidos. Los trozos de tallo son utilizados como remedio para la tos. Además se le atribuyen propiedades antidepresivas.

También destaca el estudio realizado por Canales et al., (2006) sobre la consistencia y distribución del conocimiento tradicional de la flora medicinal de San Rafael, en el municipio de Coxcatlán, Puebla, reportando así, el uso del exudado de la planta *B. arida* en infecciones de heridas, fuegos, algodoncillo y granos en la piel. Empleándose “el juguito” directo sobre la parte afectada al hacer un corte al tronco de la planta.

Otros estudios como el reportado por Dávila et al., (2002b), solo mencionan su uso como medicinal. Mientras que Rzedowski et al., (2004, 2005) y Medina (2008) registraron que los troncos de esta planta se emplean a manera de horcones.

Estos datos representan el conocimiento popular de las comunidades del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Sin embargo es necesario validar científicamente este conocimiento para así rescatarlo, conservarlo y difundirlo.

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de *B. arida* (Rose) Standl, 1929.

| | Nombre común | Lugar | Año | Parte usada | Uso | Forma de uso |
|---|-----------------------|--|--|-----------------------|---|---|
| <i>Bursera arida</i> (Rose) Standl, 1929. | Copalillo Cuajote | Mpo. Zapotitlán Salinas, Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. | Arias et al., 2000 | Goma, trozos de tallo | Desinfectante, dolor de muelas, para torcer el ombligo de recién nacidos, tos tiene propiedades antidepresivas. | Utilizan la goma que exuda cuando es dañada mecánicamente. Los trozos de tallo son utilizados como remedio para la tos. |
| | Aceitillo | San Rafael Coxcatlán | Dávila et al., 2002b | Exudado | Medicinal. | |
| | Cabrestillo Zapotillo | Cuenca de Papaloapan, México: Teotitlán, Tehuacán, Coxcatlán, Coixtlahuaca, Zapotitlán | Rzedowski, et al., 2004, 2005; Medina, 2008. | Tronco | Horcones para casas. | |
| | Aceitillo | San Rafael Mpo. Coxcatlán, Valle de Tehuacán Cuicatlán | Canales et al., 2006. | Exudado | Infección de heridas, fuegos, algodoncillo, granos en la piel. | Se hace un corte al tronco de la planta y “el juguito” que escurre, se coloca directo sobre la parte afectada. |

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Realizar el análisis de la composición química del aceite esencial (AE) de *Bursera arida* en diferentes meses de colecta y evaluar su actividad antimicrobiana.

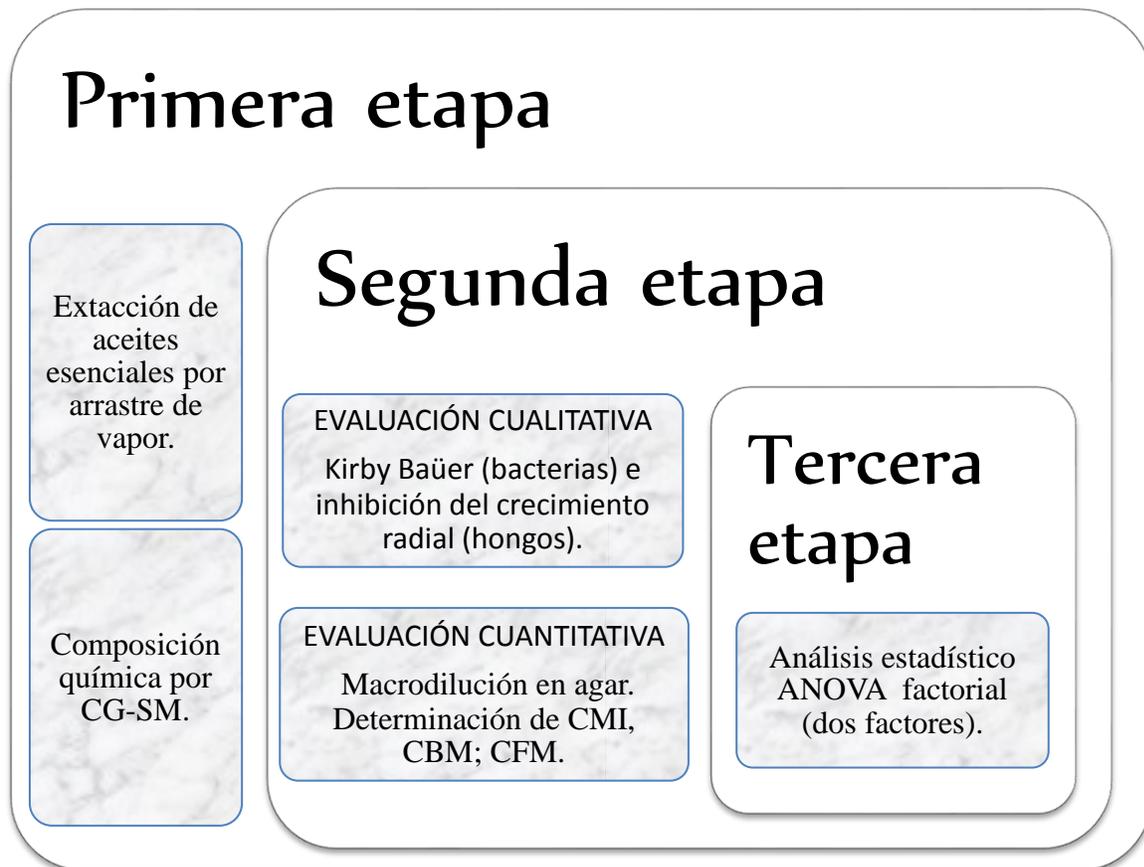
Objetivos Particulares:

- Obtener el aceite esencial de *B. arida* de diferentes meses de colecta, por el método de arrastre de vapor.
- Analizar la composición química del aceite esencial, aplicando una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de forma cualitativa (método de difusión de agar de Kirby Baüer para bacterias y hongos levaduriformes; inhibición del crecimiento radial para hongos filamentosos) y cuantitativa (método de microdilución en caldo).

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se abordó desde dos aspectos, químico y biológico. Dentro del estudio químico se extrajeron los aceites esenciales de corteza ramas hojas y frutos e identificaron los compuestos presentes en ellos; con el estudio biológico se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, y por último se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos, de esta manera la fase experimental se dividió en tres etapas (*Fig. 1*).

Figura 1. Diseño experimental



Colecta de material

El material vegetal necesario de *B. arida* fue colectado durante los meses de marzo, abril, junio, agosto, septiembre, octubre, en el año 2010 y marzo, abril de 2011 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla (*Apéndice 3*). Se separó el material en hojas, frutos, las ramas se cortaron en trozos pequeños y corteza (*Fig. 2*).

Figura 2. Separación del material biológico de *B. arida*



(1) Hojas, (2) frutos, (3) corteza, (4) ramas, (5) tallo con resina (*).

Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor

Los aceites esenciales se extrajeron mediante la técnica de arrastre de vapor, de corteza, ramas, hojas y fruto frescos (Domínguez, 1973) (*Apéndice 4*). Posteriormente se calculó el rendimiento y densidad de los AEs.

Determinación de la composición química del aceite esencial

La composición química se obtuvo mediante un Cromatógrafo de Gases (Modelo 6850) Acoplado a Espectrómetro de Masas (Modelo 5975C); ambos marca Agilent Technologies, fabricados en China; columna HP-5MS (fabricada en USA) de 30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interno y película de 0.25 μm el tipo de inyección fue Split, y la cantidad de muestra empleada fue 0.1 μL (*Apéndice 5*).

Actividad Antibacteriana

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se emplearon las siguientes cepas de bacterias:

► Gram-positivas:

Enterococcus faecalis ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* aislada de un caso clínico donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano).

► Gram-negativas:

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, *Yersinia enterocolitica*, fue donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM) y *Escherichia coli* ATCC 53218, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, aisladas de casos clínicos, donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano).

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.

Se evaluó de acuerdo con el método modificado de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 7). Se utilizó el AE de la primera colecta realizada: Marzo 2010, posteriormente, a partir de los resultados de este ensayo, se tomó como criterio cepas con halos de inhibición mayores y mayor incidencia en las infecciones que afectan al hombre, para evaluar la actividad antimicrobiana de los demás AEs muestreados. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Cloramfenicol (25 µg por disco). Los discos se impregnaron con 5 µL de AE. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.

Los AE que tuvieron mayores halos de inhibición en la evaluación cualitativa se seleccionaron para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM), utilizando la técnica de microdilución en caldo modificado (Koneman, 1985) (Apéndice 8). Las concentraciones que se aplicaron para los bioensayos cuantitativos fueron: 4, 3, 2, 1, 0.5, 2.5 mg/mL. El bioensayo de cada concentración se realizó por triplicado.

Actividad Antifúngica.

Para la evaluación de la actividad antifúngica se emplearon las siguientes cepas hongos:

► Filamentosos:

Aspergillus niger CDBB-H-179, *Aspergillus sp.* donada por el Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, laboratorio de microbiología UBIPRO, FES-I, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112, *Fusarium sporotrichoides* ATTC NRL3299, *Fusarium moniliforme* donadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-I y *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306.

► Levaduriformes:

Candida albicans ATCC 10231 y donada por el laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM. Dr. Rubén López Martínez (responsable) Dra. Patricia Manzano Gayoso. *Candida albicans* aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala. *Candida glabrata*, *Candida albicans* aislada de un urocultivo y *Candida tropicalis*.

Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.

Hongos filamentosos.

Para el análisis cualitativo se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 9) usando una concentración de 5 µL por disco del AE de la primer colecta

realizada: Marzo 2010 a probar y como control positivo ketoconazol (7 μg) (Wang y Bun, 2002). Cada bioensayo se realizó por triplicado.

Hongos Levaduriformes,

Se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (*Apéndice 7*). Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con ketoconazol (8 μg por disco). Los discos son impregnados con 5.0 μL del aceite esencial. Los bioensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.

Hongos filamentosos

Para la determinación de la concentración fungicida mínima (CFM), se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun, 2002 (*Apéndice 9*) disolviendo el aceite esencial en el medio de cultivo. Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL, cada bioensayo se realizó por triplicado.

Pruebas estadísticas.

Estadística descriptiva

Consistió en obtener las medidas descriptivas (Media, desviación estándar, cuartiles: 1, 2, 3 y coeficiente de variación) (*Apéndice 10*) de los halos generados por tratamiento, cepa bacteriana y tipo de cepa bacteriana (Gram positivas y Gram negativas), así mismo se elaboraron diagramas de caja para compararlos.

Estadística inferencial

Consistió en aplicar a los datos obtenidos de la actividad antibacteriana un análisis de varianza factorial (dos factores) para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos, entre las cepas microbianas, y entre el tipo de cepa bacteriana (Gram positiva y Gram negativa).

RESULTADOS

I. Porcentaje de rendimiento

En el *Cuadro 2* se muestra el rendimiento del aceite esencial extraído de *B. arida* durante los meses evaluados. Siendo de esta manera Marzo 2010 (1.20%), Abril 2010 (1.27%) y Marzo 2011 (1.56%) los meses con mayor porcentaje de rendimiento, Agosto 2010 (0.23%) presento bajo porcentaje de rendimiento en comparación con los demás meses muestreados.

Cuadro 2. Rendimiento de los AEs .

| Temporada | Mes/Año | Parte utilizada | Presencia de AE | Rendimiento (%) | Densidad (gr/ml) |
|--------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Secas 2010 | Marzo | Ramas | ✓ | 1.20 | 0.74 |
| | | Hojas (/) | - | - | - |
| | | Fruto | ✓ | 0.8 | 0.67 |
| | Abril | Ramas | ✓ | 1.27 | 0.65 |
| | | Hojas (/) | - | - | - |
| | | Fruto | ✓ | 0.42 | 0.87 |
| | Mayo | Ramas | ✓ | 0.92 | 0.70 |
| | | Hojas (/) | - | - | - |
| | | Fruto (/) | - | - | - |
| | Junio | Ramas | ✓ | 0.31 | 0.69 |
| | | Hojas | × | - | - |
| | | Fruto | × | - | - |
| Lluvias 2010 | Agosto | Ramas | ✓ | 0.23 | 0.74 |
| | | Hojas | × | - | - |
| | | Fruto | × | - | - |
| | Septiembre | Ramas | × | - | - |
| | | Hojas | × | - | - |
| | | Fruto | × | - | - |
| | Octubre | Ramas | ✓ | 0.96 | 0.86 |
| | | Hojas | × | - | - |
| | | fruto | × | - | - |

| Temporada | Mes/Año | Parte utilizada | Presencia de AE | Rendimiento (%) | Densidad (gr/ml) |
|------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Secas 2011 | Marzo 2011 | Ramas | ✓ | 1.56 | 0.74 |
| | | Hojas (/) | - | - | - |
| | | Fruto (/) | - | - | - |
| | Abril 2011 | Ramas | ✓ | 0.78 | 0.82 |
| | | Hojas (/) | - | - | - |
| | | Fruto (/) | - | - | - |

(✓) Si hubo presencia de aceite esencial, (×) no hubo presencia de aceite esencial; (/) no hay hojas y/o fruto en el mes muestreado.

II. Composición química

Mediante la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se obtuvieron, los cromatogramas así como los perfiles químicos de los meses Marzo 2010 (*Fig. 3*), Marzo 2011 (*Fig. 4*), Abril 2010 (*Fig. 5*), Abril 2011 (*Fig. 6*), Mayo 2010 (*Fig. 7*), Junio 2010 (*Fig. 8*), Agosto 2010 (*Fig. 9*) y Octubre 2010 (*Fig. 10*). De manera general, se muestra la estructura química de los compuestos mayoritarios.

Se realizaron dos cuadros para representar los constituyentes químicos de los aceites esenciales de *B. arida* el primero abarca los compuestos mayoritarios, minoritarios y los compuestos presentes en todos los meses (*Apéndice 6*). El segundo cuadro abarca los constituyentes que representan $\geq 1\%$ de abundancia relativa en adelante (*Cuadro 3*).

Así, al analizar la composición química (*Cuadro 3*), se observa que varía temporalmente en cuanto a número de constituyentes, constituyentes mayoritarios, minoritarios y los que están presentes en todos los meses muestreados (*Figs. 3-10*).

De acuerdo al tiempo de retención y sus patrones de fragmentación se identificaron 158 compuestos en el mes de Octubre 2010, seguido de Agosto 2010 con 133, Abril 2010 con 93, Marzo 2011 con 79, Junio 2010 con 70, Abril 2011 con 56, Mayo 2010 con 44 y Marzo 2010 con 18.

Se registran más compuestos de naturaleza terpénica entre los cuales se encuentran en orden decreciente monoterpenos sesquiterpenos alcanos y diterpenos (*Apéndice 6*)

El constituyente mayoritario en Marzo 2010, Abril 2010, Mayo 2010 Junio 2010, Agosto 2010, Marzo 2011 y Abril 2011, fue nonano (alcano) y α -felandreno (monoterpeno) en Octubre 2010; canfeno, cariofileno α -pineno, α -felandreno, γ -terpineno, como constituyentes presentes en todos los meses evaluados.

El mes de Octubre 2010 presentó un mayor número de sesquiterpenos (*Apéndice 3*), si tomamos en cuenta sólo los compuestos presentes $\geq 1\%$ en abundancia relativa, no muestra mucha diferencia con el mes de Abril 2011, sin embargo Octubre 2010 presenta más sesquiterpenos y diterpenos en contraste con los demás meses en cualquier caso.

Figura 3. Cromatograma del AE de *B. arida* Marzo 2010

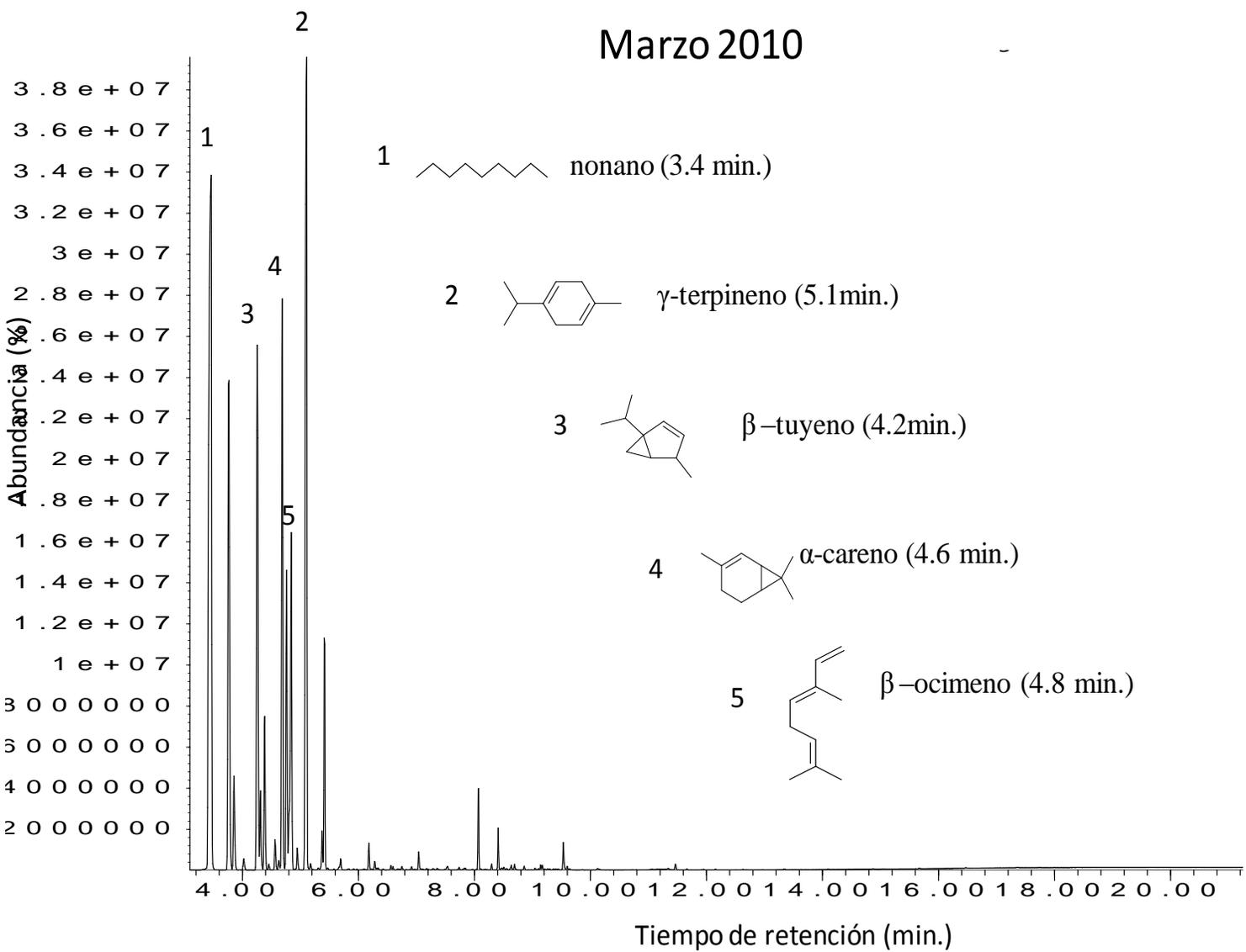
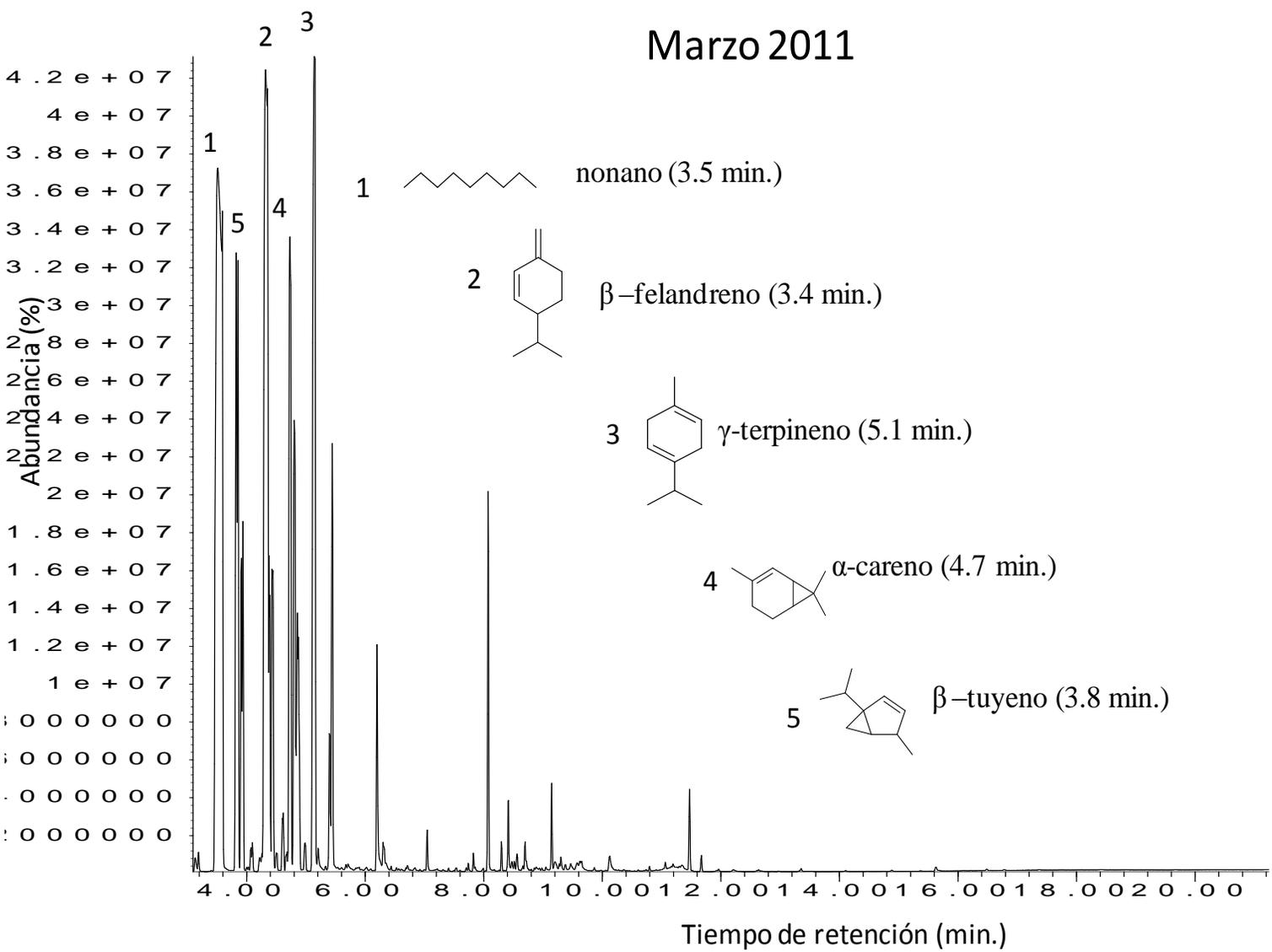


Figura 4. Cromatograma del AE de *B. arida* Marzo 2011



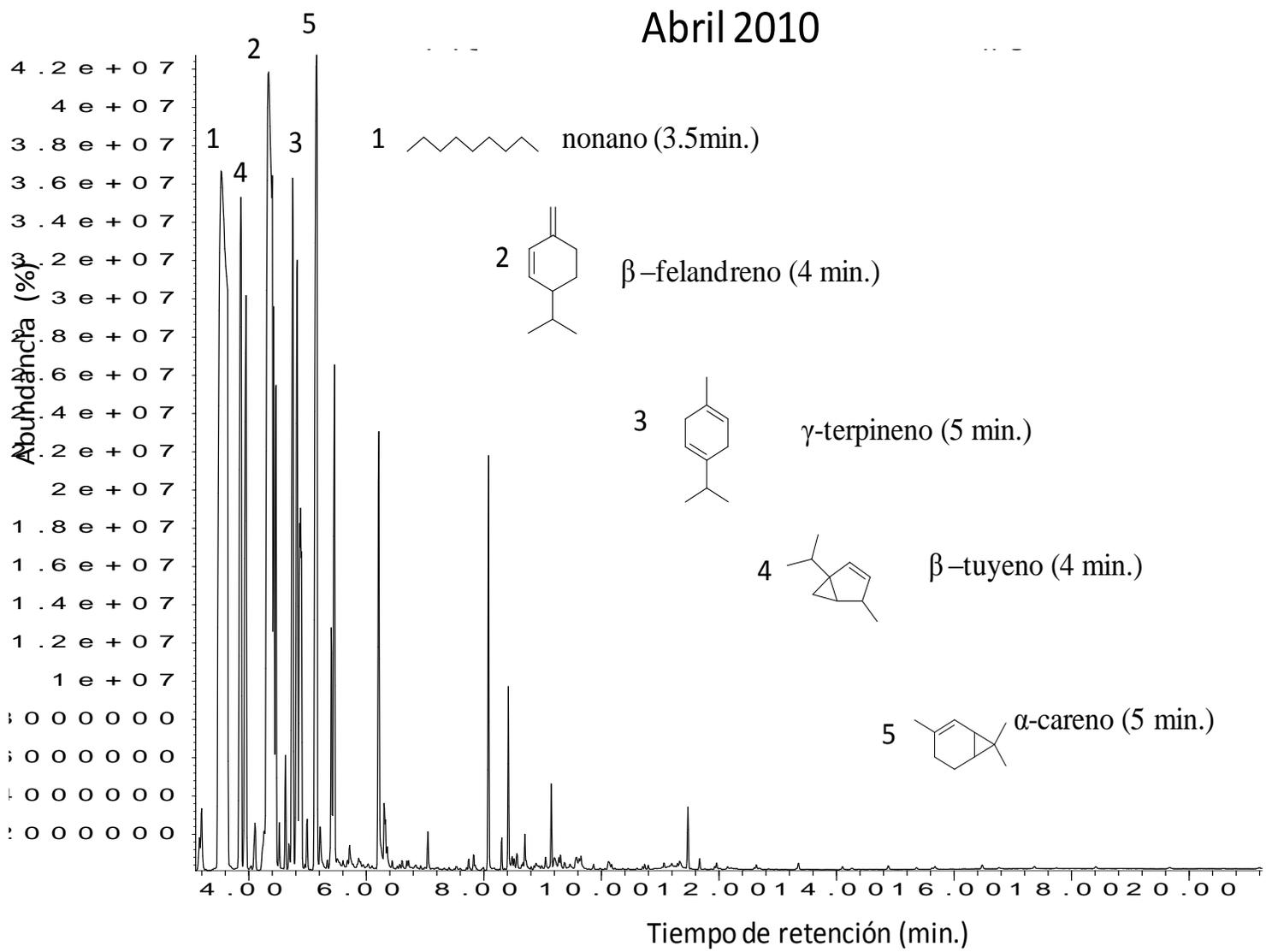


Figura 5. Cromatograma del AE de *B. arida* Abril 2010

Figura 6. Cromatograma del AE de *B. arida* Abril 2011

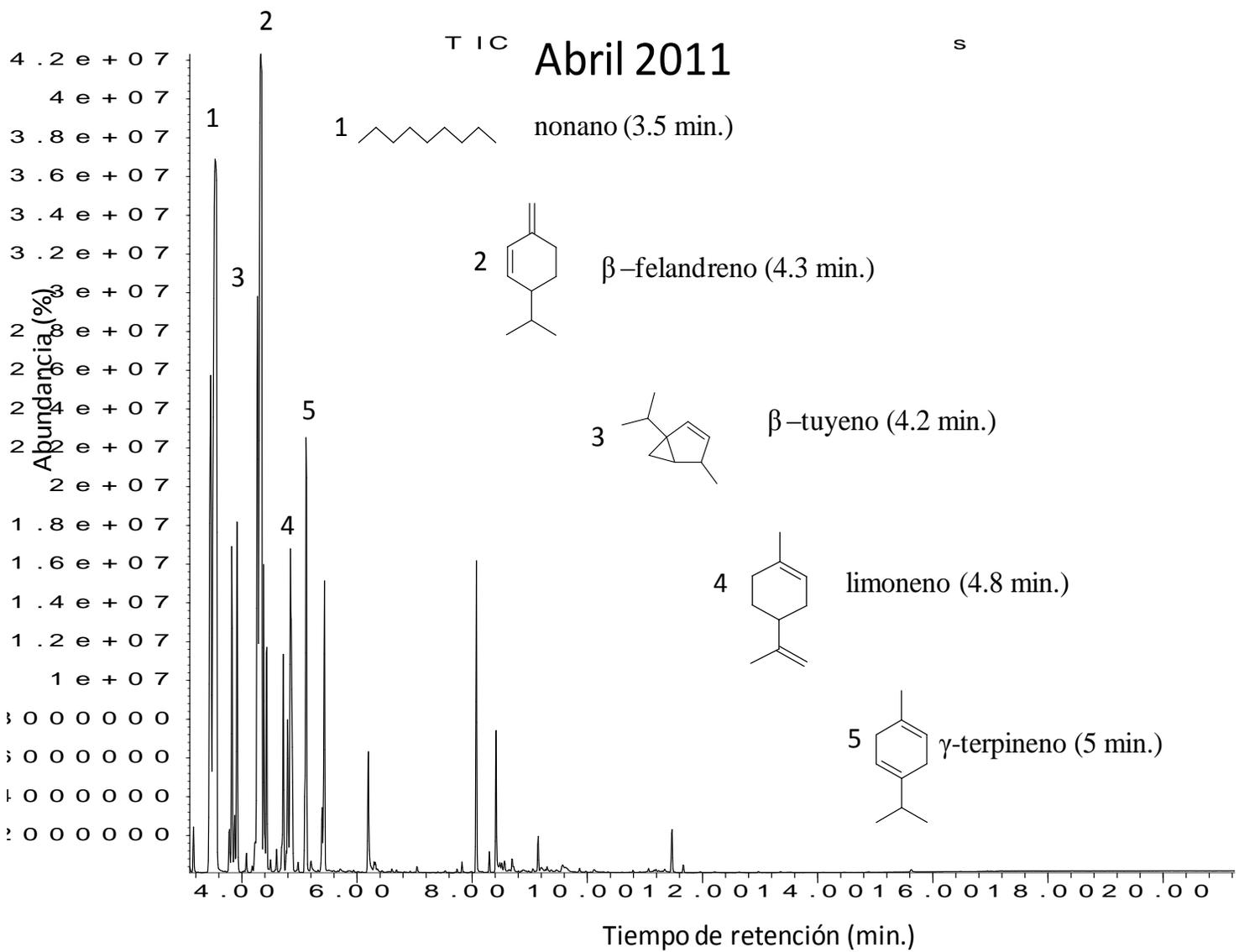


Figura 7. Cromatograma del AE de *B. arida* Mayo 2010

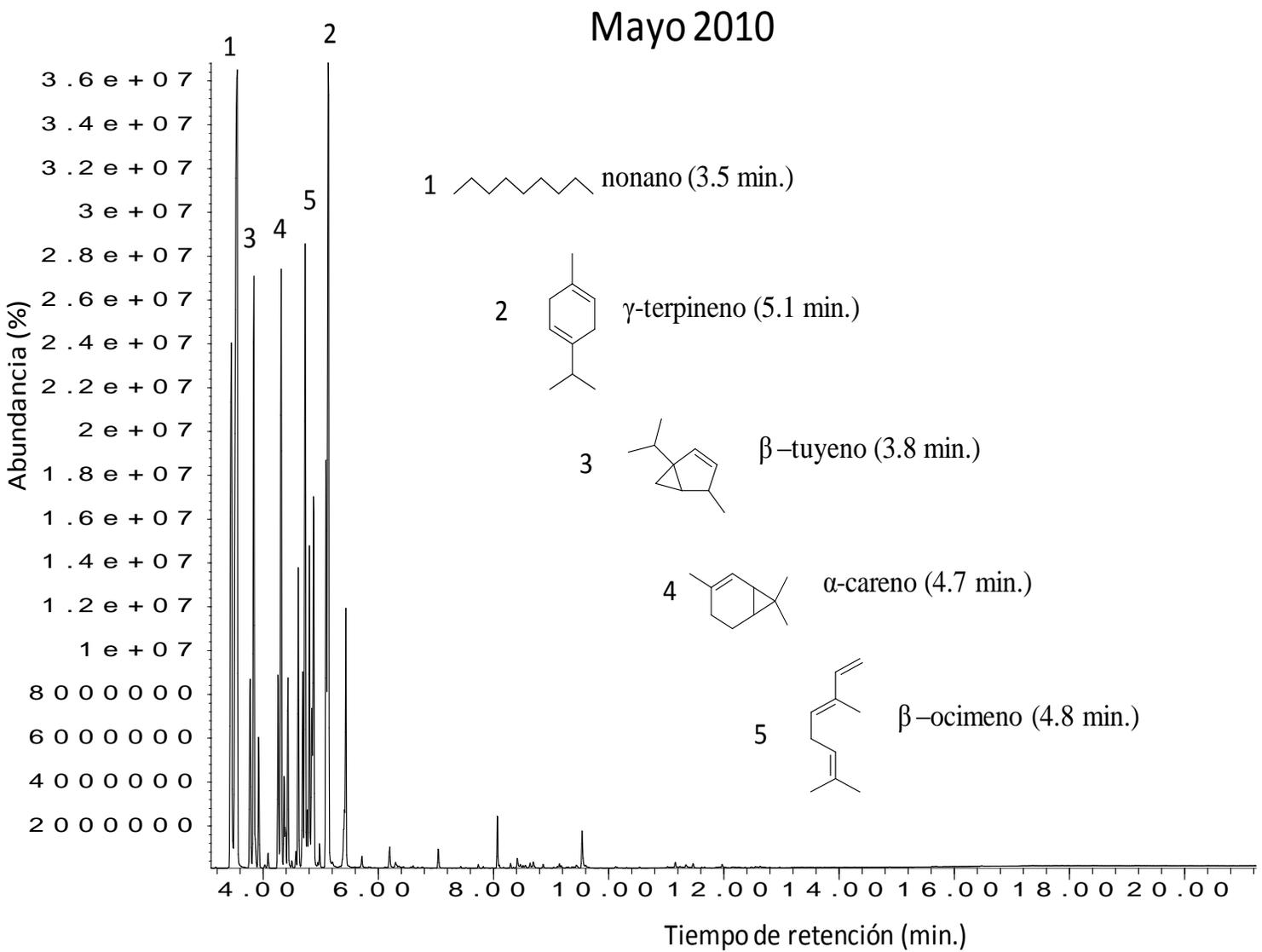


Figura 8. Cromatograma del AE de *B. arida* Junio 2010

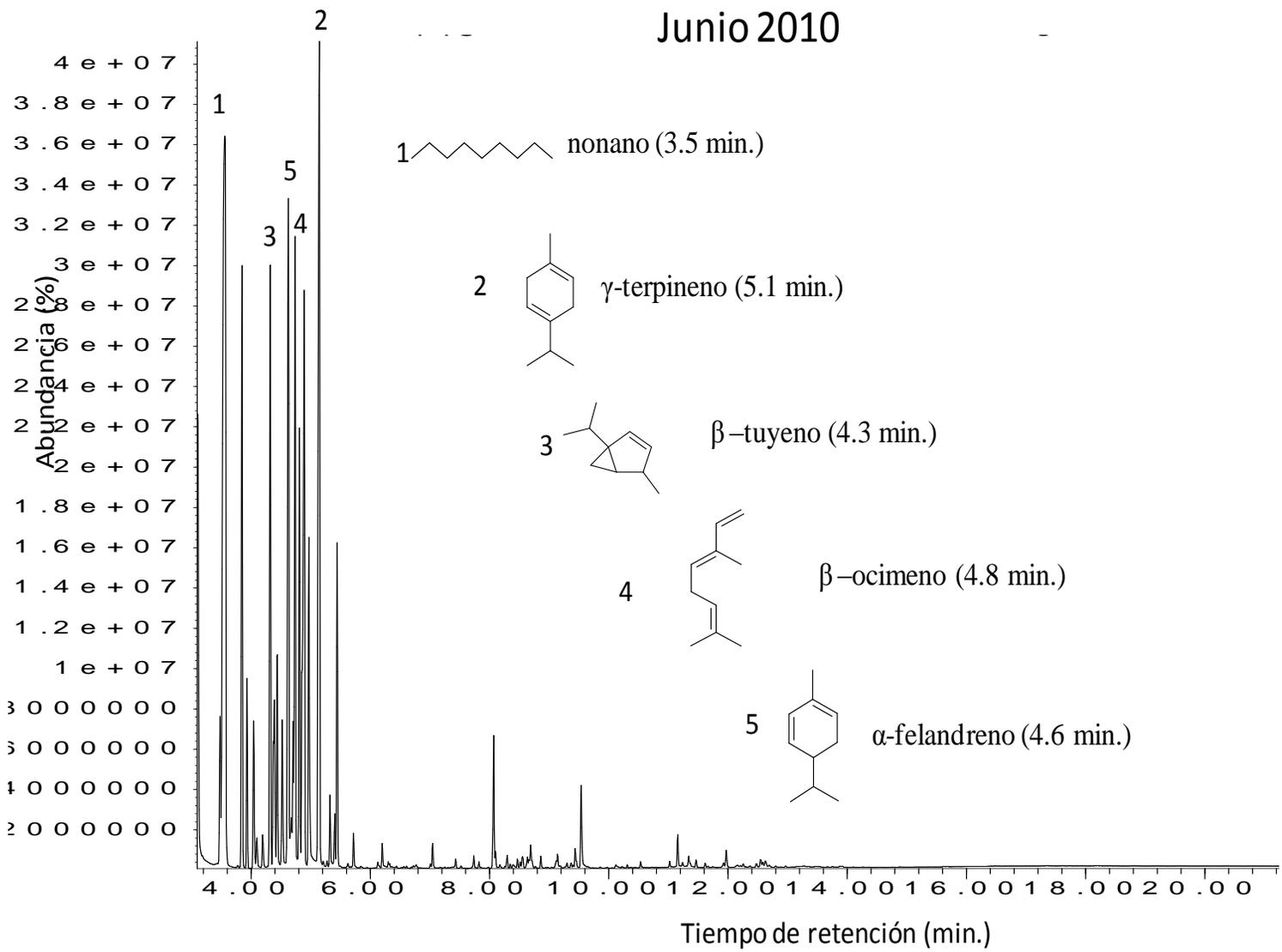
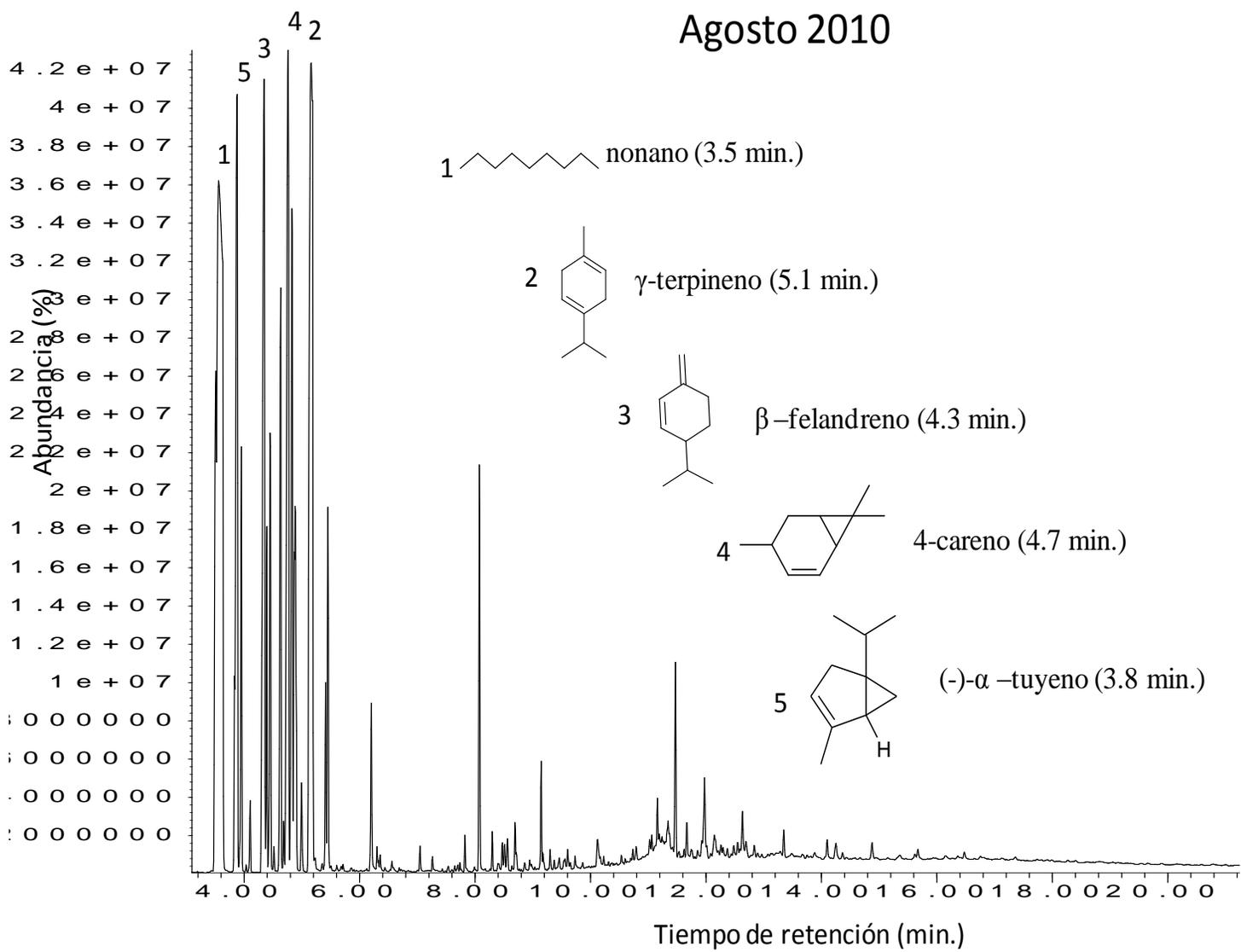


Figura 9. Cromatograma del AE de *B. arida* Agosto 2010



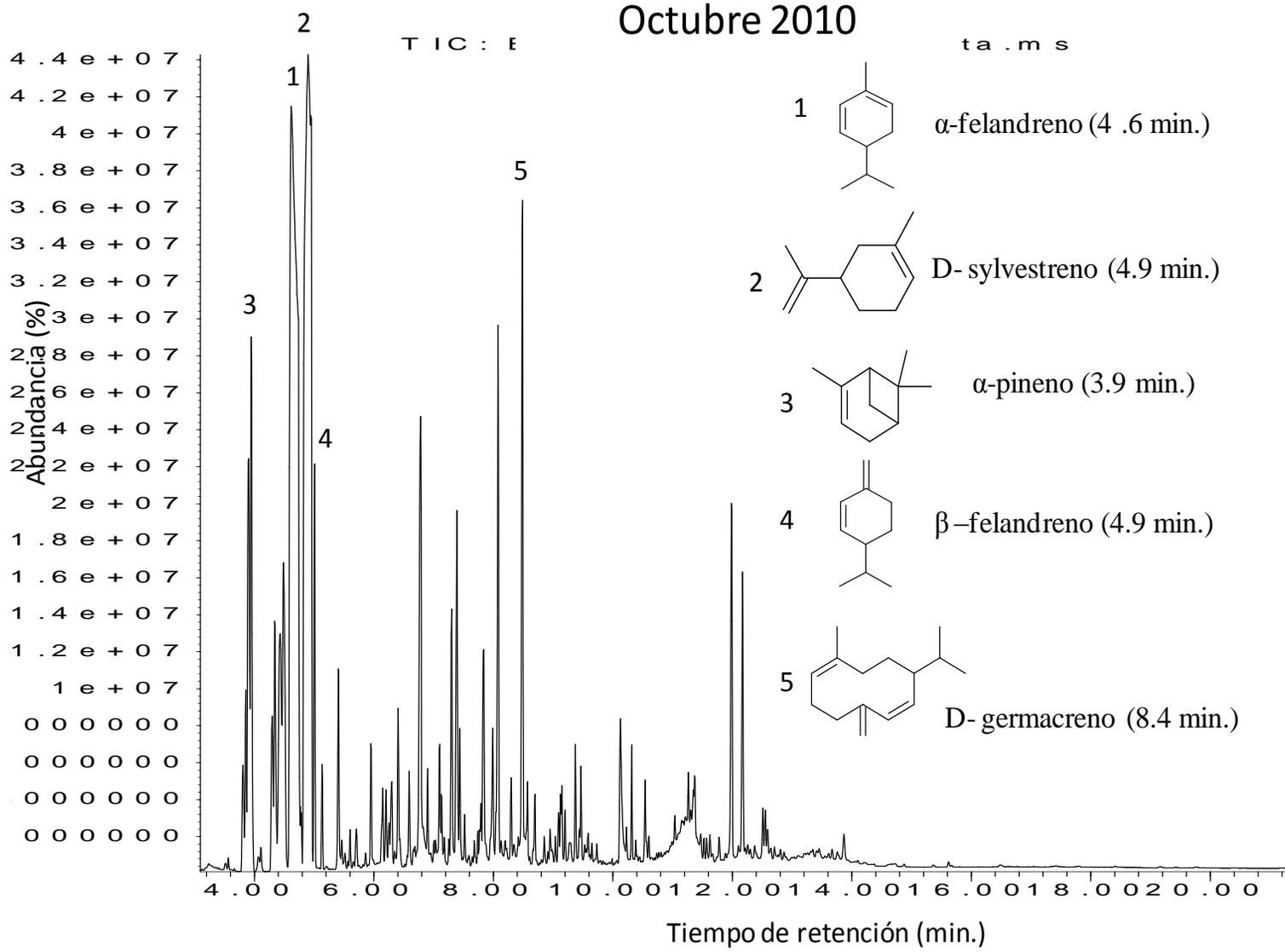
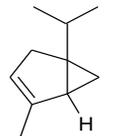
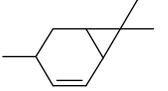
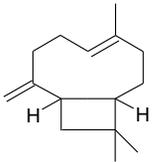
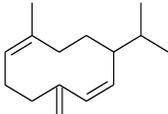
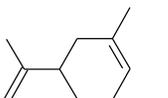
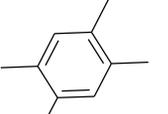


Figura 10. Cromatograma del AE de *B. arida* Octubre 2010

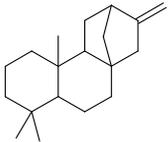
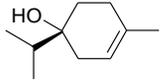
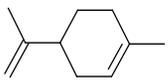
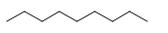
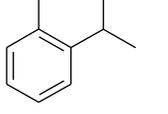
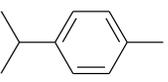
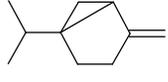
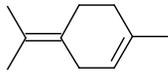
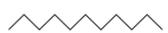
RESULTADOS

Cuadro 3. Constituyentes químicos \geq a 1% de los AEs por mes, abundancia relativa y naturaleza química.

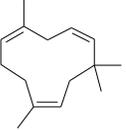
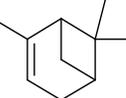
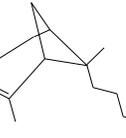
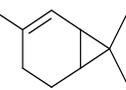
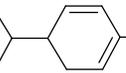
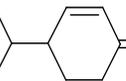
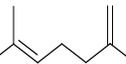
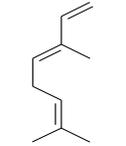
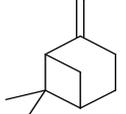
Abundancia en porcentaje de compuestos químicos del aceite esencial, encontrados por mes de Marzo 2010 a Abril 2011, tomando como criterio abundancias de \geq 1%, de esta manera se muestra la suma total en %, dejando fuera compuestos menores a 1% (trazas); T.R.: tiempo de retención expresado en minutos; T: tipo naturaleza química; A: alcano, M: monoterpreno, S: sesquiterpreno, D: diterpreno; (-) compuesto no presente; C. I. por C. G. E. M: Compuestos Identificados por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

| Compuesto | Estructura | T | T. R. | Mar- 10 | T. R. | Mar- 11 | T. R. | Abr- 10 | T. R. | Abr- 11 | T. R. | May- 10 | T. R. | Jun- 10 | T. R. | Ago- 10 | T. R. | Oct- 10 |
|---------------------------------------|---|--------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| (-)-α-tuyeno |  | M | | - | 3.8 | 3.7 | | - | | - | | - | | - | 3.8 | 7.3 | | - |
| 4-careno |  | M | | - | | - | | - | 4.7 | 2.17 | 4.6 | 3.8 | 4.7 | 6 | 4.7 | 7.5 | | - |
| cariofileno |  | S | 8 | 1.1 | 8 | 2.1 | 8 | 1.9 | 8 | 2.5 | 8 | 0.59 | 8 | 0.92 | 8 | 2 | 8 | 2.2 |
| D-germacreno |  | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 8.4 | 2.8 |
| D-sylvestreno |  | M | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 4.9 | 11.9 |
| dureno |  | H A | | - | | - | 5 | 4.1 | | - | | - | | - | | - | | - |

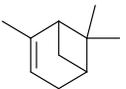
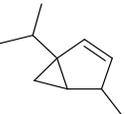
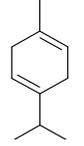
RESULTADOS

| Compuesto | Estructura | T | T. R. | Mar- 10 | T. R. | Mar- 11 | T. R. | Abr- 10 | T. R. | Abr- 11 | T. R. | May- 10 | T. R. | Jun- 10 | T. R. | Ago- 10 | T. R. | Oct- 10 |
|---------------|---|---|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|------------|
| kaureno |  | D | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 12 | 0.18 | - | 11. 9 | 1.7 | |
| L-4-Terpineol |  | M | - | 6.2 | 1.5 | 6 | 2.7 | 6.1 | 1.4 | - | - | - | - | 6.2 | 0.92 | - | - | |
| limoneno |  | M | - | - | - | - | 4.8 | 5.8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| nonano |  | A | 3.4 | 26.6 | 3.5 | 24.2 | 3.5 | 24.8 | 3.5 | 23.1 | 3.5 | 29 | 3.5 | 17.1 | 3.5 | 21.4 | - | |
| o-cimol |  | M | 4.7 | 4.6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 4.8 | 4.5 | - | - | |
| p- cimeno |  | M | - | 4.8 | 4.5 | - | 4.7 | 1.6 | 4.8 | 3.3 | 4.8 | 3.9 | - | 5 | 1.6 | - | - | |
| sabineno |  | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 4.3 | 1.2 | |
| terpinoleno |  | M | - | - | 5 | 1.2 | 5.4 | 0.64 | - | - | - | - | 5.4 | 0.84 | 5.4 | 1.1 | - | |
| undecano |  | A | 5.4 | 2.79 | 5.4 | 2.9 | 5 | 3.2 | 5.4 | 2.9 | 5.4 | 3.4 | 5.4 | 2.7 | 5.5 | 1.8 | - | |

RESULTADOS

| Compuesto | Estructura | T | T. R. | Mar-10 | T. R. | Mar-11 | T. R. | Abr-10 | T. R. | Abr-11 | T. R. | May-10 | T. R. | Jun-10 | T. R. | Ago-10 | T. R. | Oct-10 |
|-----------------------|---|---|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-----------------|--------------|
| α -cariofileno |  | S | 8.2 | 0.07 | 8.3 | 0.1 | 5 | 3.26 | 8.3 | 0.17 | 8.3 | 0.04 | 8.2 | 0.11 | | - | 8.2 | 0.53 |
| α -pineno |  | M | 3.8 | 1.6 | 3.9 | 1.9 | 4 | 4.3 | 3.9 | 4 | 3.9 | 1.3 | 3.9 | 1.6 | 3.9 | 2.1 | 3.9 | 5.2 |
| α -bergamoteno |  | S | | - | | - | | - | 8.4 | 1.4 | | - | | - | | - | | - |
| α -careno |  | M | 4.6 | 10.2 | 4.7 | 7.3 | 5 | 4.7 | 4.7 | 2.17 | 4.7 | 7.2 | | - | | - | | - |
| α -felandreno |  | M | 4.5 | 0.47 | 4.6 | 0.5 | 5 | 0.5 | 4.6 | 0.23 | 4.6 | 3 | 4.6 | 7.3 | 4.6 | 3.5 | 4.6 | 15.17 |
| β -felandreno |  | M | | - | 4.3 | 16.9 | 4 | 19.5 | 4.3 | 20.2 | 4.2 | 2.3 | 4 | 1.5 | 4.3 | 11.4 | 4.9 | 3.2 |
| β -mirceno |  | M | | - | 4.4 | 3 | | - | 4.4 | 2.17 | | - | 4.4 | 2.3 | 4.4 | 2.6 | $\frac{4.4}{9}$ | 2.1 |
| β -ocimeno |  | M | 4.8 | 6.6 | | - | | - | 4.9 | 0.13 | 4.8 | 4.9 | 4.8 | 8.6 | 4.9 | 0.48 | | - |
| β -pineno |  | M | 4.3 | 2.6 | 4.3 | 2.1 | 4 | 2.6 | 4.3 | 2.4 | 4.4 | 2 | | - | 4.4 | 1.5 | $\frac{4.4}{3}$ | 1.9 |

RESULTADOS

| Compuesto | Estructura | T | T. R. | Mar-10 | T. R. | Mar-11 | T. R. | Abr-10 | T. R. | Abr-11 | T. R. | May-10 | T. R. | Jun-10 | T. R. | Ago-10 | T. R. | Oct-10 |
|---------------------------------------|---|---|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| β-terpineno |  | M | | - | 4.8 | 3.4 | | - | | - | | - | | - | | - | | - |
| β-tuyeno |  | M | 4.2 | 10.5 | 3.8 | 4.5 | 4 | 6.2 | 4.2 | 10.9 | 3.8 | 16.3 | 4.3 | 12.2 | | - | 3.8 | 1.1 |
| γ-terpineno |  | M | 5.1 | 17.8 | 5.1 | 11.2 | 5 | 8.5 | 5 | 5 | 5.1 | 17.2 | 5.1 | 15.2 | 5.1 | 13.4 | 5.1 | 0.58 |
| % de compuestos identificados | | | | 84.93 | | 89.8 | | 87.46 | | 89.05 | | 94.33 | | 79.61 | | 82.1 | | 53.3 |
| N° total de C. I. por C.G.E.M. | | | | 18 | | 79 | | 93 | | 56 | | 44 | | 70 | | 133 | | 158 |
| Naturaleza química | | | | M8 | | M12 | | M9 | | M14 | | M10 | | M9 | | M12 | | M11 |
| | | | | S2 | | S2 | | S2 | | S4 | | S2 | | S2 | | S2 | | S5 |
| | | | | D- | | D1 | | D- | | D1 |
| | | | | A2 | | A- |

III. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana del AE

E. coli fue la cepa bacteriana que presentó los halos de inhibición de mayor diámetro en todos meses muestreados, a excepción del mes de Marzo 2010 en el cual *S. pneumoniae* fue la cepa que presentó halos de mayor diámetro. En contraste con el AE del mes de Abril 2010 el cual mostró actividad antibacteriana sobre 2 de 6 cepas bacterianas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Halos de inhibición (mm) del crecimiento sobre bacterias.

| Cepa bacteriana | | Marzo 2010 | Abril 2010 | Junio 2010 | Octubre 2010 | Marzo 2011 | Abril 2011 |
|---------------------------------|--|------------|------------|------------|--------------|------------|------------|
| Bacterias Gram positivas | <i>Bacillus subtilis</i> | 7±0 | - | - | - | - | - |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 6±0 | - | - | - | - | - |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398 | 7±0 | - | - | - | - | - |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | 10±0 | NA | 6±0 | 8±0 | 7±0 | 6±0 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 7±0 | NA | 7±0 | 10.3±0.5 | 11±0 | NA |
| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 18.6±0.5 | 6.3±0.5 | 6±0 | 12±0 | 7±0 | 6±0 |
| Bacterias Gram Negativas | <i>Escherichia coli</i> ATCC 53218 | 6±0 | 12.3±2 | 23±0 | 12±0 | 14±0 | 14±1 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | NA | - | - | - | - | - |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 6±0 | - | - | - | - | - |
| | <i>Vibrio cholerae</i> Caso Clínico | 10.3±1.5 | - | - | - | - | - |
| | <i>Vibrio cholerae</i> CDC V12 | 11±0 | NA | 6±0 | 8±0 | 7±0 | 6±0 |
| | <i>Yersinia enterocolitica</i> CUSI | 8±0 | NA | NA | 8±0 | NA | 7±0 |

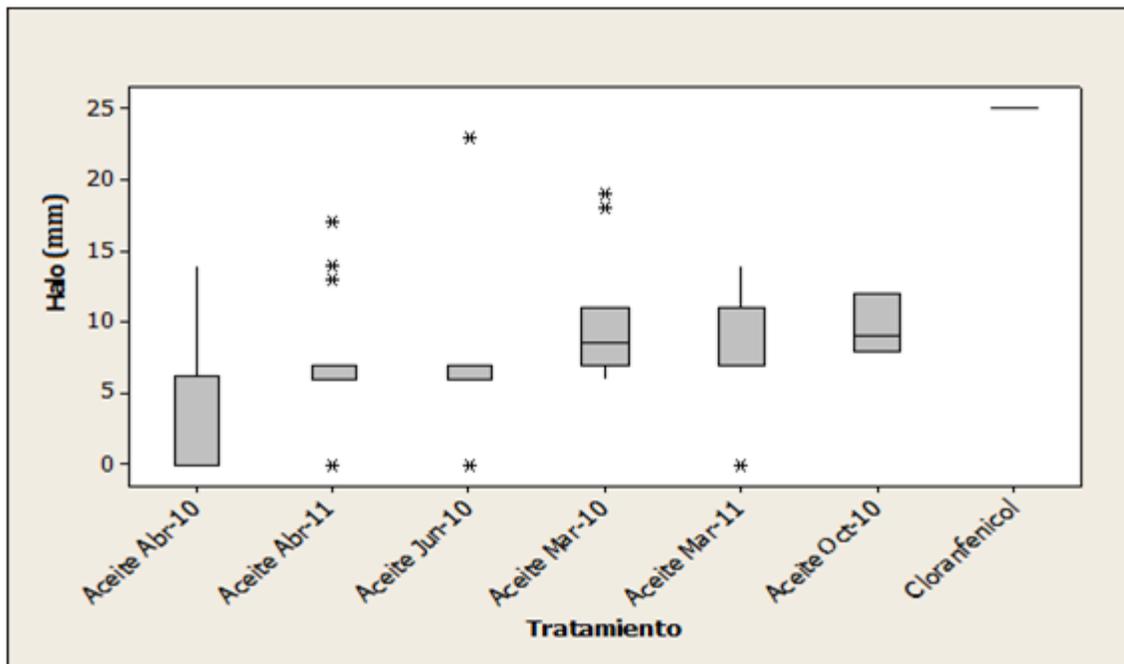
(NA) El AE No tiene actividad sobre la bacteria; todas las cepas fueron sensibles al cloranfenicol (25µg/sensidisco); (-): no se trabajó con esas bacterias.

Los aceites de Marzo 2010, Octubre 2010 y Marzo 2011 representan la mayor actividad antibacteriana mostrando una mediana de 8.5 mm, 9 mm y 7 mm respectivamente, en comparación con los demás meses, (Abril 2011: 6 mm y Junio 2011: 6 mm) mostrando así el AE del mes de Abril 2010 la menor actividad antibacteriana con una mediana de 0 mm (Fig. 11).

De acuerdo al análisis estadístico ANOVA factorial (2 factores) existieron diferencias significativas entre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales ($F=32.99$, $P=0.0$).

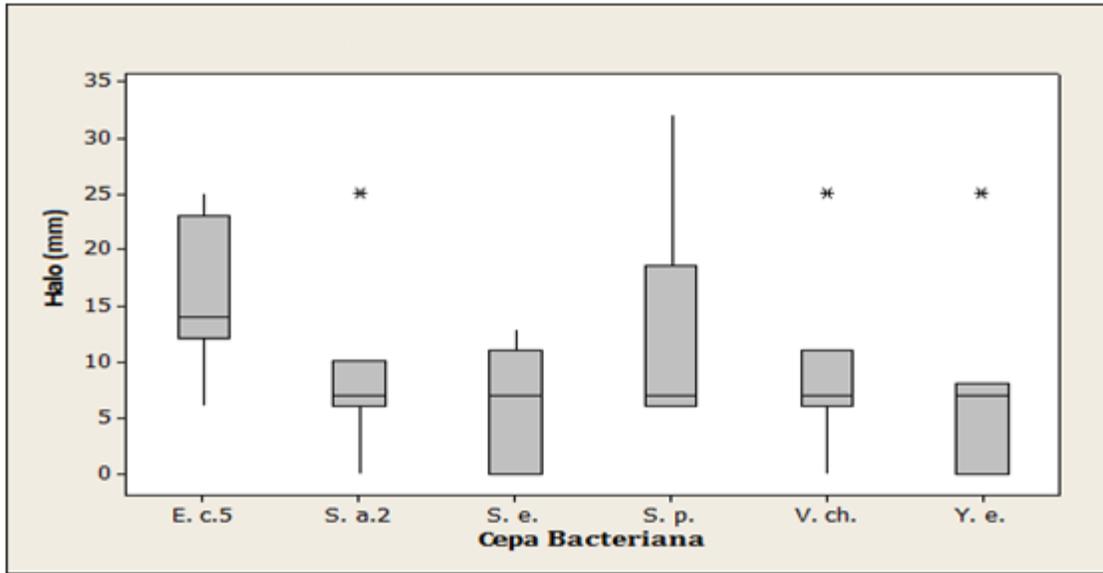
La cepa bacteriana que mostró los mayores halos de inhibición fue *E. coli*, con una mediana de 14 mm, mientras que las demás cepas bacterianas muestran un comportamiento similar con una mediana de 7mm (Fig. 12). Estadísticamente existen diferencias significativas entre cepas ($F=3350.49$, $P=0.00$). Sin embargo, entre tipo de cepa bacteriana no hay diferencias significativas ($F=1.10$, $P=0.29$), es decir el diámetro de los halos de inhibición del grupo de bacterias Gram positivas fue similar al de las Gram negativas (Fig. 13).

Figura 11. Actividad antibacteriana de los AEs de *B. arida*



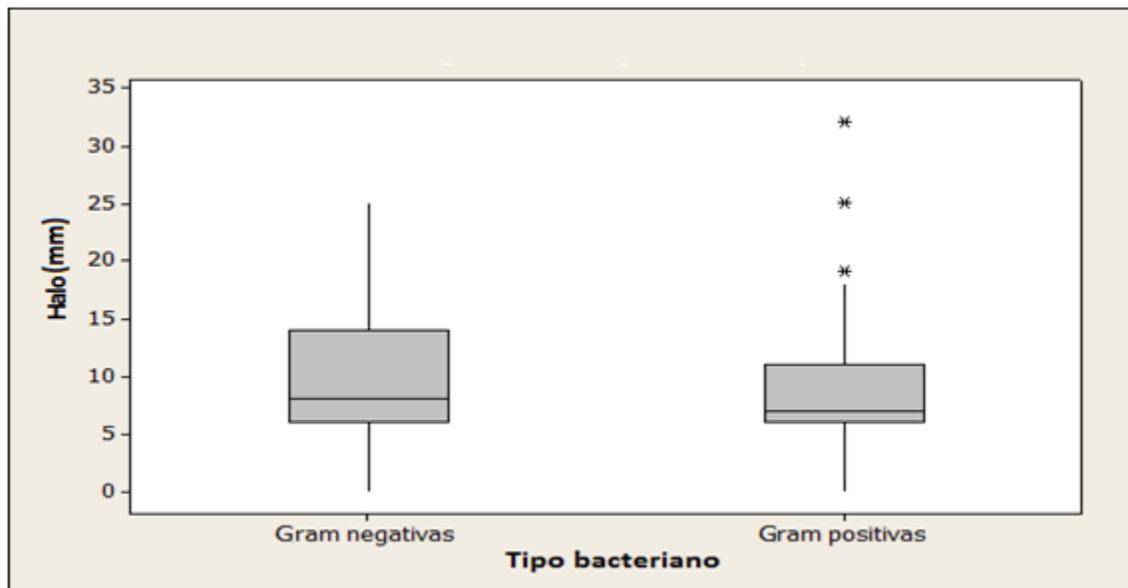
(*)Valores atípicos, correspondientes a halos de inhibición mayores o nulos de las bacterias a los AEs.

Figura 12. Actividad del AE sobre las cepas bacterianas



(*) Valores atípicos, halos de inhibición correspondientes al cloranfenicol; E.c.5: *Escherichia coli* 53218, S. A.2: *Staphylococcus aureus* 29213, S. e.: *Staphylococcus epidermidis*, S.p.: *Streptococcus pneumoniae*, V.ch.: *Vibrio cholera* TOR, Y.e.: *Yersenia enterocolitica*.

Figura 13. Actividad de los tratamientos sobre el tipo de cepa bacteriana Gram (+) y Gram (-)



(*)Valores atípicos, correspondientes a los halos de inhibición del cloranfenicol sobre *S. Pneumoniae* (32 mm), *S aureus* 2 (25 mm) y AE de Marzo 2010 sobre *S. pneumoniae* (18.6 mm).

IV. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana del AE

En la determinación de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y CBM (Concentración Bactericida Mínima) *S. pneumoniae* fue la cepa más sensible CMI=<0.5 mg/mL (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

| Cepa bacteriana | Marzo 2010 | | Octubre 2010 | |
|---|------------|-----|--------------|-----|
| | CMI | CBM | CMI | CBM |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | >4 | >4 | >4 | >4 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <0.5 | 0.5 | <0.5 | 0.5 |
| <i>Vibrio cholerae</i> CDC V12 | 4 | >4 | 4 | >4 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> CUSI | 4 | >4 | 4 | >4 |

CMI y CBM expresadas en mg/mL.

V. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica del AE

Hongos levaduriformes

Candida albicans muestra sensibilidad frente a los aceites esenciales de Marzo 2010 (7.6 ± 0.5) y Octubre 2010 (7 ± 0) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad cualitativa del AE de *B. arida* sobre Hongos levaduriformes

| Cepa fúngica | Marzo 2010 | Abril 2010 | Junio 2010 | Octubre 2010 | Marzo 2011 | Abril 2011 |
|--------------------------------------|--------------------------------|------------|------------|----------------------------|------------|------------|
| <i>Candida albicans</i> 10231 | 6.6 ± 0.5 | - | - | - | - | - |
| <i>Candida albicans</i> CUSI | 7.6 ± 0.5 | NA | NA | 7 ± 0 | NA | NA |
| <i>Candida glabrata</i> | 6.3 ± 0.5 | - | - | - | - | - |
| <i>Candida albicans</i> (urocultivo) | 6.6 ± 0.5 | - | - | - | - | - |
| <i>Candida tropicalis</i> | 6.3 ± 0.5 | - | - | - | - | - |

(NA) no hay actividad; (-): no se trabajó con la cepa.

Hongos filamentosos

El aceite esencial de *B. arida* presentó actividad antifúngica sobre 4 cepas, a excepción de *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia lilacina* (Cuadro 7). Cabe señalar que de hongos filamentosos sólo se evaluaron cualitativa y cuantitativamente para el AE del mes de Marzo 2010.

Cuadro 7. Actividad cualitativa del AE de *B.arida* sobre Hongos Filamentosos

| Cepa fúngica | Marzo 2010 |
|------------------------------------|------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | ✓ |
| <i>Aspergillus sp.</i> | ✓ |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | ✓ |
| <i>Fusarium sporotrichoides</i> | ✓ |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | NA |
| <i>Rhizoctonia lilacina</i> | NA |

(✓) Si hay actividad; (NA) no hay actividad

VI. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica del AE

Todos los hongos filamentosos mostraron CFM mayores a 4.0 mg/mL, en tanto que *Aspergillus niger* y *Aspergillus sp.* en la concentración 4.0 mg/mL no hubo presencia de esporas .

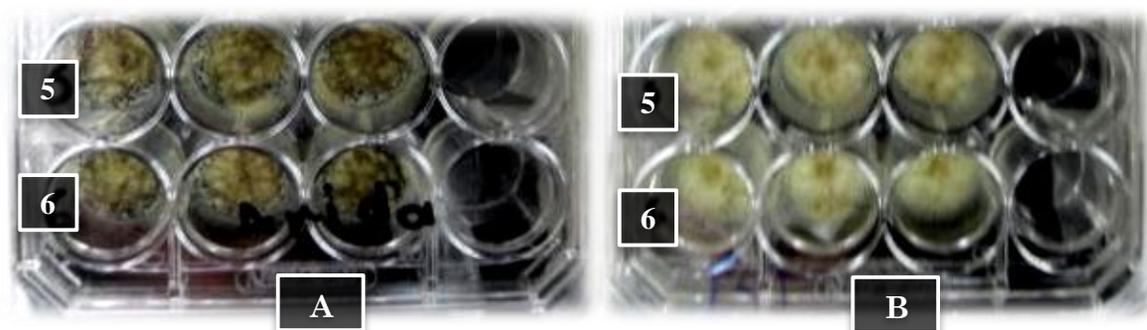


Figura 14 . Concentración Fungicida Mínima (CFM); (A) testigo, (B) concentración 4 mg/mL del AE de *B. arida*; 5: *Aspergillus niger*, 6: *Aspergillus sp.*

DISCUSIÓN

Bursera es un miembro prominente y característico tanto de la flora como de la vegetación de México. En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, representan una cuarta parte de la riqueza del género en el país, sin embargo su conocimiento aun deja mucho que desear (Medina, 2008).

Estudios llevados a cabo sobre *Bursera arida* reportan su uso tradicional en el tratamiento de algunos padecimientos de las comunidades, por lo que cabe destacar que el presente estudio es el primero, en analizar su composición química y evaluar su actividad antimicrobiana.

Bursera arida presenta una serie de características y estrategias que le permiten sobrevivir y reproducirse en ambientes que presentan poca agua (Arias et al., 2000), como lo son modificaciones en sus tejidos, cortezas exfoliantes, debajo de esas cortezas siempre hay tallos verdes que fotosintetizan (Valiente et al., 2000), resinas, aceites esenciales (AEs), presencia de metabolitos secundarios como mecanismos de adaptación al medio ambiente, principalmente como medio de defensa contra microorganismos, insectos y depredadores herbívoros. El término de metabolitos secundarios se ha utilizado para describir un diverso grupo de moléculas involucradas en la adaptación de las plantas al ambiente y que no son parte de las vías metabólicas primarias del crecimiento y la reproducción celular (Granados et al., 2008).

Esta serie de características está dada por la gran variedad de ambientes dentro del área de estudio valle de Tehuacán–Cuicatlán, resultado de diversos factores climáticos, la presencia de abanicos aluviales, laderas con diferente orientación e inclinación, así como una diversa litología superficial muy variada, presentando un mosaico de comunidades vegetales (Valiente et al., 2000).

Los AEs evaluados, fueron obtenidos de las ramas, debido a que en hojas y fruto la presencia de AEs fue nula o insignificante. En contraste con lo que se ha observado en el laboratorio con las otras especies de *Bursera* como en el caso de *B. morelensis* (López, 2011), *B. fagarodides* (Nicolás, en proceso de titulación), *B. schelechtendalii* (Espinosa, 2012) donde si hay AEs en hojas y fruto en cantidades mayores.

Probablemente estos AEs los sintetiza la planta para aumentar la concentración de solutos y evitar con esto la pérdida de agua (Heuer, 1999) ya que durante el periodo de secas se registra mayor rendimiento (*Cuadro 2*). Otra probable causa es la de protegerse contra herbívoros. Los metabolitos secundarios tienen una función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos, 2009)

El rendimiento del AE varía, con la época, en general la formación de esencias parece elevarse con temperaturas altas, aunque en días muy cálidos puede producirse una excesiva pérdida (Osorio, 2009) también influye la hora de recolección de la planta, el mismo día se tiene clima cálido en la mañana y en la tarde el clima es frío, o viceversa, debido a que la planta genera más AE en clima cálido, mientras que en clima frío aumenta la cantidad de agua en las hojas, disminuyendo la producción del AE (Del Pozo, 2006).

Durante la temporada de lluvias el rendimiento fue menor (Junio (0.31 %) Agosto (0.23 %) Septiembre (no hubo presencia de aceite) y Octubre (0.96 %)). Debido a que fuertes lluvias durante varios días consecutivos, tiene como consecuencia un aumento en el porcentaje de humedad, reduciendo el rendimiento en AE (Soto et al., 2002; Guenther, 1997; Gupta y Jain, 1978). Esta discrepancia, de igual manera puede deberse a las diferencias en las cantidades de componentes mayoritarios.

Con respecto a la composición química (*Cuadro 3*), ésta varía temporalmente. Cabe destacar que los componentes mayoritarios de los aceites pueden constituir hasta un 85% del total, mientras que el resto se presentan como trazas (Huertas, 2008). Ya que depende de la variedad (propiedades determinadas genéticamente), zona geográfica, clima, parte

utilizada, método de extracción del AE (Castillejos, 2005), la época en que se recolecta cada planta puesto que la cantidad y a veces, la naturaleza de los principios activos, no son constantes a la largo del año. La edad de la planta, influye no sólo en la cantidad total de principios activos producidos, sino también en las proporciones relativas de los componentes de la mezcla activa. Estas variaciones pueden existir en cualquier planta. Igualmente existe evidencia que la composición de un número de metabolitos secundarios varía apreciablemente a través del día y la noche (Osorio, 2009), puesto que las plantas generan una amplia variedad de moléculas para un rango de procesos bioquímicos y algunos de estos compuestos, por ser volátiles, son emitidos a la atmósfera (Graedel, 1979).

Durante la temporada de lluvias (Agosto y Octubre 2010), se denota un ligero aumento de monoterpenos y sesquiterpenos esto probablemente se deba a que hay mayor competencia y ataque de microorganismos, 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 , 1991), y para adquirir defensas frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales (Domingo y López, 2003).

En la literatura se dice que algunas plantas emiten terpenos volátiles después que los insectos se han alimentado de ellas. Estos atraen a los enemigos naturales del insecto predador y actúan como un mecanismo de defensa contra el mismo; algunos sesquiterpenos actúan en los mecanismos de defensa de la planta como repelentes de herbívoros, los diterpenos se han encontrado en la resina, cuando los canales que transportan la resina son dañados, la descarga de la resina sirve como una barrera química y física a la alimentación de los insectos. Por otro lado, los diterpenos se polimerizan cuando la resina es expuesta al aire y contribuye a sellar las heridas (Levitus et al., 2010). En cuanto al nonano (alcano) que se encuentra como componente mayoritario en la mayoría de los meses, se debe a que los alcanos son compuestos que están presentes en la cutícula cerosa de las plantas, junto con alcoholes, cetonas y ésteres, triterpenoides, esteroides y flavonoides en menor cantidad, y las características fisicoquímicas de la cera cuticular determinan funciones vitales para las plantas como la reducción de la pérdida de agua no estomática, reducción del depósito de polvo, polen y contaminantes ambientales, protección contra la radiación ultravioleta,

bacterias y hongos, y participación en una variedad de interacciones con los insectos (Cesa y Bakker, 2007).

Sobre la actividad antimicrobiana del AE de *B. arida* (Cuadro 4), los resultados permiten confirmar el uso popular en el tratamiento de afecciones intestinales (*E. coli*, *V. cholera* y en algunos casos *Y. enterocolitica*) respiratorias (*S. aureus*, *S. pneumoniae*), de piel (*S. aureus*, *S. epidermidis*) fuegos, algodoncillo (*C. albicans*), estas cepas bacterianas y fúngicas presentaron halos de inhibición muy marcados.

Al comparar la actividad antibacteriana de los AEs de los meses muestreados, Marzo 2010, Octubre 2010 y Marzo 2011 que representan la mayor actividad antibacteriana (Fig. 11), muestran tener en común camfeno, cariofileno, copaeno, α cariofileno, α -felandreno, β -pineno, β -tuyeno y γ -terpineno (Apendice 4).

Se reporta que la actividad antimicrobiana de los AEs se adjudica a sus compuestos químicos, que en su mayoría son terpenos, los cuales tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Cichewicz y Thorpe, 1996; Burt, 2004; Kordali et al., 2005; Abad et al., 2007) como α -pineno, camfeno, linalol α y β -felandreno los cuales se sabe tienen actividad antimicrobiana (Pelczar et al., 1998; Griffin et al., 1999; Mesa et al., 2004). Compuestos que muestra el AE de *B. arida* en proporciones minoritarias a excepción de α -felandreno que se encuentra como constituyente principal de Octubre 2010 (Cuadro 3).

French (1995) señala que es extremadamente difícil correlacionar la actividad antimicrobiana a un único compuesto o clase de compuestos, ya que los diversos componentes de cualquier aceite pueden actuar sinérgicamente. Por ello, es necesario un enfoque integral para explicar las capacidades antimicrobianas de un AE, cuyo desempeño podría ser el resultado de cierto balance cuantitativo de varios componentes, donde los efectos sinérgicos prevalecen (Caccioni et al., 1998).

El mecanismo de acción de los AEs, como agentes antimicrobianos no ha sido estudiado con gran detalle, considerando el gran número de compuestos químicos distintos presentes en los AEs es más probable que sus actividades antimicrobianas no sean atribuibles a un mecanismo en específico (Burt, 2004).

Por medio del presente trabajo no se puede saber con precisión cuál es el mecanismo de acción del AE, sólo se dan a conocer los probables escenarios del modo de acción de los AEs, para comparar esto, es importante mencionar algunos de los mecanismos por los cuales actúan los antimicrobianos. Actúan por una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada. Las diversas regiones de ataque en general son la inhibición de la síntesis de la pared celular; alteración de la permeabilidad de la membrana celular o en el transporte activo a través de dicha membrana; inhibición de la síntesis proteica (inhibición de la traducción y transcripción del material genético) e inhibición de la síntesis del ácido nucleico (Rytel y Mogabab, 1993). Cada uno de estos puntos son esenciales para el desarrollo celular, por lo tanto si uno es atacado o inactivado la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada (Davidson y Branen, 1993).

El control positivo utilizado fue cloranfenicol el cual interfiere con la síntesis de proteínas, a diversos niveles del organelo encargado de su elaboración, el ribosoma, actúa a nivel de la porción 50 S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos (Errecalde, 2004).

Los AEs no parecen tener objetivos celulares específicos (Carson et al., 2002), dado que son altamente lipofílicos, capaces de disolverse en las membranas biológicas, desarreglando estructuras y volviéndolas más permeables. Esto puede dar lugar a la salida de iones y otros contenidos celulares (Knobloch et al., 1986). Se ha sugerido que los componentes de los AEs cruzan la membrana celular, interactuando con las enzimas y proteínas de la membrana y produciendo un flujo de protones hacia el exterior de la célula, lo que induce a cambios en esta, dando como resultado su muerte (Omidbeygi et al., 2007). Quizá actúen en la degradación de la pared celular (Helander et al., 1998), causando daño de la membrana citoplasmática (Sikkema et al., 1995; Ultee et al., 1999) coagulen el citoplasma (Gustafson et al., 1998 Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001) inhibiendo de la fuerza motriz de protones (Ultee et al., 1999), ya que por su naturaleza lipofílica pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, interrumpiendo la estructura de sus diferentes capas de liposacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, permeabilizándola (Bakkali, et al., 2008), probablemente los hidrocarburos lipofílicos pueden acumularse en la

doble capa lipídica e interferir en la interacción lípido-proteína, o una interacción directa entre los compuestos lipofílicos con la parte hidrofóbica de la proteína (Juven et al., 1994)

Uribe et al., (1985) relaciona bajas concentraciones de AEs con cambios en la estructura celular del microorganismo, mientras que altas concentraciones provocarían daños severos a la membrana y la pérdida de homeostasis, dando lugar a la muerte celular.

Escherichia coli ATCC 53218 presentó mayores halos de inhibición frente a los aceites (Fig. 12), y al determinar CMI y CBM, *Streptococcus pneumoniae* (CMI= <0.5 mg/mL) fue la cepa más sensible al AE de Marzo y Octubre 2010 (Cuadro 5). Estudios reportan que los AEs y sus compuestos son activos frente a una amplia variedad de bacterias (Sivropoulou et al., 1996). Pero algunos, han observado que los AEs tienen una mayor actividad frente a las bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas (Smith et al., 1998; Lambert et al., 2001). La actividad inhibitoria frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas entre otras cosas, puede deberse a la influencia de la estructura de la pared celular y la composición de la membrana externa.

Las bacterias poseen una membrana citoplasmática compuesta de lípidos y una pared celular compuesta de mureína. En las bacterias Gram (+) es una estructura de multicapas (red de mureína muy desarrollada y llega a tener hasta 40 capas). En el caso de bacterias Gram (-) es más delgada pero presentan una segunda membrana lipídica que rodea la pared (Maguna et al., 2006). Por lo que su interacción con los AEs de naturaleza lipofílica, probablemente cause daño en la membrana celular por la desestabilización de la capa lipídica debido a la interacción de los terpenos presentes en el AE con las moléculas de la membrana (Castaño et al., 2009). Aunque estadísticamente al realizar el análisis de ANOVA factorial se observó que no existe diferencias significativas entre tipo de cepas Gram positivas y Gram negativas (Fig. 13), por lo que se puede apreciar no existe una actividad selectiva del AE por algún tipo de bacteria sino que su acción frente a los organismos evaluados es de amplio espectro.

Con respecto a las pruebas cualitativas en hongos, por su susceptibilidad destaca *Candida albicans* (7.6 ± 0.5 mm y 7 ± 0 mm) en Marzo 2010 y Octubre 2010 respectivamente (Cuadro 6). Estudios relativos al mecanismo de acción antifúngica, al igual que en el caso

de las bacterias, altera o daña el funcionamiento de la membrana fúngica (Villa y Cañigüeral, 2006), debido a los constituyentes con alta hidrofobicidad presentes en la célula, lo que ocasiona trastornos en la permeabilidad y en el transporte de iones y de otros compuestos, así como en la separación de componentes lipídicos de la membrana celular y la mitocondria (Quintana et al., 2010)

Kurita y Koike (1983) informaron que la actividad antifúngica de los aceites estaría relacionada a la naturaleza química de los diferentes componentes de los AEs y que seguirían la siguiente regla en orden decreciente de importancia: fenoles > alcoholes > aldehídos > cetonas > éter > hidrocarburos. Esta hipótesis estaría en concordancia con los resultados expuestos en este trabajo, ya que la escasa actividad antifúngica en hongos levaduriformes de los AEs de *B. arida* podría atribuirse a la gran cantidad de hidrocarburos presentes en la composición química de estos AEs.

Además la actividad antifúngica de acuerdo a la bibliografía corresponde a AEs con elevado contenido de, aldehído cinámico, carvacrol, timol, citronelol, geraniol y linalol (Barrera et al., 2008), sabineno (Dambolena et al., 2011) citral, D-limoneno, β -mirceno, (Guerra et al., 2004) α -pineno y presencia de δ -3-careno (Pepeljnjak et al., 2005; Cavaleiro et al., 2006; Mazari et al., 2010). Dambolena et al., (2011) concluyen que la actividad antifúngica es dosis dependiente y varía de acuerdo al tipo de microorganismo.

La especie estudiada *B. arida* solo presenta linalol (Octubre 2010), β -mirceno (Marzo 2011, Abril 2011, Junio 2010, Agosto 2010, Octubre 2010), sabineno (Octubre 2010) y α -pineno (presente en todos los meses) (Apéndice 6), aunque en concentraciones bajas, con lo que posiblemente sean buenos candidatos contra los hongos levaduriformes y filamentosos, evaluados en este trabajo.

El AE tuvo actividad antifúngica cualitativamente sobre hongos filamentosos (Cuadro 7), sin embargo al determinar la CFM se observó que el AE a las concentraciones probadas no inhibió el crecimiento radial de ningún hongo filamentosos, pero se observó la falta de esporulación de *Aspergillus niger* y *Aspergillus* sp. (4mg/mL) (Cuadro 8). En la literatura se dice que los vapores del aceite han demostrado inhibir el crecimiento fúngico y afectar la esporulación (Carson et al., 2006).

Particularmente, se sabe que el ciclo de vida de las especies de *Aspergillus* comienza con la germinación del conidio (espora asexual) y se forma un tubo germinativo. Este crece en una hifa vegetativa, la cual se elonga y ramifica en dos dimensiones en el medio. Posteriormente se desarrolla una hifa reproductiva (micelio aéreo) y un órgano de formación de conidios hacia el exterior, los cuales se separan y comienzan a germinar. Inouye (2003) reportó que los vapores de los AEs atacan en las tres etapas de este ciclo: en la etapa de germinación, en la de crecimiento y en la esporulación; puesto que los vapores de los AEs pueden unirse directamente a la hifa reproductiva (Inouye, 2003) este efecto parece estar relacionado con su actividad inhibitoria de la respiración (Inouye, 1998).

En las demás cepas de hongos filamentosos en las cuales no hubo actividad antifúngica posiblemente tengan mecanismos enzimáticos que impidan la acción de los metabolitos secundarios y en consecuencia son resistentes a una gran variedad de ellos (Trione, 1981).

Por último, hace falta realizar muchos estudios, sobre *B. arida*, este estudio fue una base para los posteriores, ya que contamos con datos que nos pudiesen guiar en qué momento hay más material para trabajar, en que temporada coleccionar, que temporada presenta compuestos químicos útiles para cada afección causada por los diversos microorganismos infecciosos, en resumen validando el uso de la planta, y llevando este conocimiento a la comunidad para quizá darle uso sustentable al Género *Bursera*, ya que no solo esta especie *B. arida*, ha demostrado resultados positivos.

CONCLUSIONES

- Las ramas contienen mayor cantidad de aceite esencial, en comparación con hojas y frutos.
- Los AEs de Marzo 2010 a Agosto 2011 presentaron nonano como constituyente principal y Octubre α -felandreno. Camfeno, cariofileno, α -pineno, α -felandreno, γ -terpineno, son compuestos que están presentes en todos los meses evaluados.
- El aceite esencial de *B. arida* muestra actividad antimicrobiana.
- Marzo 2010, Octubre 2010 y Marzo 2011, representan la mayor actividad antibacteriana y muestran tener en común camfeno, cariofileno, copaeno, α cariofileno, α -felandreno, β -pineno, β -tuyeno y γ - terpineno.

PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de toxicidad.
- Establecer el margen terapéutico, es decir, determinar la diferencia entre la dosis terapéutica (dosis a la que se desarrolla una acción eficaz) y la dosis tóxica (dosis a la que aparecen manifestaciones nocivas).
- Sería atractivo llevar a cabo estudios para evaluar cada uno de los mecanismos de acción que se plantean de los AEs.
- Debido a que se muestra como constituyente mayoritario el nonano (alcano), en el AE de *B. arida* se podrían realizar estudios para proponerlo como posible candidato a biocombustible.

APÉNDICE

APÉNDICE 1. Familia Burseraceae

Existe un total de 18 géneros de la familia Burseraceae, de los cuales tres están presentes en México: *Beiselia* (1 especie), *Bursera* (85 especies) y *Protium* (2 especies) (Standley, 1923; Gillett, 1980; Rzedowski et al., 2005). *Bursera* cuenta con poco más de 100 especies a nivel mundial; sin embargo la mayoría de ellas son exclusivas del país, distribuyéndose principalmente a lo largo de la costa del Pacífico (Rzedowski y Kruse, 1979).

Los representantes de *Bursera* son mayormente árboles o algunas veces arbustos, de hoja decidua, que constituyen un elemento característico y no pocas veces dominante o codominante de los bosques tropicales caducifolios de México, donde habitan preferentemente en altitudes entre 0 y 1800 m.

A pesar de los esfuerzos de varias generaciones de botánicos, el avance en el conocimiento taxonómico de los componentes de *Bursera* ha sido lento y dista aún mucho de ser satisfactorio.

Son árboles o arbustos, deciduos o perennifolios, dioicos o poligamodioicos, corteza con conductos resiníferos y laticíferos. Hojas alternas, rara vez opuestas, pinnado-compuestas, ocasionalmente bipinnadas, 3-folioladas o 1-folioladas, exestipuladas. Inflorescencias axilares o terminales, cimosas, paniculadas, pseudoracimos, fasciculadas o flores solitarias. Flores generalmente unisexuales, actinomorfas, 3-5(-6)-meras, imbricadas o valvadas; sépalos connatos o libres; pétalos, libres o fusionados en un tubo, rara vez ausentes; estambres 1-2 series, en igual número que los pétalos o el doble (estaminodios en flores femeninas), filamentos libres, insertos debajo o encima del disco, anteras ditecas, dehiscencia longitudinal, disco anular, cupuliforme o inconspicuo; ovario súpero, 2-5-

carpelar (-12 en *Beiselia*), 2-5-locular, placentación axilar, óvulos (1-)2 por lóculo, estilo corto o ausente, estigma 2-5-lobulado (pistilo vestigial en flores masculinas). Frutos drupáceos 2-5-valvados, con pericarpo carnoso, luego dehiscentes, o cápsulas; huesos 1-5, generalmente monospermos, con endocarpo leñoso, cubiertos frecuentemente por un pseudoarilo; semillas sin endospermo, embrión recto, ocasionalmente aladas (Medina, 2008).

| TAXONOMIA | |
|-----------------|----------------------|
| REINO | <i>Plantae</i> |
| SUBREINO | <i>Tracheobionta</i> |
| DIVISIÓN | <i>Magnoliophyta</i> |
| CLASE | <i>Magnoliopsida</i> |
| SUBCLASE | <i>Rosidae</i> |
| ORDEN | <i>Sapindales</i> |
| FAMILIA | <i>Burseraceae</i> |
| GÉNERO | <i>Bursera</i> |

(Tomado del Sistema Integrado De Información Taxonómica

<http://siit.conabio.gob.mx/>)

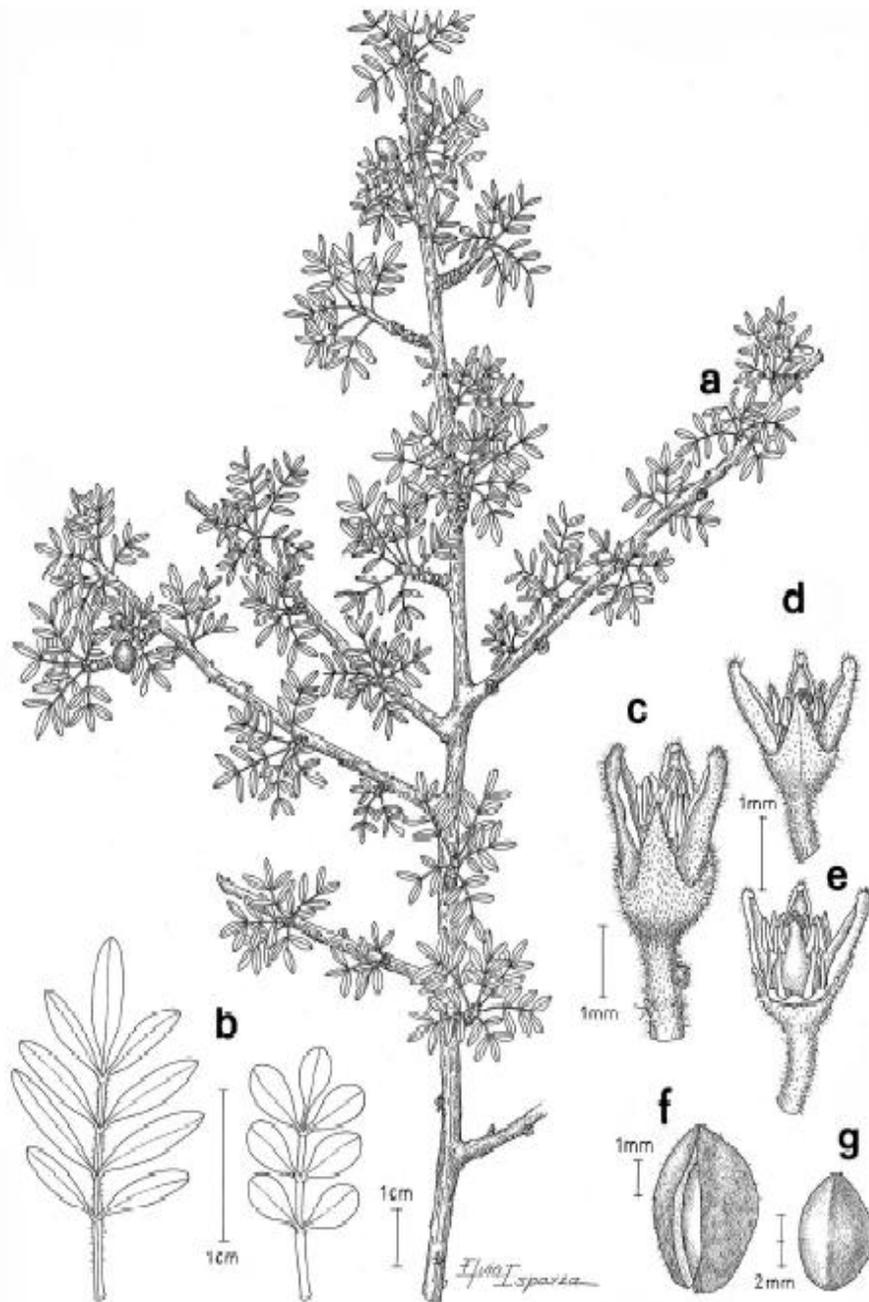
APÉNDICE 2. *Bursera arida* (Rose) Standl. 1929.

Figura 15. Anatomía vegetal de *B. arida*.

(a) ramas con hojas y frutos, (b) variantes de hoja, (c) flor masculina, (d) flor femenina en vista externa (e) flor femenina desprovista de un segmento para mostrar el disco nectarífero, los estaminodios y el gineceo, (f) fruto y (g) hueso (Rzedowski, 2004).

Familia:

Burseraceae

Nombre científico:*Bursera arida* (Rose) Standley 1929.

Figura 16. Ejemplar de *B. arida*.

1: tallos con resina, 2: fruto, 3: planta completa, 4: tallo mostrando corteza exfoliante, 5: rama con hojas y fruto. 6: hojas 7: corteza. Fotografías tomadas por el autor.

Características

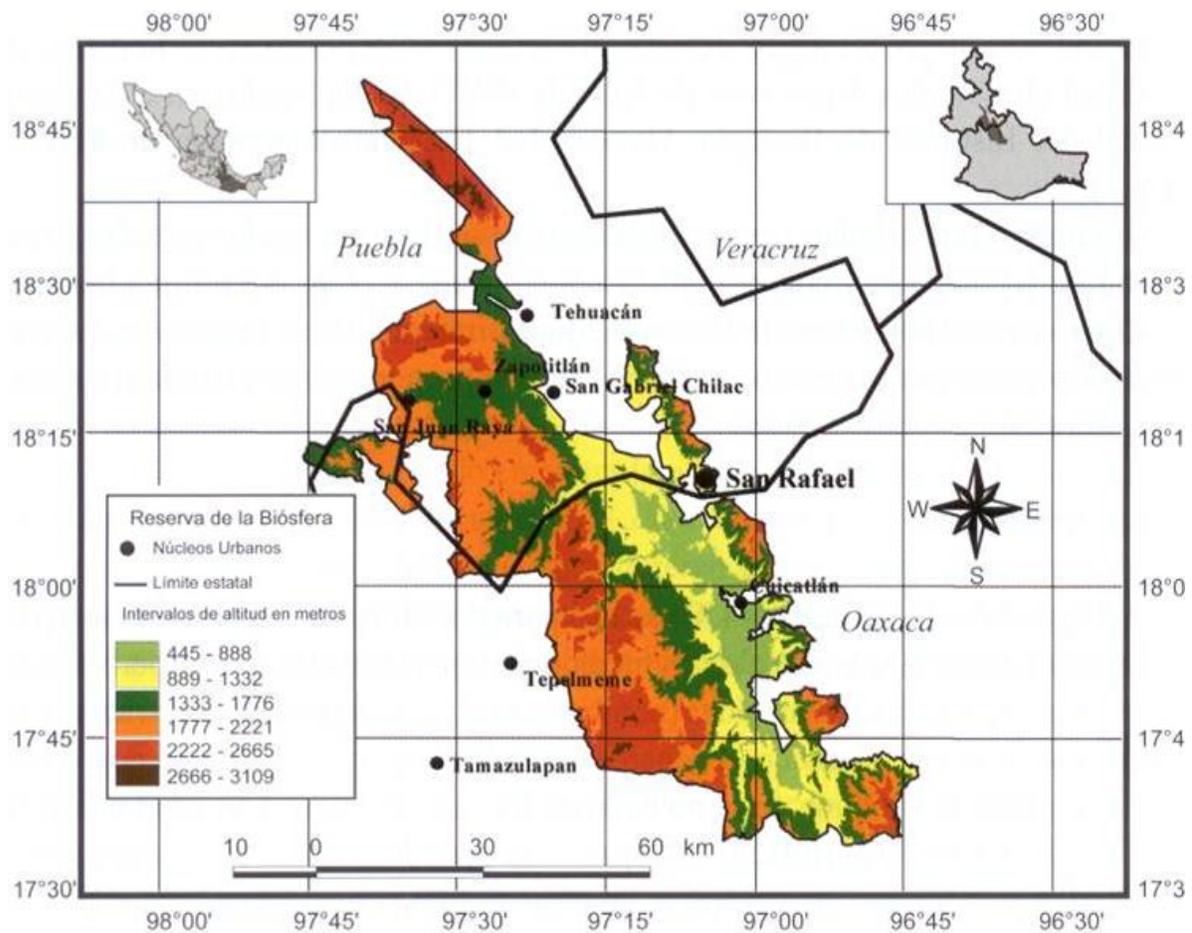
Arbusto o a veces árbol bajo dioico, de 0.8-4 m de alto. Troncos hasta 20.0 cm diámetro, corteza externa exfoliante rojizo-anaranjada o pardo-amarillenta, descarpela en tiras grandes, la interna verdosa, con resina aromática, ramas jóvenes rojizas, densamente hirsútulas, ramas maduras gris oscuro, glabras; catafilos inconspicuos, pronto deciduos. Hojas imparipinnadas, pecíolos 3-6 mm largo, densa a escasamente hirsútulos, ligeramente alados; láminas (0.8-) 1.3-2.5 cm largo, aprox. 1.0 cm ancho, ovadas en contorno general, raquis estrechamente alado, margen hirsútulo, peciólulos laterales ca. 1.0 mm largo, generalmente presentes en los folíolos proximales, el terminal hasta 3.0 mm largo; folíolos (3-) 5-9(-11), 4.0-6.0 (-9.0) mm largo, 1.3-2.0 mm ancho, oblongos a obovados, base cuneada, ápice agudo a obtuso, margen entero, cartáceos, haz y envés glabros, sólo la nervadura central evidente. Inflorescencias reducidas a flores solitarias, subsésiles. Flores rojizas, las masculinas 3(-4)-meras, 2.0-2.5 mm largo, cáliz con lóbulos ca. 1.5 mm largo, triangulares, pilósulos por fuera, corola con pétalos aprox. 2.0 mm largo, aprox. 0.5 mm ancho, cuculados, pilósulos por fuera, estambres 6(-8), filamentos ca. 0.4 mm largo, anteras 0.7- 0.8 mm largo, oblongas, gineceo vestigial; las femeninas 3-meras, semejantes a las masculinas, pero cáliz con lóbulos 1.5-2.0 mm largo, sobre pedicelos 0.5-1.0 mm largo, pilosos, estaminodios con anteras ca. 0.3 mm largo, ovario 3-locular, glabro, estilo menor 1.0 mm largo, estigmas 3. Frutos 1-2, con pedúnculos 1.0-2.0 mm largo, engrosados y pilosos, 3-valvados, 4.0-5.0 mm largo, hasta 3.0 mm ancho, trígonos u ovoidales, apiculados, en la madurez oscuros, pilósulos o glabros; huesos 3.0-5.0 mm largo, 2.5-3.0 mm diámetro ovoidales o trígonos, totalmente cubiertos por un pseudoarilo amarillo pálido (Medina, 2008).

Aspectos ecológicos: esta especie florece y fructifica durante el periodo de sequía, ya que durante el período de lluvias se dedican a crecer y formar hojas. Durante el período de secas pierde las hojas, por lo que realiza la fotosíntesis por el tallo, gracias a que se desprenden restos de su corteza. Esta especie es un árbol relativamente grande.

APÉNDICE 3. Zona de Colecta

La especie *Bursera arida* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Fig. 14).

Figura 17. Poblado de San Rafael



CLIMA

El clima es de tipo Bs (h') w'' (w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada

a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

HIDROGRAFÍA

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

EDAFOLOGÍA

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

VEGETACIÓN

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000).

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fruticosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como *Fouqueria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fruticosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fruticosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

LA POBLACIÓN.

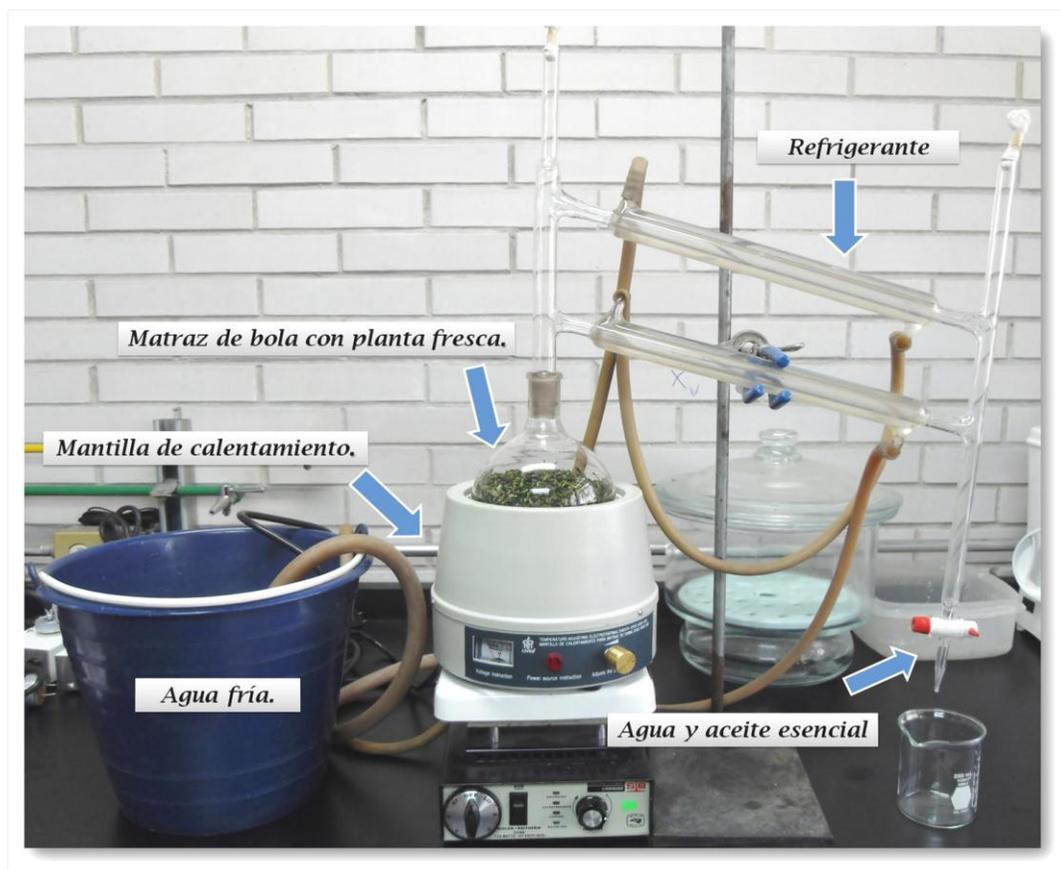
La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

APÉNDICE 4. Método de arrastre de vapor (Domínguez 1973)

El aceite se obtuvo a partir del material fresco; este método utiliza una de las características de los aceites esenciales que es de presentar bajas presiones de vapor y por tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. Se puede destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500g de la planta fresca.

Se depositó la planta fresca en el matraz de bola y se agregó agua destilada. El matraz se colocó en una mantilla de calentamiento eléctrica. Se montó el sistema de refrigeración. Se esperó a que hirviera ligeramente y se recolectó el aceite esencial (Fig. 15).

Figura 18. Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor



APÉNDICE 5. Cromatografía de Gases acoplada a E-M.

Se analizaron los AEs de cada mes muestreado por medio de una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Las condiciones de separación fueron a una temperatura inicial de 70⁰C durante dos minutos aumentando con dos rampas de calentamiento, la primera a 20⁰C por minuto hasta los 230⁰C; y la segunda, aumentando a 8⁰C por minuto hasta los 280⁰C y se mantiene durante cinco minutos, el gas de acarreo fue He. El flujo inicial en la columna fue de 1mL/min, con una presión de 61.85 Kpa (8.77psi) y una velocidad lineal de 30 cm/s. El tiempo total del análisis fue de 21.25 minutos. El rango de masas detectado fue de 35m/z a 750m/z, la muestra se ionizó por impacto electrónico a 70 eV, la temperatura alcanzada de la fuente de ionización fue de 230⁰C, y el cuadrupolo de 150⁰C. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST Versión 8.0.



Espectrómetro de masas

Cromatógrafo de gases

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

APÉNDICE 6. Constituyentes químicos del aceite esencial

Abundancia en porcentaje de compuestos químicos del aceite esencial, encontrados por mes de Marzo 2010 a Abril 2011,; T.R.: tiempo de retención expresado en minutos; T: tipo naturaleza química; A: alcano, M: monoterpeno, S: sesquiterpeno, D: diterpeno; (-) compuesto no presente; C. I.: Número Total de Compuestos Identificados por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas;

| Compuesto | T | T.R. | Mar-10 | T.R. | Mar-11 | T.R. | Abr-10 | T.R. | Abr-11 | T.R. | May-10 | T.R. | Jun-10 | T.R. | Ago-10 | T.R. | Oct-10 |
|-----------------------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| (-)- α -tuyeno | M | | - | 3.8 | 3.7 | | - | | - | | - | | - | 3.8 | 7.3 | | - |
| 4-careno | M | | - | | - | | - | 4.7 | 2.17 | 4.6 | 3.8 | 4.7 | 6 | 4.7 | 7.5 | | - |
| cadaleno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 9.6 | 0.21 |
| calareno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 8.4 | 0.31 |
| camfeno | M | 4 | 0.2 | 4.1 | 0.1 | 7.4 | 0.02 | 4 | 0.2 | 4 | 0.2 | 3.7 | 0.15 | 4.1 | 0.33 | 4.1 | 0.36 |
| cariofileno | S | 8 | 1.1 | 8 | 2.1 | 8 | 1.9 | 8 | 2.5 | 8 | 0.59 | 8 | 0.92 | 8 | 2 | 8 | 2.2 |
| cedreno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 8.7 | 0.11 |
| cembreno | D | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 11.1 | 0.67 | 6 | 0.22 |
| copaeno | S | 7.7 | 0.04 | 7.7 | 0.05 | 7.7 | 0.06 | | - | | - | | - | 7.7 | 0.05 | 7.7 | 0.22 |
| D-germacreno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 8.4 | 2.8 |
| D-sylvestreno | M | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 4.9 | 11.9 |
| decano | A | 4.4 | 0.09 | 4.5 | 0.19 | | - | 4.4 | 0.13 | | - | | - | 4.5 | 0.13 | | - |
| dureno | H A | | - | | - | 4.8 | 4.1 | | - | | - | | - | | - | | - |
| guaiol | S | 9.1 | 0.06 | 9.2 | 0.1 | 9.2 | 0.15 | 9.2 | 0.13 | | - | | - | | - | | - |
| kaureno | D | | - | | - | | - | | - | | - | 11.9 | 0.18 | | - | 11.9 | 1.7 |
| L-4-Terpineol | M | | - | 6.2 | 1.5 | 6.2 | 2.7 | 6.1 | 1.4 | | - | | - | 6.2 | 0.92 | | - |
| L-bornil acetato | M | | - | | - | | - | 7 | 0.07 | | - | | - | | - | | - |
| limoneno | M | | - | | - | | - | 4.8 | 5.8 | | - | | - | | - | | - |

| Compuesto | T | T.R. | Mar-10 | T.R. | Mar-11 | T.R. | Abr-10 | T.R. | Abr-11 | T.R. | May-10 | T.R. | Jun-10 | T.R. | Ago-10 | T.R. | Oct-10 |
|-----------------------------|---|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| linalol | M | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 5.4 | 0.29 |
| nonano | A | 3.4 | 26.6 | 3.5 | 24.2 | 3.5 | 24.8 | 3.5 | 23.1 | 3.5 | 29 | 3.5 | 17.1 | 3.5 | 21.4 | | - |
| o-cimol | M | 4.7 | 4.6 | | - | | - | | - | | - | | - | 4.8 | 4.5 | | - |
| octadecano | A | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 14.8 | 0.13 |
| óxido de cariofileno | S | 9.1 | 0.07 | | - | 9.1 | 0.3 | 9.1 | 0.35 | | - | 9.1 | 0.2 | 9.1 | 0.65 | | - |
| p- cimeno | M | | - | 4.8 | 4.5 | | - | 4.7 | 1.6 | 4.8 | 3.3 | 4.8 | 3.9 | | - | 5 | 1.6 |
| sabineno | M | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 4.3 | 1.2 |
| espatulenol | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 9.09 | 0.32 |
| terpinoleno | M | | - | | - | 5.4 | 1.2 | 5.39 | 0.64 | | - | | - | 5.41 | 0.84 | 5.4 | 1.1 |
| undecano | A | 5.4 | 2.79 | 5.4 | 2.9 | 5.4 | 3.2 | 5.4 | 2.9 | 5.4 | 3.4 | 5.4 | 2.7 | 5.45 | 1.8 | | - |
| valenceno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 8.8 | 0.13 |
| viridiflorol | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 9.2 | 0.33 |
| α -cariofileno | S | 8.2 | 0.07 | 8.3 | 0.1 | 5.4 | 3.26 | 8.3 | 0.17 | 8.3 | 0.04 | 8.2 | 0.11 | | - | 8.2 | 0.53 |
| α -pineno | M | 3.8 | 1.6 | 3.9 | 1.9 | 3.9 | 4.3 | 3.9 | 4 | 3.9 | 1.3 | 3.9 | 1.6 | 3.9 | 2.1 | 3.9 | 5.2 |
| α -terpineol | M | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 6.3 | 0.63 |
| α-bergamoteno | S | | - | | - | | - | 8.4 | 1.4 | | - | | - | | - | | - |
| α-cadinol | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 9.5 | 0.3 |
| α-careno | M | 4.6 | 10.2 | 4.7 | 7.3 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 2.17 | 4.7 | 7.2 | | - | | - | | - |
| α-farnesano | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 12.2 | 0.72 |
| α-felandreno | M | 4.5 | 0.47 | 4.6 | 0.5 | 4.6 | 0.5 | 4.6 | 0.23 | 4.6 | 3 | 4.6 | 7.3 | 4.6 | 3.5 | 4.6 | 15.1 |
| β -elemeno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 11.3 | 0.86 | | - |
| β -eudesmol | S | | - | | - | | - | 9.5 | 0.17 | | - | | - | | - | | - |
| β -felandreno | M | | - | 4.3 | 16.9 | 4.3 | 19.5 | 4.3 | 20.2 | 4.2 | 2.3 | 4 | 1.5 | 4.3 | 11.4 | 4.9 | 3.2 |
| β -mirceno | M | | - | 4.4 | 3 | | - | 4.4 | 2.17 | | | 4.4 | 2.3 | 4.4 | 2.6 | 4.49 | 2.1 |
| β -ocimeno | M | 4.8 | 6.6 | | - | | - | 4.9 | 0.13 | 4.8 | 4.9 | 4.8 | 8.6 | 4.9 | 0.48 | | - |
| β -pineno | M | 4.3 | 2.6 | 4.3 | 2.1 | 4.4 | 2.6 | 4.3 | 2.4 | 4.4 | 2 | | - | 4.39 | 1.5 | 4.43 | 1.9 |

APÉNDICE

| Compuesto | T | T.R. | Mar-10 | T.R. | Mar-11 | T.R. | Abr-10 | T.R. | Abr-11 | T.R. | May-10 | T.R. | Jun-10 | T.R. | Ago-10 | T.R. | Oct-10 |
|---------------------------|---|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| β –terpineno | M | | - | 4.8 | 3.4 | | - | | - | | - | | - | | - | | - |
| β –tuyeno | M | 4.2 | 10.5 | 3.8 | 4.5 | 3.8 | 6.2 | 4.2 | 10.9 | 3.8 | 16.3 | 4.3 | 12.2 | | - | 3.8 | 1.1 |
| γ-gurjuneno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 11.3 | 0.29 |
| γ-terpineno | M | 5.1 | 17.8 | 5.1 | 11.2 | 5.1 | 8.5 | 5 | 5 | 5.1 | 17.2 | 5.1 | 15.2 | 5.1 | 13.4 | 5.1 | 0.58 |
| δ-cadineno | S | 8.6 | 0.08 | | - | | - | 8.6 | 0.22 | | - | | - | 8.69 | 0.33 | 8.69 | 0.96 |
| δ-elemeno | S | | - | | - | | - | | - | | - | | - | | - | 7.4 | 0.62 |
| Total | | | 85.51 | | 90.24 | | 88.06 | | 90.23 | | 94.53 | | 80.11 | | 84.26 | | 58.4 |
| N° total de C. E. | | | 18 | | 79 | | 93 | | 56 | | 44 | | 70 | | 133 | | 158 |
| | | | S6 | | S4 | | S5 | | S7 | | S2 | | S3 | | S5 | | S15 |
| Naturaleza química | | | M9 | | M13 | | M10 | | M16 | | M11 | | M10 | | M13 | | M14 |
| | | | D- | | D1 | | D1 | | D2 |
| | | | A3 | | A3 | | A2 | | A3 | | A2 | | A2 | | A3 | | A1 |

APÉNDICE 7. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Este método se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad del aceite esencial, sobre cepas de bacterias y levaduras.

Medio: Para los ensayos con las cepas fúngicas se utiliza como medio de cultivo el agar PDA, para las cepas bacterianas agar Müeller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Aplicación de sustancias: Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocarán manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

Preparación de las muestras: Los sensidiscos se impregnan con el aceite hasta llegar a la concentración deseada de sustancia (2 mg) por disco.

Control positivo: Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos para la bacteria con 25 µg de cloranfenicol y para las levaduras con 10 µg de nistatina.

Incubación: Las levaduras y bacterias son cultivadas en una caja de Petri con 20 ml de agar, se colocan en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35°C, sin mayor tensión de CO₂.

APÉNDICE 8. Método de microdilución en agar

(Koneman 1985). Determinación de la CMI, CBM y CFM.

Preparación de reactivos y diluciones: Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se preparan diluyendo el aceite en el agar PDA (levaduras) y Müeller-Hinton (bacteria), según las concentraciones deseadas (1.25, 2.5, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/mL). Previamente el agar se esteriliza en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Se coloca la cantidad necesaria del aceite para obtener la concentración requerida. Después de mezclar bien el contenido se transfiere a una caja de Petri.

Inoculación e incubación de los tubos: Se prepara un inóculo que contiene 10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0,5 de Mc Farland). Incubar los tubos a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo. Con un hisopo se puntean los microorganismos en todas las concentraciones a ensayar.

Interpretación de resultados: La menor concentración de antimicrobiano que produce un descenso drástico del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

En aquellas cajas en donde se observa un nulo crecimiento de la población de microorganismos (99.9 % de inhibición), se denomina en el caso de levaduras, Concentración Fúngica Mínima (CFM) y en el caso de bacterias Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Técnica de dilución en caldo (Koneman, 1985).

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de tubos con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se prepara una suspensión microorganismos con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Saboureaud (levaduras) o Müller-Hinton (bacterias), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de Mc Farland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 microorganismos/mL, de esta suspensión se toman 100 µL y se le adicionan a 99.9 ml de solución salina al 0.9% obteniéndose así una concentración de 10^5 microorganismos/mL. Cada tubo se inocula con 100 µL de esta suspensión.

Se incuba por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se le añaden 50 µl de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08% a cada tubo, se incuba por 30 min. a 37°C, en los tubos donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazán de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del tubo. Donde no hay desarrollo de levaduras o de las bacterias, la solución permanece clara.

APÉNDICE 9. Inhibición del crecimiento radial

(Wang Y Bun, 2002).

Método Cualitativo: El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas Petri (100 X 15 mm) que contengan 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inocula un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el aceite esencial, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Los discos se colocan a una distancia de 30 mm del límite micelial. *Incubación:* Las placas son incubadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Controles positivos: Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7µg/disco de Ketoconazol.

Interpretación de resultados: En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el aceite esencial como activo, en todos los casos esta prueba se hace por triplicado.

Método Cuantitativo: El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en placas de cultivo de 24 pozos, que contengan 1 mL de agar papa dextrosa en cada pozo, con las siguientes concentraciones del aceite esencial a probar 2.00, 1.50, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 µg/mL. Posteriormente se coloca un botón de micelio de 1 mm de diámetro en el centro de la caja. *Incubación:* Las placas son incubadas a 23°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Controles positivos: Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol. 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 3.50, 7.00, 14.00, 28.00 µg/mL.

Interpretación de resultados: Los resultados se reportan en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la CFM.

APÉNDICE 10. Estadística descriptiva

Diagrama de caja: gráfico, basado en cuartiles, mediante el cual se visualiza un conjunto de datos.

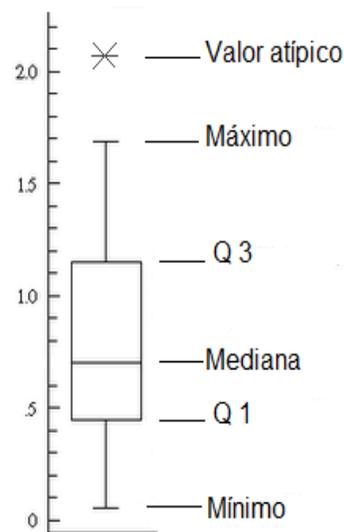
Mediana: medida de tendencia central. Es un dato de la distribución que la divide en dos partes iguales de forma tal que por debajo y por encima de ella se encuentra como máximo el 50% de los datos de estudio.

Q3: 3 cuartil, es aquel por debajo del cual ocurre el 75% de las observaciones

Q1: 1 cuartil es el valor por debajo del cual ocurre el 25% de las observaciones

Valor mínimo o máximo: es el dato más pequeño o más grande de la distribución, respectivamente

Valor atípico: dato que se aleja del cuerpo principal de datos



Halos de tratamientos

| Variable | Tratamiento | Media | DevSt | Min | Q1 | Med | Q3 | Max |
|----------|---------------|-------|-------|------|------|------|-------|------|
| Halo | Aceite Abr-10 | 3.11 | 4.92 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6.25 | 14.0 |
| | Aceite Abr-11 | 6.61 | 4.46 | 0.0 | 6.0 | 6.0 | 7.00 | 17.0 |
| | Aceite Jun-10 | 8.00 | 7.30 | 0.0 | 6.0 | 6.0 | 7.00 | 23.0 |
| | Aceite Mar-10 | 9.94 | 4.41 | 6.0 | 7.0 | 8.5 | 11.00 | 19.0 |
| | Aceite Mar-11 | 7.67 | 4.43 | 0.0 | 7.0 | 7.0 | 11.00 | 14.0 |
| | Aceite Oct-10 | 9.722 | 1.87 | 8.0 | 8.0 | 9.0 | 12.00 | 12.0 |
| | Cloranfenicol | 24.06 | 6.00 | 12.0 | 25.0 | 25.0 | 25.00 | 32.0 |

Halos de cepas bacterianas

| Variable | Cepa | Media | DevSt | Min | Q1 | Med | Q3 | Max |
|----------|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|
| Halo | E.c.5 | 15.29 | 6.33 | 6.00 | 12.00 | 14.0 | 23.00 | 25.0 |
| | S.a.2 | 8.86 | 7.36 | 0.00 | 6.00 | 7.0 | 10.00 | 25.0 |
| | S.e. | 6.81 | 4.80 | 0.00 | 0.00 | 7.0 | 11.00 | 13.0 |
| | S.p. | 12.57 | 9.26 | 6.00 | 6.00 | 7.0 | 18.50 | 32.0 |
| | V.ch. | 9.00 | 7.39 | 0.00 | 6.00 | 7.0 | 11.00 | 25.0 |
| | Y.e. | 6.71 | 8.41 | 0.00 | 0.00 | 7.0 | 8.00 | 25.0 |

Halos de cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas

| Variable | Tipo | Media | DevSt | Min | Q1 | Med | Q3 | Max |
|----------|----------------|-------|-------|-----|------|------|------|------|
| Halo | Gram negativas | 10.33 | 8.17 | 0.0 | 6.00 | 8.00 | 14.0 | 25.0 |
| | Gram positivas | 9.413 | 7.638 | 0.0 | 6.00 | 7.00 | 11.0 | 32.0 |

DevSt: desviación estándar; Min: dato mínimo; Max: dato máximo; Med: mediana.

LITERATURA CITADA

- Abad, M. J., Ansuategui, M., y Bermejo, P., 2007. Active antifungal substances from natural sources. *Journal Archive for Organic Chemistry* 7, 116-145.
- Akerele, O., 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud* 14, 390-395.
- Álvarez, L. M. E., Isaza, M. G., Echeverry L. H., 2005. Efecto Antibacteriano In Vitro De *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia Amarga) Y *Ludwigia Polygonoides* H.B.K. (Clavo De Laguna). *Revista Ciencias Básicas Biosalud* 14, 46 – 55.
- Araujo, D. J., Salas, A. R., 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Revista Científica* 6, 6-18.
- Arias, T. A. A., Valverde, V. M. T., Reyes, S. J., 2000. Las plantas de la región de Zapotitlan Salinas Puebla. Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. Instituto Nacional de Ecología. México. 78 p.
- Ávalos, G. A., Pérez, U. C. E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiológica Vegetal* 2 (3), 119-145.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Barrera, N. L. L., y García, B. L. J., 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista Científica Universidad de Oriente Agrícola* 8 (1), 33-41.
- Burt, S. A., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A. y Rubertob, G., 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit Essentials oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology* 43, 73. Citado en Velázquez, N. M. J., 2010. Acción antifúngica del aceite esencial de cascara de naranja, aplicado por adición directa o por generación de vapores. Tesis Lic. Ingeniería Química y alimentos. Escuela de ingeniería. Universidad de las Américas Puebla. 63 pp.
- Canales, M. M., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo de V. R. A., Durán, D. Á., Lira S. R., 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México *Acta Botánica Mexicana* 75, 21-43.

- Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1914-1920.
- 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 (1), 50-62.
- Castaño, H. I., Ciro, G. G., Zapata, M. J., Jiménez, R. S., 2009. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 17 (2), 149-154.
- Castillejos, V. L., 2005. Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis Doctoral. Bellaterra. Universidad Autónoma de Barcelona. 164 p.
- Cavaleiro, C. P. E., Goncalves, M. J., Salgueiro, L., 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1333 – 1338.
- Cesa, A., Bakker, M., 2007. Estudio inicial del contenido y patrón de alcanos en especies forrajeras con diferente nivel de preferencia por los ovinos en la estepa patagónica, Santa Cruz, Argentina. *Asociación Peruana de Producción Animal - Archivo Latinoamericano de Producción Animal - Cusco, Perú* 15 (1), 1-7.
- Cichewicz, R. H. y Thorpe, P. A., 1996. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum species*) & their uses in Mayan Medicine. *Journal of Ethanopharmacology* 52, 61-70. 14.
- Dambolena, J. S., Meriles, J. M., López, A. G., Gallucci, M. N., González, S. B., Guerra, P. E., Antonella, B. y Zunino, M. P., 2011. Actividad antifúngica del aceite esencial de cinco especies de *Juniperus* de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10 (2), 104 - 115
- Davidson, P. M. y Branen, A. L., 1993. *Antimicrobials in foods*. Marcel Dekker, Inc New York. Citado en: López-Malo, A. 2000. *La preservación multiobjetivo de Alimentos*.
- Dávila, A. P., Arizmendi, M. Del C, Valiente-Banuet A., Villaseñor, J. L, Casas, A. y Lira R., 2002a. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation* 11, 421-442.
- Dávila, A. P., Lira, S. R., Paredes, F. M., Blanckaert, I. y Rosas, L. R., 2002b. La Flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Zapotitlán Salinas y San Rafael Coxcatlán, Puebla. Informe final del proyecto T015. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. 33 p.
- Dávila, A. P., Medina, L. R., Ramírez, R. A., Salinas, T. A. y Tenorio, P., 1995. Análisis de la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: endemismo y diversidad. Citado en Linares, E., Dávila P., Chiang, F., Bye, R. y Elias, T. (eds.). *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 33-41 pp.

- Del Pozo, E. X. A., 2006. Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) stapf). Tesis de Grado. Sede Sangolqui. Facultad de ingeniería en biotecnología. 142 p.
- Domingo, D. y López, B. M., 2003. Revisión: Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia 16 (4), 385-393.
- Domínguez, X. A., 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 p.
- Errecalde, J. O., 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en Salud Publica. Food And Agriculture Organization. 71 p.
- Espinosa, E. L., 2012. Estudio comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schelechtendalii* Engler. Tesis Lic. Biología. UNAM.80 pp.
- Fernández, B. M. N., 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 98 p.
- French, R. C., 1995. The bio-regulatory action of flavor compounds on fungal spores and other propagules. Annual Review Phytopatology. 23: 173. Citado en Caccioni, D. R. L. Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A. y Roberto, G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit Essentials oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. International Journal of Food Microbiology 43, 73.
- García, M. E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 3a ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 252 pp.
- Gillet, J. B., 1980. *Commiphora* (Burseraceae) in South America and its relationships to *Bursera*. Kew Bulletin 34, 569-587.
- Graedel, T., 1979. Terpenoids in the atmosphere. Reviews of Geophysical Research 17, 993-947,
- Granados, S. D., Ruiz, P. P., Barrera, E. H., 2008. Ecología de la herviboria. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente 14 (001), 51-64 pp.
- Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L. y Leach, D. N., 1999. The rol of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavor and Fragrance Journal 14, 322-332.
- Guenther, A., 1997. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. Ecological Applications 7, 34-45.
- Guerra, O. M., Rodríguez, J. M., García, S. G., y Llerena, R. C., 2004. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. Revista Cubana de Plantas Medicinales 9 (2).
- Gupta, B. K., Jain, N., 1978. Cultivation and utilization of Genus *Cymbopogon* in Indian. Indian Perfumer 22 (2), 55-68.

- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, G., y Warmington, J. R., 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology 26, 194-198.
- Harborne, J. B., y Tomas, B. F. A., 1991. Ecological Chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Editorial Clarendon Press-Oxford, USA. 439 pp.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva, K. K., Mattila, S. T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. Journal of Agricultural Food Chemistry 46, 3590-3595.
- Heuer, B., 1999. Osmoregulatory role of proline in plants exposed to environmental stresses. In: Pessaraki, M. (ed.). Handbook of Plant and Crop Stress. 2a ed. University of Arizona Tucson, Arizona. 675-688 pp.
- Huertas, B. J. P., 2008. Efecto de tratamientos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro y en una sopa comercial. Tesis en microbiología industrial. Cartagena España. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 127 p.
- INE (Instituto Nacional de Ecología) 2007. Diversidad ecológica y biológica de México. México D. F. disponible en línea: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/2/int.html>. Última actualización 15/11/2007.
- Inouye, S., 2003. Laboratory evaluation of gaseous essential oils. International Journal Aromatherapy 13 (21), 95.
- Inouye, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Takeo, K., Akao, M., Yamaguchi, H., 1998. Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. Micosis 41(9-10), 403-10.
- 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.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H. M. y Vigneschow, H., 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. Progress in Essential oil Research. Ed. E. J. Brunke Walter de Gruyter. Nueva York, EE. UU. 429 p.
- Koneman, W. E., 1985. Diagnóstico Microbiológico Ed. Médica Panamericana, México. 439 p.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Fakir, A., Ala, A., y Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish. *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural Food Chemistry 53, 9452- 9458
- Kurita, N., y Koike, S., 1983. Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oils components. Agricultural and Biological Chemistry 47, 67 - 75.

- La Barca, L. J., y Araos B. R. 2009. Resistencia antimicrobiana: problema en aumento y soluciones escasas. *Revista Chilena de Infectología* 26 (1), 8-9.
- Lambert, R., J. W., Skandamis P. N., Coote P., Nychas G. J. E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453–462.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L., 2010. *Biotecnología y mejoramiento Vegetal II*. 2ª ed. Argentina. Ed. Instituto nacional de tecnología Agropecuaria. 643 p.
- Lira, R., 2001. Los recursos vegetales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde una perspectiva etnobotánica. Informe técnico. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 9 pp.
- López, H. L., 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Tesis Lic. Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztcala. 64 p.
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A., Okulik, N. B., 2006. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Resumen E-057. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Argentina. Universidad Nacional del Nordeste.
- Mazari, K, Bendimerad, N, Bekhechi, C., Fernández, X., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 959 -964
- Medina, L. R., 2008. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 66. Burseraceae. Primera edición. Instituto de biología, UNAM. 1-76.
- Medina, S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Lic. Biología. UNAM. Facultad de Ciencias. 35 pp.
- Méndez, J. y Olaya, J. M., 2003. Guía de plantas y productos medicinales. Convenio Andrés Bello Colombia 52 pp.
- Méndez, L. I., Ortiz, E., Villaseñor, J. L., 2004. Las Magnoliophyta endémicas de la porción xerofítica de la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Serie Botánica* 75(1), 87-104.
- Mesa, A. A. C., Bueno, S. J. G. y Betancur, G. L. A., 2004. Productos naturales con actividad antimicrobiana. *Revista especializada de química terapéutica* 17, 325-331.
- Nicolás, C. R. M. (en proceso de titulación) Variación en la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera fagaroides*.
- Olivas, M., 1999. Plantas medicinales del estado de Chihuahua. Universidad autónoma de Ciudad Juárez. Centro de Estudios biológicos. México. 127 pp.

- Omidbeygi, M. Barzegar, M. Hamidi, Z. y Nafhdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*. 18 (2): 1518. Citado en Viuda- Martos, M., Ruiz- Navajas, Y. Fernandez- Lopez, J. y Perez- Alvarez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, p 1137. *Food control* 19, 1130.
- 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 Krieg, N. R., 1998. Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. In *Microbiology*. New York: Mc Graw-Hill International. 469-509 pp.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kalodera, Z., Blazevic, N., 2005. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Farmacéutica* 55, 417 – 422.
- Puerta, D., y León, M., 2009. Uso de las plantas medicinales en la comunidad de higuera del estado Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Divulga 13, 13-16.
- Quintana, O. E., Plascencia, J. M., Gonzalez, A. G., Cortez R. M., 2010. Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*. *Revista mexicana de micología* 32, 59-62.
- Rodríguez, G. C., Medina, C. G, Cabrera, H. D., y Díaz, H. E., 2002. Medicina natural y tradicional. Conocimientos y aplicaciones de enfermería en minas-II *Revista Cubana de Enfermería* 18 (3), 138-4.
- Romo de Vivar, A., 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa. México. pp. 59-67.
- Rosas, L. R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 95 pp.
- Rytel, M., Mogabab, W., 1993. Manual de enfermedades infecciosas. 3ra Ed. México D. F. Editorial Interamericana, 546 pp.
- Rzedowski, J., Medina, L. R., y Calderón, R. G., 2004. Las especies de *Bursera* de la cuenca del río Papaloapan, México. *Acta Botánica Mexicana* 66, 23-151.
- Rzedowski, J., Medina, R., y Calderón, R. G., 2005, Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana* 70, 85-111.
- Rzedowski, J. y Kruse, H., 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxón* 28 (1,2/3), 103-116.
- Salcedo, S. B., 1997. Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Biología. UNAM Facultad de Ciencias 6-10 p.

- Secretaria de salud. Censo de población 2001. Casa de salud de la comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla México. 10 p.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. y Poolman, B., 1995. Mechanism of membrane toxicity of hidrocarbons. *Microbiological Reviews* 59 (2), 201-222.
- Sistema Integral de Información Taxonómica Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. 2006. Disponible en línea: http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/next?v_tsn=28764&taxa=&p_king=Plantae&p_string=containing&p_ifx=itismx&p_lang=es. Consultado 8/Abril/2011.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolau, C., Kokkini, S., Lanaras, T. y Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 44, 1202-1205.
- Smith, C. E., 1965a. Flora, Tehuacán Valley. *Fieldiana Botany* 31, 50-100.
- Smith, C. E., 1965b. Agriculture, Tehuacán Valley. *Fieldiana Botany* 31, 101-143.
- Smith, P. A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26, 118-122.
- Soto, R. O., Vega, G. M., Tamajón, L. N., 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 7 (2), 89-95.
- Standley, P. C., 1923. Trees and shrubs of México. Contributions. from the United States National Herbarium 23, 542-552.
- Trione, E. J., 1981. Natural regulators of fungal development. Citado en Montes-Belmont R., Cruz, C. V., Martínez, M. Sandoval, G. G., García, L. R., Zilch, D. S., Bravo, L. L. Bermúdez, T. K., Flores, M. H., Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis retrospectivo de Investigaciones *Revista Mexicana de Fitopatología* 18 2, 125-131.
- Ultee, A. Kets, E. P. W. y Smith, E. J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied And Environmental Microbiology* 65, 4606-4610.
- Uribe, R., Ramírez, J y Peña, A., 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*. 161:1195. Citado en Viuda- Martos, M., Ruiz- Navajas, Y. Fernández- López, J. y Pérez- Álvarez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, p 1137. *Food control* 19, 1130.
- Valiente, B. A., Alcántara, A., Casas, A., Dávila, P., Flores, H. N., Arismendi, M. C., Ortega, R. J., Villaseñor, J. L., 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67, 24-74.
- Valiente, B. L., 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis. UNAM. México. 65 pp.

- Van den, Berghe. D. A. y Vlietnick, A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant Biochemistry* 6, 47-69. 23.
- Vargas R. y Bottia J. 2008. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de 6 especies de vegetales cultivadas en los municipios de Bolivar y El Peñon-Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- Villa, R., Cañigual, S., 2006. El aceite esencial de *Maleluca alternifolia* en el tratamiento de la vulvovaginitis. *Revista De Fitoterapia* 6 (2), 119-128.
- Villaseñor, J. L., 1992. Los parques nacionales y otras áreas protegidas y su papel en la conservación de la riqueza florística. *Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara* 1, 119-130.
- Wang, H. y Bun, T. N., 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61, 1-6.