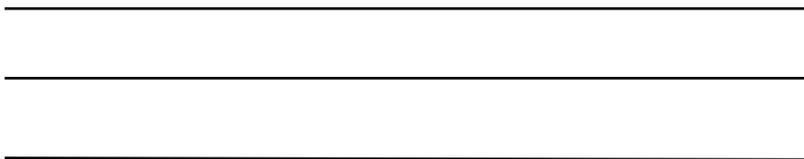




UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

VARIACIÓN EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Bursera fagaroides*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Nicolás Camargo Rosa Martha

Directora de Tesis:

Dra. María Margarita Canales Martínez

OCTUBRE 2013, LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

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

Dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Con la revisión del siguiente jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. María Margarita Canales Martínez

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 IN218511

Para aquellos que sirva cada línea o pedacito de lo que conlleva este trabajo, y los que construyen el conocimiento con cada sentido y fuerza. Asimismo a todos los que me impulsaron física y mentalmente -y en muchos casos me zapearon- para seguir con el coraje en alto.

(Kostova E., Chance K., White K., Kelly J., Yoshimoto B., J.K, Nakamura S., Kanno Y.,... .. lira)

Esta ciudad no me la han contado, yo la he visto.

Por eso hay que salir a retarla. Apostar hoy al 6 y mañana al 8. Salir a buscarla y saltar cuando aparece, ganarle la carrera. Salir a la noche y retarla, decirle: «Aquí estoy y corro más rápido que tú. Soy experta en huidas, en juegos de escondite, en fintas de karate celestial que permiten evadir el navajazo, hacer del disparo lluvia de confeti, de la puñalada serpentina.

... No por valiente. Por cobarde con sentido común. «Taibo P.I.II.»

ÍNDICE GENERAL

♣ Resumen	14
♣ Introducción	15
♣ Objetivos	19
♦ Objetivo General	19
♦ Objetivos Particulares	19
♣ Materiales y Métodos	20
♦ Colecta de Material	20
♦ Obtención del Aceite Esencial por Hidrodestilación	20
♦ Análisis de la Composición Química del Aceite Esencial	20
♦ Evaluación de la Actividad Antibacteriana	21
♦ Bacterias:	21
♦ Gram-positivas	21
♦ Gram-negativas	21
♦ Evaluación Cualitativa de la Actividad antibacteriana	21
♦ Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antibacteriana	21
♦ Actividad del Aceite Esencial sobre la curva del Crecimiento Bacteriano	22
♦ Levaduras:	22
♦ Evaluación Cualitativa de la Actividad Antifúngica	22
♦ Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antifúngica	22
♦ Actividad del Aceite Sobre la Curva del Crecimiento de las Levaduras	23
♦ Hongos Filamentosos:	23

♦ Evaluación de la Actividad antifúngica	23
♦ Evaluación Cualitativa de la Actividad Antifúngica	23
♦ Evaluación Cuantitativa de la Actividad Antifúngica	24
♦ Pruebas Estadísticas	24
♣ Resultados	24
♦ Colecta y Extracción	24
♦ Rendimientos	26
♦ Composición Química Principal	49
♦ Pruebas Cualitativas	56
♦ Pruebas Cuantitativas	57
♦ Hongos Filamentosos	66
♣ Discusión	67
♣ Conclusiones	73
♣ Perspectivas	74
♣ Apéndice 1	75
♦ Descripción -Especie: <i>Bursera fagaroides</i> -	75
♣ Apéndice 2	81
♦ Zona de Colecta	81
♦ Localidad	81
♦ Clima	82
♦ Hidrografía	83
♦ Edafología	83
♦ Vegetación	83
♦ La Población	84

♣ Apéndice 3	85
♦ Método de Difusión en Agar de Kirby-Baüer	85
♦ Medio de cultivo	85
♦ Aplicación de Sustancias	85
♦ Preparación de las Muestras	86
♦ Control Positivo	85
♦ Incubación	86
♣ Apéndice 4	87
♦ Método de Dilución en Caldo; determinaciones de la CMI, CBM y CFM	87
♦ Preparación de Reactivos y Diluciones	87
♦ Inoculación e Incubación de los Frascos y Tubos	87
♦ Interpretación de Resultados	88
♣ Apéndice 5	89
♦ Actividad de los Extractos Sobre la Curva de Crecimiento	89
♦ Preparación de Medios y Diluciones	89
♦ Inoculación e Incubación	89
♦ Interpretación de Resultados	89
♣ Apéndice 6	90
♦ Inhibición del Crecimiento Radial	90
♦ Método Cualitativo (desarrollo e interpretación de resultados)	90
♦ Método Cuantitativo (desarrollo e interpretación de resultados)	90
♣ Referencias	91

ÍNDICE DE CUADROS

♣ Cuadro 1. Mención de algunos trabajos realizados para <i>Bursera</i> y <i>B. fagaroides</i>	17
♣ Cuadro 2. Rendimientos de los aceites de <i>B. fagaroides</i> en diversos meses de colecta.	27
♣ Cuadro 3. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Abril-2010 (ramas A).	28
♣ Cuadro 4. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Abril (2010, fruto).	30
♣ Cuadro 5. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2010, fruto-.	31
♣ Cuadro 6. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2010, hojas-.	33
♣ Cuadro 7. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2010, ramas-.	35
♣ Cuadro 8. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Junio -2010, ramas-.	36
♣ Cuadro 9. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Agosto -2010, fruto-.	38

♣ Cuadro 10. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Septiembre -2010, tallos A-.	39
♣ Cuadro 11. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Septiembre -2010, tallos B-.	40
♣ Cuadro 12. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Marzo -2011, ramas A-.	41
♣ Cuadro 13. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Marzo -2011, ramas B-.	42
♣ Cuadro 14. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Abril -2011, ramas-.	44
♣ Cuadro 15. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2011, ramas-.	45
♣ Cuadro 16. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Junio -2011, ramas-.	47
♣ Cuadro 17. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Agosto -2011, ramas-.	48
♣ Cuadro 18. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Septiembre -2011, ramas-.	49

♣ Cuadro 19. Compuestos más abundantes en cada aceite de <i>Bursera fagaroides</i> de los diferente meses recolectados.	50
♣ Cuadro 20. Compuestos de menor abundancia en cada aceite de <i>Bursera fagaroides</i> de los diferente meses de colecta.	52
♣ Cuadro 21. Compuestos del aceite de <i>B. fagaroides</i> empleado del mes de Abril-2010, ramas B.	55
♣ Cuadro 22. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Bursera fagaroides</i> .	57
♣ Cuadro 23. CMI y CBM del aceite esencial de <i>B. fagaroides</i> ante seis cepas bacterianas.	57
♣ Cuadro 24. Características generales de <i>Bursera fagaroides</i> .	77

ÍNDICE DE FIGURAS

♣	Figura 1. Obtención del aceite por hidrodestilación.	25
♣	Figura 2. Aceite esencial de una muestra de <i>B. fagaroides</i> .	25
♣	Figura 3. Partes empleadas para la obtención de aceite esencial de <i>Bursera fagaroides</i> .	25
♣	Figura 4. Rendimiento en % de cada mes de colecta.	26
♣	Figura 5. Porcentaje de los compuestos más y menos abundantes.	54
♣	Figura 6. Porcentaje de cada compuesto presentes del total del aceite de <i>B. fagaroides</i> empleado en las pruebas antimicrobianas.	56
♣	Figura 7. Efecto del aceite esencial sobre la curva de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	58
♣	Figura 8. Porcentaje de inhibición de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) a 24 hrs.	59
♣	Figura 9. Comportamiento de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) y el Testigo.	59

♣	Figura 10. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) en 48 hrs.	60
♣	Figura 11. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre Ca.-CUSI- en 24 hrs.	61
♣	Figura 12. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre Ca.-CUSI- en 48 hrs.	61
♣	Figura 13. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre <i>Candida tropicalis</i> en 24 hrs.	62
♣	Figura 14. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre <i>Candida tropicalis</i> en 48 hrs.	63
♣	Figura 15. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 14065 en 24 hrs.	63
♣	Figura 16. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 14065 en 48 hrs.	64
♣	Figura 17. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre <i>Candida glabrata</i> en 24 hrs.	65
♣	Figura 18. Actividad del aceite de <i>B. fagaroides</i> sobre <i>Candida glabrata</i> en 48 hrs.	65
♣	Figura 19. Ejemplar vivo y completo de <i>Bursera fagaroides</i> .	79

- ♣ Figura 20. Ejemplar de *Bursera fagaroides* conservado por método de prensado. A. ramas con frutos; B. frutos; C. corteza (Elia, 2011). 80
- ♣ Figura 21. Ubicación de Coxcatlán, Puebla. Tomado de:
<http://www.maplandia.com/mexico/puebla/> 81
- ♣ Figura 22. Ubicación de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tomado de:
<http://www.google.com/intl/es/earth/>. [2012]. 82

RESUMEN

Las pruebas, investigación y registro etnobotánico realizadas en torno a la especie *Bursera fagaroides* refieren -todas ellas de forma "popular"- antecedentes de ser un antiinflamatorio, antiséptico, antisintomático respiratorio, etc., por ello se dio paso en este trabajo al estudio de su aceite, obtenido en diferentes épocas del año. Se enfocó en determinar la composición química empleando CG-EM, en donde el compuesto de mayor incidencia fue α -pineno además se demostró la variación en diferentes meses del año en su composición química, y se determinó la actividad antimicrobiana como objetivo general. Ante los hongos filamentosos, la actividad inhibitoria del aceite esencial no tuvo el mismo impacto como lo ocurrido ante las series de cepas de *Candida*, que a partir de una concentración de 4 mg/mL se observó una clara inhibición de todas las cepas ante el aceite esencial; mientras que las bacterias presentaron un decaimiento ante concentraciones de 6 mg/mL. El presente trabajo aporta conocimiento en el empleo como remedio tradicional diverso, inhibición del crecimiento de diversas cepas y la composición química del aceite.

Palabras clave: *Bursera fagaroides*, propiedades antimicrobianas, aceite esencial, Coxcatlán, composición química.

VARIACIÓN EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Bursera fagaroides*

INTRODUCCIÓN

El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos han sido sin duda tan antiguos como la astronomía, la física y la medicina. Actualmente, el estudio sistemático de las drogas naturales es abordado por la farmacognosia. Esta ciencia se enfoca particularmente al estudio de los principios activos de origen vegetal, animal y mineral, así como de los derivados que pudieran tener una aplicación terapéutica, comercial o industrial (Cortez et al., 2004).

En un sentido más amplio la farmacognosia abarca el estudio de la historia, el cultivo, la recolección, preparación, preservación, comercialización, distribución, identificación y evaluación de los componentes químicos de origen natural, la farmacología y el uso tradicional de esos compuestos o sus derivados para mejorar la salud y el bienestar del ser humano, en donde la herbolaria indígena precolombina jugó un papel importante en el campo de la medicina debido a que el uso de las plantas medicinales y otros productos de origen natural tenía ya una historia de por lo menos 3500 años (Cortez et al., 2004). Aunque estudios recientes de la paleobotánica han comprobado la existencia de una historia de más de 4000 años de antigüedad detectada en algunos vestigios de tejidos vegetales y polen petrificado encontrados en las excavaciones en zonas arqueológicas de América que sugieren el uso de

especies vegetales que aún en la actualidad son perfectamente conocidas y utilizadas en la vida cotidiana y medicina tradicional como es la familia Burseraceae que comprende alrededor de 650 especies. Comúnmente especies de esta familia se usan como cerco vivo y decoración por su fácil propagación y rápido crecimiento (Hernández et al., 2002).

En particular la especie *B. fagaroides* (del lat., *fagus*: haya (árbol); *oides*: que tiene una forma o naturaleza de..., brea), o popularmente llamada cuajote verde, jiote, palo del diablo, papelillo, cuajote amarillo o venadilla; es un árbol fanerófito, resinoso y caducifolio de corteza exfoliable y aromática con la base del tronco muy grueso se sabe que su corteza se utiliza en infusión contra infecciones y problemas de los riñones. La savia se recolecta para fines ceremoniales, debido a su penetrante y agradable aroma que de ella se hace incienso para ser utilizado en actividades religiosas. También se emplea para tratar golpes internos. El emplasto de sus hojas se aplica contra el dolor de cabeza. Las hojas mismas se utilizan también contra las mordeduras de serpiente y contra la gangrena. En decocción se usan para tratar la dermatitis, y maceradas para curar la artritis y las picaduras de abejas, avispa y otros insectos. La goma que exuda la planta cuando es dañada mecánicamente, es utilizada como desinfectante, 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, presenta propiedades antidepresivas (Rzedowski et al., 2004; Andrés y Espinosa, 2002; Elia, 2011) (Apéndice 1).

Por ello se han realizado algunos estudios sobre las propiedades y usos de la *B. fagaroides* (estudios sobre distribución, medicinales, ceremoniales, usos populares como lo es para matar perros, para fabricar alebrijes, etc.)

(Hernández et al., 2002). Como se puede observar en el Cuadro 1 son muy pocos los trabajos realizados sobre las propiedades biológicas de *B. fagaroides*, por lo que en este trabajo se planteó la necesidad de conocer no sólo la composición química, sino también las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de esta especie, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

Cuadro 1. Mención de algunos trabajos realizados para *Bursera* y *B. fagaroides*

Referencia	Descripción
Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla, México. Arias et al., 2000.	Publicación sobre las plantas de Zapotitlán Salinas de la región de Tehuacán-Cuicatlán, como es la familia Burseraceae.
Distribución del género <i>Bursera</i> en el estado de Morelos, México y su relación con el clima. Hernández et al., 2011.	Análisis sobre la influencia de variables climáticas en la distribución de las especies del género <i>Bursera</i> en Morelos, México, haciendo mención entre ellos de la especie de <i>Bursera fagaroides</i> .
Flora de Papalutla, Guerrero y de sus alrededores. Martínez et al., 1997.	Análisis de la flora de Papalutla, Gro. y sus alrededores, en la región oriental de la cuenca del río Balsas encontrando 699 sp. y variedades, 375 géneros y 96 familias haciendo mención de las <i>Burseras</i> .

<p>La familia Burseraceae en el estado de Aguascalientes, México. Elia et al., 2011.</p>	<p>Estudio de árboles y arbustos de la familia Burseraceae localizadas en Aguascalientes, México, de 6 especies de <i>Bursera</i>, entre ellas, <i>B. fagaroides</i>.</p>
<p>Glicósidos de luteolina y miricetina de Burseraceae. Hernández et al., 2002.</p>	<p>De las hojas de <i>B. fagaroides</i> var. <i>elongata</i> se aisló el 3'-O-α-L-ramnopiranosido de luteolina. De las hojas de las otras <i>Burseras</i> otros componentes.</p>
<p>Las especies de <i>Bursera</i> (Burseraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan (México). Rzedowski et al., 2004.</p>	<p>Estudio de las <i>Burseras</i> presentes en la cuenca superior del Papaloapan, entre ellas <i>B. fagaroides</i>.</p>
<p>Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de <i>Bursera graveolens</i> (Burseraceae) de Colombia. Leyva et al., 2007.</p>	<p>Del aceite esencial de hojas y tallos de <i>B. graveolens</i>, se identificaron en mayoría, limoneno, óxido de cariofileno, trans cariofileno, mirceno, mentofurano, Z-β-ocimeno.</p>
<p>Composición química del aceite esencial de la corteza de <i>Bursera tomentosa</i> (Burseraceae) (Jacq) Tr & Planch. Moreno et al., 2010.</p>	<p>De la colecta de <i>B. tomentosa</i> en el mes de Septiembre (2002) en Cabudare, Estado Lara, Venezuela, de la corteza se obtuvo el aceite esencial e identificando 28 compuestos (espatuleno, globulol, epi-α-cadinol y cis-ocimeno).</p>

OBJETIVOS

♣ OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera fagaroides* obtenido en diferentes épocas del año.

♣ OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Obtener el aceite esencial de *B. fagaroides* por hidrodestilación.
- ◆ Realizar el análisis químico del aceite esencial aplicando una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- ◆ Evaluar cualitativamente sus propiedades antimicrobianas, utilizando el método de difusión en agar y el de inhibición del crecimiento radial.
- ◆ Evaluar cuantitativamente sus propiedades antimicrobianas, utilizando el método de dilución en agar.

MATERIALES Y MÉTODOS

♣ **Colecta de material.**

El material vegetal necesario (corteza, frutos, ramas) de *Bursera fagaroides* fue colectado entre los meses de Abril a Septiembre (2010), y Marzo a Mayo (2011) en San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2).

♣ **Obtención del aceite esencial por hidrodestilación.**

Se colocaron entre 40 g y 100 g de la muestra a extraer y luego se depositaron en un matraz de bola de 500 mL al cual se le agregó agua destilada hasta la mitad de la capacidad del matraz cubriendo así la muestra colocada dentro. El matraz se situó en una mantilla de calentamiento eléctrica. Se montó el sistema de refrigeración, se esperó a que llegue al punto de ebullición y se recolectó el aceite esencial. Se evaluó la densidad y el rendimiento del aceite esencial obtenido.

♣ **Análisis de la composición química del aceite esencial.**

Se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas —CG-EM— en un Cromatógrafo de Gases (Modelo 6850) acoplado a un Espectro de Masas (Modelo 5975C), ambos marca Agilent Technologies; columna HP-5MS de 30 metros de longitud, 0.25 mm diámetro interno y película de 0.25 μm . Las muestras (0.1 μL) fueron inyectadas por el modo Split con una relación 80:1; flujo constante, 1.0 mL/min; con una temperatura del inyector de 250 °C (temperatura inicial de 70 °C x 2 minutos); gas acarreador, He; ajustado a una velocidad lineal de 36 m/s; la energía de ionización fue de 70 eV. La identificación de los componentes de cada uno de los aceites fueron establecidos con la base de datos de la biblioteca NIST 8.0.

♣ **Evaluación de la actividad antibacteriana.**

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

♣ **BACTERIAS**

♦ **Gram-positivas:** *Staphylococcus epidermidis*, donada por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán; y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

♦ **Gram-negativas:** *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico (esta cepa corresponde al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán.

♦ **Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana (Apéndice 3).**

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Van den Berghe y Vlietnick, 1991). Cada uno de los ensayos se efectuaron por triplicado, en donde los discos se impregnaron con 5 µL del aceite esencial y como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con cloramfenicol (25 µg por disco).

♦ **Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana (Apéndice 4).**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó la técnica de dilución en caldo (Koneman, 1985). Las concentraciones aplicadas para cada uno de los bioensayos cuantitativos fueron de 0.25 a 4.0 mg/mL, y su correspondiente control positivo y negativo. Cada concentración se hizo por triplicado.

♦ **Actividad del aceite esencial sobre la curva del crecimiento bacteriano (Apéndice 5).**

Para determinar si el extracto tenía un efecto bactericida o bacteriostático se empleó la curva del crecimiento bacteriano. Se preparó un frasco vial para cada una de las concentraciones a evaluar del aceite y se realizó un muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después 2 muestreos cada 2 horas y finalmente a las 12 y 24 horas.

♣ **LEVADURAS**

♦ **Levaduras:** *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* ATCC 14065 donadas por el laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM. Dr. Rubén López Martínez (responsable) y la Dra. Patricia Manzano Gayoso. *Candida albicans* aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala. *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* (aislada de urocultivo) donadas por el hospital Los Ángeles. *Candida albicans** y *Candida tropicalis** donadas por la FES Cuautitlán a través de la M. en C. María de Jesús Sánchez Onofre.

♦ **Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.**

La actividad antifúngica sobre levaduras, se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Bauer (Van den Berghe y Vlietnick, 1991). Como control positivo se utilizaron sensibilizadores impregnados con Ketoconazol (7 µg por disco). Los discos son impregnados con 5µL del aceite esencial. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

♦ **Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM) se empleó la técnica de dilución en caldo (Koneman, 1985). Se probó un abanico de concentraciones desde 0.5 a 8.0 mg/mL del aceite esencial.

♦ **Actividad del aceite sobre la curva del crecimiento de las levaduras.**

Para determinar si el extracto tiene un efecto fungistático o fungicida se evaluó su actividad sobre la curva de crecimiento de las levaduras. Se preparó un tubo para cada concentración del extracto a evaluar ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CFM) y dando seguimiento desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después dos muestras con intervalos de 2 horas, una muestra a las 12 horas y finalmente a las 24 horas.

♣ **HONGOS FILAMENTOSOS (Apéndice 6).**

♦ **Evaluación de la actividad antifúngica.**

Para la evaluación de la actividad antifúngica se utilizaron las siguientes cepas de hongos: *Aspergillus niger* (CDBB-H-179), *Trichophyton mentagrophytes* (CDBB-H-1112); *Fusarium moniliforme* donada por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala.

♦ **Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.**

Para su análisis cualitativo se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial usando una concentración de 5 μ L por disco del extracto a probar -por triplicado la prueba- y como control positivo Ketoconazol (7 μ g) (Wang y Bun, 2002).

◆ **Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.**

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF₅₀) y la concentración fungicida mínima (CFM), se aplicó el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Las concentraciones manejadas fueron de 1 a 8mg/mL. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

◆ **Pruebas estadísticas.**

Se les realizó un análisis a los resultados obtenidos de los mese por colecta; y la actividad antifúngica y antibacteriana para determinar si existían diferencias significativas sobre sensibilidad entre las cepas microbianas un análisis descriptivo; por especie y concentración (media, desviación estándar, coeficiente de variación, diagramas de barras etc., para cada determinación). Los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico "Statistic for Windows 7 in Microsoft Office Excel".

RESULTADOS

♣ ***Bursera fagaroides.***

- ◆ **Colecta y extracción:** de las colectas de *B. fagaroides* realizadas de los meses antes mencionados en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, por hidrodestilación se obtuvieron aceites esenciales con propiedades translúcidas e incoloras de partes como son ramas, corteza y frutos, como se observa en las Figuras 1, 2 y 3.

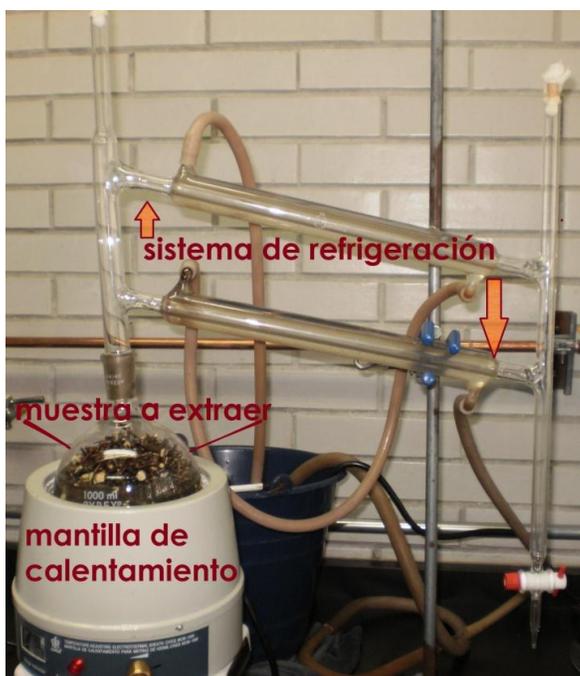


Figura 1. Obtención del aceite por hidrodestilación.

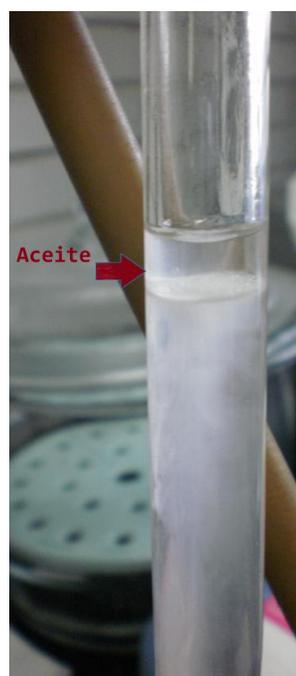


Figura 2. Aceite esencial de una muestra de *B. fagaroides*.

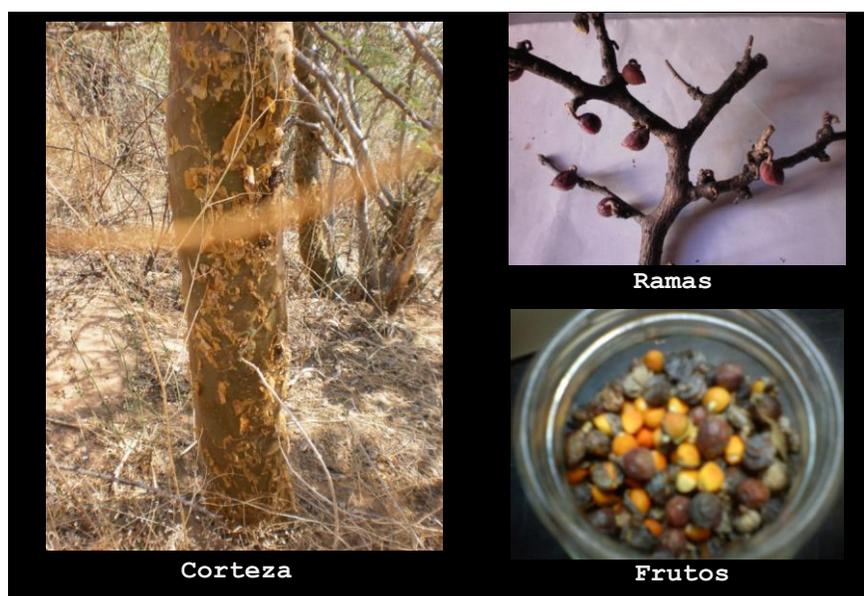


Figura 3. Partes empleadas para la obtención de aceite esencial de *Bursera fagaroides*.

♦ **Rendimientos:** en la figura 4 se muestran los rendimientos por cada uno de los aceites, además de obtenerse un promedio de 3.9443 mL y una media de 0.7321 en cuanto a su porcentaje con respecto a los rendimientos los cuales fueron variables, en donde el correspondiente al mes de abril -2011, ramas- fue el de mayor rendimiento, y para el mes que se obtuvo menor rendimiento del aceite yació en junio -2011, corteza-, ambos obtenidos de las ramas colectadas, Cuadro 2.

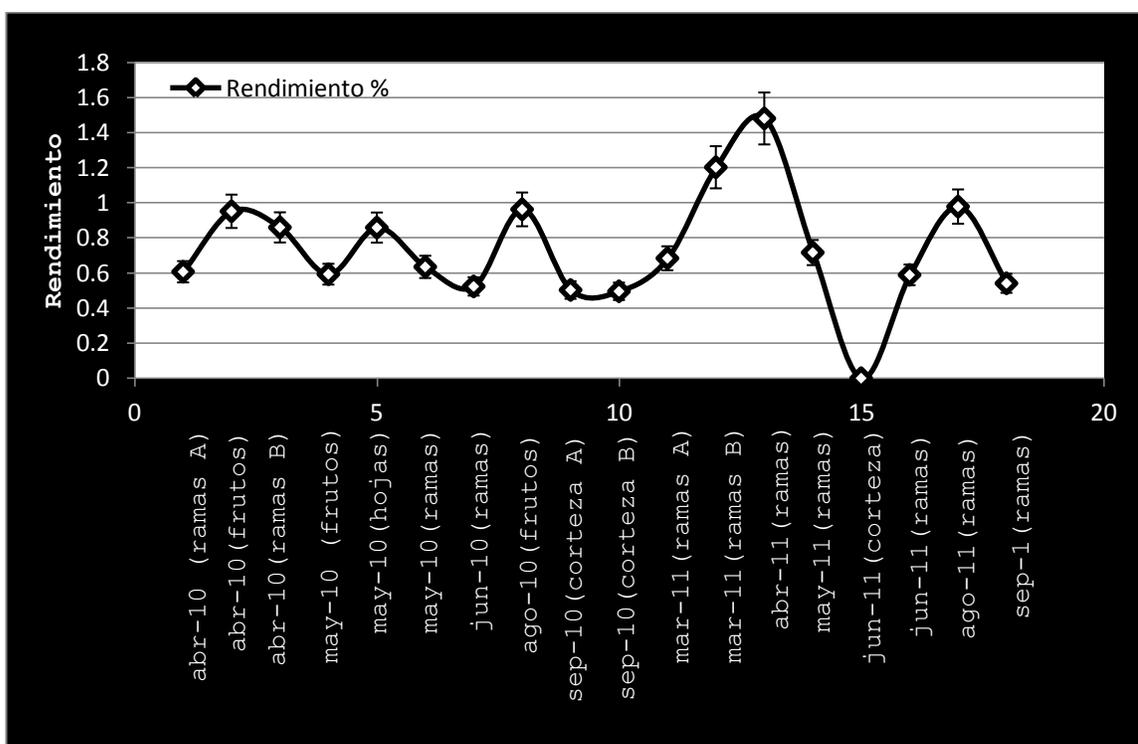


Figura 4. Rendimiento en % de cada mes de colecta.

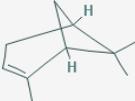
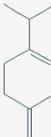
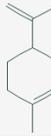
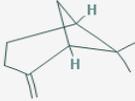
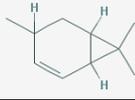
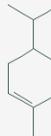
Cuadro 2. Rendimientos de los aceites de *B. fagaroides* en diversos meses de colecta.

Colecta	Rendimiento (g)	Rendimiento %	Densidad (g/mL)
abr-10 (ramas A)	4.8536	0.6067	0.800
abr-10 (fruto)	3.8059	0.9514	0.400
abr-10 (ramas B)	4.4192	0.8596	0.514
may-10 (fruto)	3.7149	0.5928	0.295
may-10 (hojas)	3.7826	0.8585	0.427
may-10 (ramas)	3.6804	0.6345	0.580
jun-10 (ramas)	4.2372	0.5231	0.810
ago-10 (frutos)	4.0422	0.9624	0.420
sep-10 (corteza A)	3.8217	0.5028	0.760
sep-10 (corteza B)	3.9619	0.4952	0.800
mar-11 (ramas A)	2.379	0.6836	0.348
mar-11 (ramas B)	5.8756	1.2025	0.488
abr-11 (ramas)	6.1161	1.4808	0.413
may-11 (ramas)	3.4887	0.7163	0.487
jun-11 (corteza)	0	0	0
jun-11 (ramas)	4.3030	0.5889	0.870
ago-11 (ramas)	5.6747	0.9783	0.580
sep-11 (ramas)	3.20011	0.5408	0.591

A: primera colecta, en los primeros días del mes. B: segunda colecta a mediados del mes.

- ♣ Del aceite del mes de Abril (2010, ramas A) se obtuvo como compuesto de mayor porcentaje al α -pineno y en menor porcentaje a metil valerato, como se observa en el Cuadro 3 dentro de sus 16 compuestos.

Cuadro 3. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Abril-2010 (ramas A).

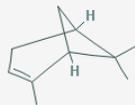
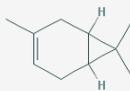
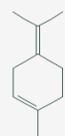
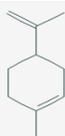
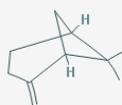
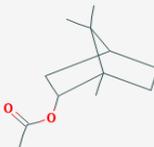
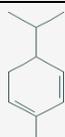
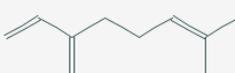
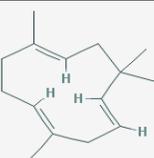
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α -pineno	<u>19.57</u>	3.93	
β -terpineno	14.25	4.35	
limoneno	14.04	4.89	
β -pineno	11.49	4.40	
4- careno	9.30	5.43	
camfeno	7.27	4.11	
acetato de bornilo	5.26	7.07	
α -felandreno	4.93	4.63	

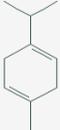
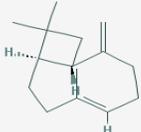
tujeno	2.68	3.83	
γ-terpineno	2.26	5.13	
eudesmenol-11	1.95	9.58	
terpinenol-4	1.73	6.22	
cadina-1 (10) 4-dieno	1.72	8.71	
4-careno	1.32	4.73	
o-cimeno	1.09	4.81	
metil valerato	1.07	5.02	

A: primera colecta, en los primeros días del mes.

- ♣ Dentro del Cuadro 4 se muestran 13 compuestos de los cuales α -pineno tiene el mayor porcentaje dentro de la composición del aceite esencial del mes de Abril (2010, fruto), y por lo contrario, cariofileno representa el menor porcentaje del compuesto del aceite esencial de *B. fagaroides* analizado.

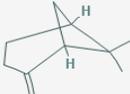
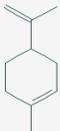
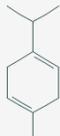
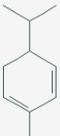
Cuadro 4. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Abril (2010, fruto).

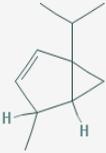
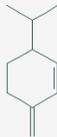
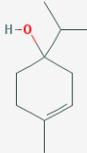
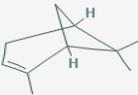
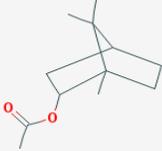
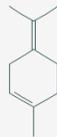
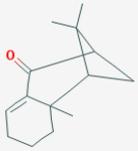
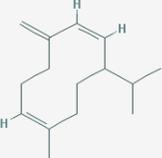
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α -pineno	25.50	3.93	
careno	14.04	4.34	
terpinoleno	10.31	5.43	
limoneno	9.55	4.87	
β -pineno	8.74	4.39	
camfeno	7.34	4.11	
acetato de bornilo	6.78	7.07	
mentadieno	5.72	4.63	
β -mirceno	3.96	4.44	
α -cariofileno	2.55	8.32	
tujeno	2.46	3.84	

γ-terpineno	1.57	5.13	
cariofileno	<u>1.41</u>	8.08	

♣ En el Cuadro 5 se muestran los compuestos identificados del aceite esencial obtenido en el mes de Mayo (2010, fruto), el cual consta de 13 compuestos, siendo β-pineno (27.92 %) el de mayor presencia y con menor presencia germacreno (1.14%).

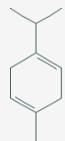
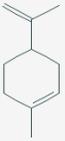
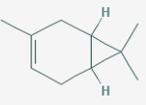
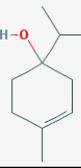
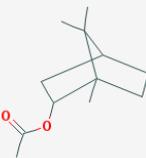
Cuadro 5. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2010, fruto-.

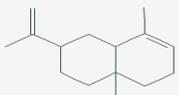
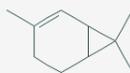
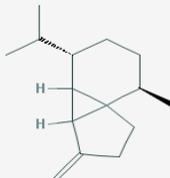
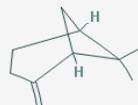
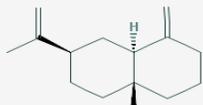
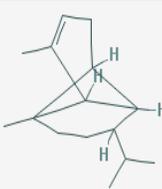
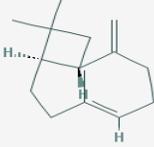
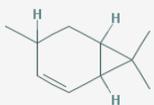
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
β-pineno	<u>27.92</u>	3.98	
limoneno	22.61	4.93	
γ-terpineno	13.93	3.84	
mentadieno	7.46	4.68	

2-tujeno	6.83	4.26	
β -felandreno	6.05	4.38	
camfeno	5.83	4.16	
terpinenol-4	2.13	6.25	
α -pineno	1.77	4.07	
acetato de bornilo	1.54	7.07	
terpinoleno	1.45	5.44	
trimetiltricicloundecano	1.28	8.60	
germacreno	1.14	8.51	

- ♣ Para el Cuadro 6 se tienen los compuestos identificados del mes de Mayo de 2010 -hojas- en donde el compuesto con mayor abundancia es γ -terpineno (24.30%) seguido de limoneno (22.36%) de los 16 compuestos de su totalidad.

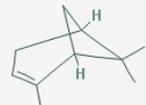
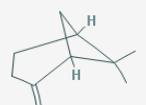
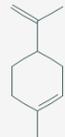
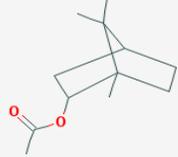
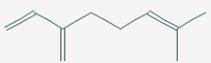
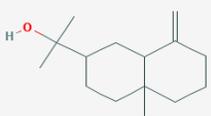
Cuadro 6. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2010, hojas-.

Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
γ -terpineno	<u>24.30</u>	3.96	
limoneno	22.36	4.93	
3-careno	20.53	4.39	
camfeno	4.97	4.14	
terpinenol-4	4.36	6.26	
tujeno	4.31	3.87	
acetato de bornilo	3.18	7.08	

α-selineno	3.07	8.61	
2-careno	2.58	4.77	
linalool	1.89	5.51	
ciclopentabenzeno octahidrometil-3-metileno-4	1.76	8.51	
β-pineno	1.72	4.44	
β-selineno	1.32	8.56	
copaeno	1.30	7.77	
cariofileno	1.14	8.11	
4-careno	1.14	5.43	

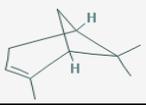
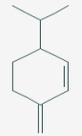
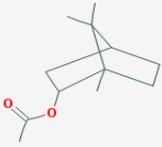
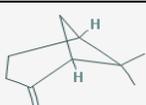
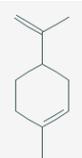
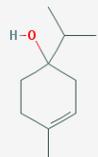
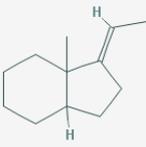
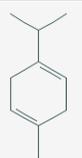
♣ En el aceite esencial correspondiente al mes de Mayo (2010, ramas) se detectaron 8 compuestos, y de estos el mayoritario es α -pineno, y por lado contrario tenemos al eudesmenol-11 que están representados dentro del Cuadro 7.

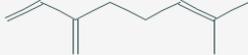
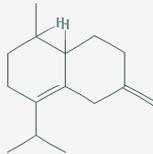
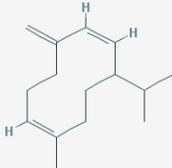
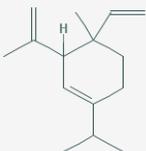
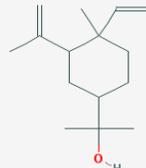
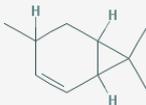
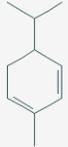
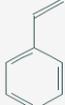
Cuadro 7. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2010, ramas-.

Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α-pineno	48.50	3.93	
β-pineno	13.77	4.38	
Camfeno	8.71	4.11	
limoneno	8.62	4.85	
acetato de bornilo	6.36	7.06	
β-mirceno	5.95	4.44	
sabineno	5.55	4.32	
eudesmenol-11	2.51	9.59	

- ♣ Dentro del Cuadro 8 se tienen representados a 18 compuestos, y de estos el de mayor porcentaje es α -pineno del aceite esencial analizado empleando CG-EM correspondiente al mes de Junio de 2010, ramas.

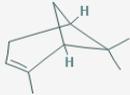
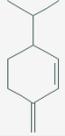
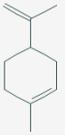
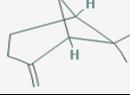
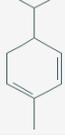
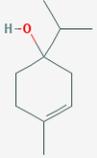
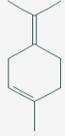
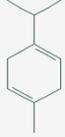
Cuadro 8. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Junio -2010, ramas-.

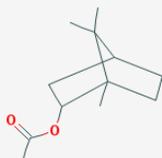
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α -pineno	25.51	3.93	
β -felandreno	14.18	4.34	
acetato de bornilo	7.46	7.07	
β -pineno	7.18	4.41	
limoneno	6.94	4.88	
Camfeno	6.02	4.12	
terpinenol-4	4.47	6.22	
1-Indene, 1-etildeneoctahidro-7-methyl-, cis-	3.95	9.59	
Tujeno	3.25	3.83	
γ -terpineno	3.21	5.13	

β-mirceno	3.14	4.45	
Biciclododeceno-1, 2-isopropil-5-metil-9-metileno	2.62	9.48	
germacreno	2.51	8.48	
Ciclohexene, 4-etenil-4-metil-3-1-(1-metiletil)-, (3R-trans)	2.40	7.45	
2-(4-ethenil-4-metil-3-prop-1-en-2-cicloexil)propan-2-ol	2.11	8.90	
4-careno	1.93	4.73	
α-felandreno	1.73	4.62	
estireno	1.31	3.48	

♣ Dentro del Cuadro 9 se muestra como compuesto mayoritario α -pineno, y al acetato de bornilo como el minoritario dentro de estos 11 compuestos que conforman al aceite esencial del mes de Agosto de 2010 (fruto) analizado.

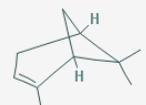
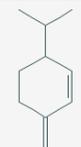
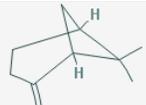
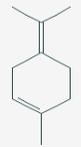
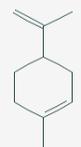
Cuadro 9. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Agosto -2010, fruto-.

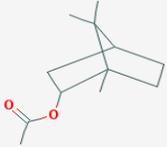
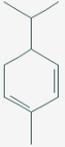
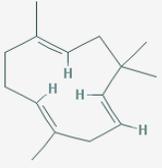
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α -pineno	24.44	3.88	
β -felandreno	23.18	4.32	
limoneno	18.26	4.85	
β -pineno	16.29	4.38	
Camfeno	6.08	4.08	
α -felandreno	5.11	4.60	
Tujeno	1.83	3.82	
terpinenol-4	1.69	6.18	
terpinoleno	1.05	5.38	
γ -terpineno	1.05	5.10	

acetato de bornilo	0.96	7.00	
--------------------	------	------	---

♣ En el Cuadro 10 se muestran los compuestos identificados dentro de este aceite esencial de *B. fagaroides* correspondiente al mes de Septiembre de 2010 -tallos A- y señalando los dos compuestos, el de mayor (α -pineno) y menor (α -cariofileno) porcentaje.

Cuadro 10. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Septiembre -2010, tallos A-.

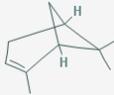
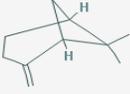
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α -pineno	26.10	3.93	
β -felandreno	15.51	4.34	
β -pineno	11.14	4.39	
terpinoleno	11.05	5.42	
limoneno	10.12	4.86	
camfeno	7.92	4.10	

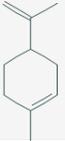
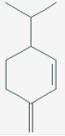
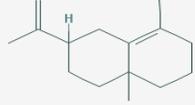
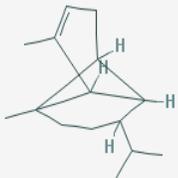
acetato de bornilo	7.01	7.07	
mentadieno	6.17	4.62	
tujeno	2.58	3.83	
α-cariofileno	2.35	8.32	

A: primera colecta, en los primeros días del mes.

- ♣ En el Cuadro 11 se tiene en mayor porcentaje α -pineno, y copaeno en menor porcentaje constituyente del aceite analizado del mes de Septiembre de 2010 -tallos B- dentro de sus 6 compuestos presentes.

Cuadro 11. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Septiembre -2010, tallos B-.

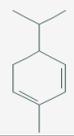
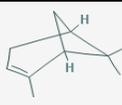
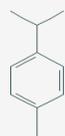
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α-pineno	38.92	3.92	
β-pineno	36.47	4.36	

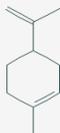
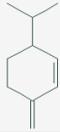
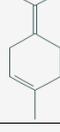
limoneno	12.75	4.84	
β-felandreno	6.84	4.30	
2-isopropenil,8-dimetil octahidronaftaleno	3.04	8.58	
copaeno	1.95	7.75	

B: segunda colecta a mediados del mes.

- ♣ En el Cuadro 12 se muestran 7 compuestos que conforman al aceite esencial del mes de Marzo de 2011 -ramas A- analizado en donde el mentadieno es el de mayor porcentaje (39.85%), pero el β -pineno es el de menor porcentaje.

Cuadro 12. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Marzo -2011, ramas A-.

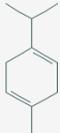
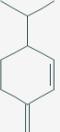
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
mentadieno	39.85	4.64	
α-pineno	27.63	3.96	
cimeno	14.10	4.83	

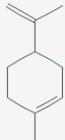
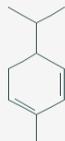
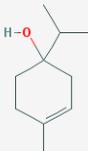
limoneno	7.34	4.87	
β-felandreno	5.01	4.89	
terpinoleno	4.33	5.41	
β-pineno	1.70	4.44	

A: primera colecta, en los primeros días del mes.

- ♣ En el Cuadro 13 se muestran ocho compuestos los cuales conforman al aceite esencial del mes de Marzo (2011, ramas B), siendo γ -terpineno el de mayor abundancia y terpinenol-4 con menor porcentaje en este.

Cuadro 13. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Marzo -2011, ramas B-.

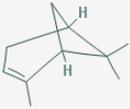
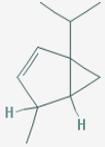
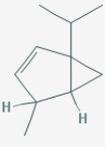
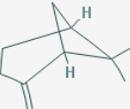
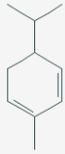
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
γ-terpineno	30.25	3.94	
β-pineno	19.12	4.40	
β-felandreno	17.19	4.35	

Limoneno	16.71	4.88	
Camfeno	6.06	4.11	
α-felandreno	5.53	4.63	
Tujieno	3.21	3.84	
terpinenol-4	1.89	6.20	

B: segunda colecta a mediados del mes.

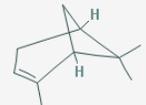
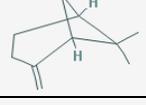
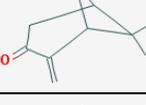
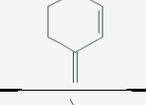
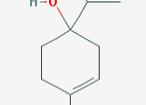
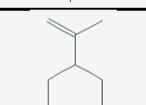
- ♣ Para el aceite esencial analizado por medio de CG-EM correspondiente al mes de Abril de 2011 -ramas- se tienen 5 compuestos, siendo α -pineno el mayoritario (68.01%) y α -felandreno el minoritario como se observan dentro del Cuadro 14.

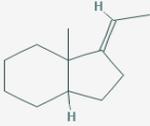
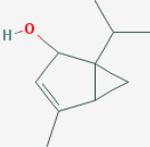
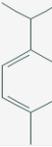
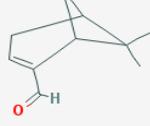
Cuadro 14. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Abril -2011, ramas-.

Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α-pineno	68.01	3.94	
2-tujeno	10.95	4.31	
2-tujeno	8.09	4.86	
β-pineno	8.09	4.36	
α-felandreno	4.84	4.61	

♣ α -pineno (37.58%) es el compuesto de mayor porcentaje dentro de los 16 compuestos que conforman al aceite esencial analizado del mes de Mayo del 2011 -ramas- (Cuadro 15).

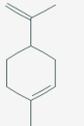
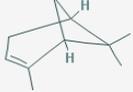
Cuadro 15. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Mayo -2011, ramas-.

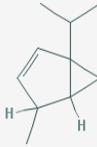
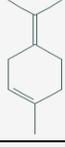
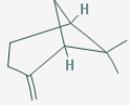
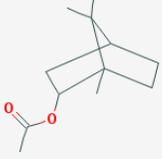
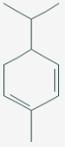
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α -pineno	37.58	3.93	
camfeno	7.30	4.10	
β -pineno	5.50	4.37	
pinocarvone	5.49	6.09	
tujenol-3	5.33	5.90	
acetato de bornilo	4.97	7.01	
α -camfolenal	4.27	5.74	
β -felandreno	3.93	4.31	
terpinenol- 4	3.73	6.19	
limoneno	3.69	4.84	
camfor	3.67	5.95	

1-etileno-7-metiloctahidro-1-indeno	3.50	9.47	
umbellulol	3.39	4.14	
4 -cimeno	2.92	4.80	
mirtenal	2.36	6.37	
4 - isopropeniltolueno	2.27	5.40	

- ♣ De los 8 compuestos que forman parte del aceite esencial que corresponde al mes de Junio de 2011 -ramas- se tuvo al limoneno en mayor porcentaje (43.36%), y en menor porcentaje al mentadieno (Cuadro 16).

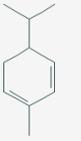
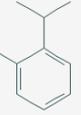
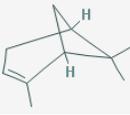
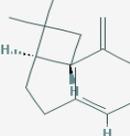
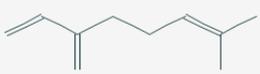
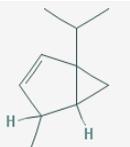
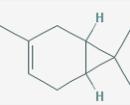
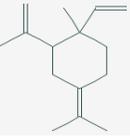
Cuadro 16. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Junio -2011, ramas-.

Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
limoneno	43.36	4.86	
α-pineno	20.94	3.92	

2 -tujeno	10.10	4.30	
terpinoleno	7.49	5.39	
β-pineno	6.69	4.36	
camfeno	5.05	4.08	
acetato de bornilo	3.30	7.04	
mentadieno	3.01	4.60	

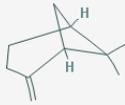
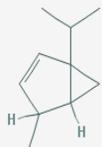
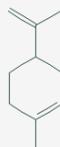
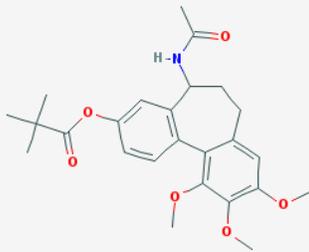
♣ Para el Cuadro 17 se tienen 8 compuestos que conforman al aceite esencial de *Bursera fagaroides* del mes de Agosto de 2011 -ramas- analizado, en donde destaca el α -felandreno como componente mayoritario dentro de este mismo.

Cuadro 17. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Agosto -2011, ramas-.

Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
α-felandreno	41.89	4.61	
o-cimeno	15.90	4.83	
α-pineno	9.59	3.91	
cariofileno	8.67	8.03	
β-mirceno	8.25	4.42	
2- tujeno	7.35	4.29	
Careno	4.97	4.89	
γ-Elemeno	3.35	8.91	

♣ Dentro del Cuadro 18 se muestran 5 compuestos que conforman al aceite esencial de *B. fagaroides* obtenido en el mes de Septiembre de 2011 -ramas-, siendo β -pineno el de mayor presencia con 64.22% y camfeno el de menor.

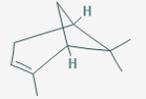
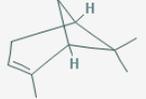
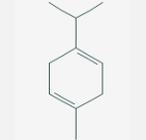
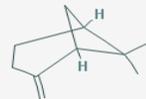
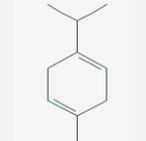
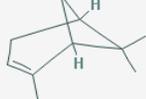
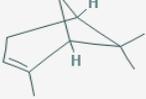
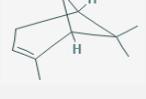
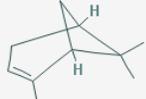
Cuadro 18. Compuestos identificados por medio de CG-EM del mes de Septiembre -2011, ramas-.

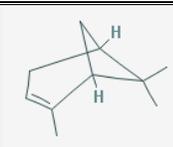
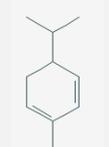
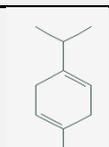
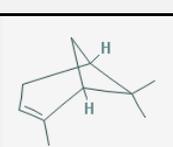
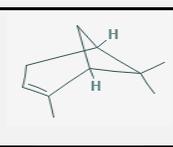
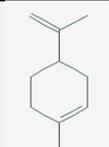
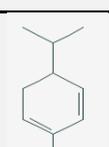
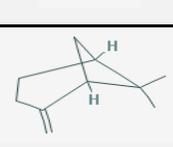
Nombre	Abundancia %	TR (min)	Estructura
β-pineno	64.22	3.95	
2-tujeno	18.54	4.33	
Limoneno	9.94	4.86	
9-o-pivaloil-n-acetilcolchinol	4.39	20.74	
Camfeno	2.88	4.10	

♣ **Composición química principal.**

En el Cuadro 19 se tienen 17 compuestos donde se pueden observar los de mayor abundancia en cada uno de los aceites de *B. fagaroides* identificados por medio de CG-EM por cada uno de los meses muestreados; mientras que en la Cuadro 20 son los de menor abundancia en cada uno de los aceites.

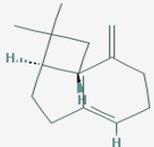
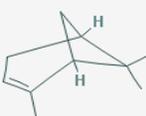
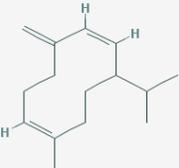
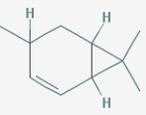
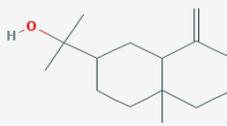
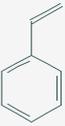
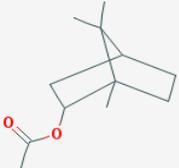
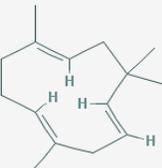
Cuadro 19. Compuestos más abundantes en cada aceite de *Bursera fagaroides* de los diferente meses recolectados.

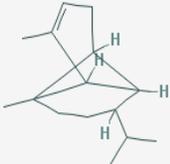
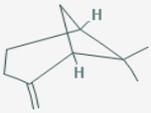
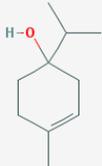
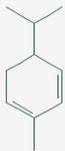
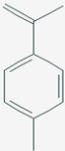
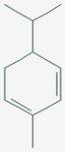
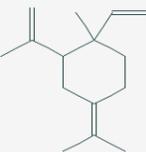
NOMBRE	Abundancia %	TR (min)	ESTRUCTURA
α -pineno [Abril-10, ramas A]	<u>19.57</u>	3.93	
α -pineno [Abril-10, fruto]	<u>25.50</u>	3.93	
γ -terpineno [Abril-10, ramas B]	<u>49.15</u>	3.94	
β -pineno [Mayo-10, fruto]	<u>27.92</u>	3.98	
γ -terpineno [Mayo-10, hojas]	<u>24.30</u>	3.96	
α -pineno [Mayo-10, ramas]	<u>48.50</u>	3.93	
α -pineno [Junio-10, ramas]	<u>25.51</u>	3.93	
α -pineno [Agosto-10, fruto]	<u>24.44</u>	3.88	
α -pineno [Septiembre-10, tallos A]	<u>26.10</u>	3.93	

α-pineno [Septiembre-10, tallos B]	<u>38.92</u>	3.92	
Mentadieno [Marzo-11, ramas A]	<u>39.85</u>	4.64	
γ-terpineno [Marzo-11, ramas B]	<u>30.25</u>	3.94	
α-pineno [Abril-11, ramas]	<u>68.01</u>	3.94	
α-pineno [Mayo-11, ramas]	<u>37.58</u>	3.93	
Limoneno [Junio-11, ramas]	<u>43.36</u>	4.86	
α-felandreno [Agosto-11, ramas]	<u>41.89</u>	4.61	
β-pineno [Septiembre-11, ramas]	<u>64.22</u>	3.95	

♣ Como se mencionó, en el Cuadro 20 tenemos a cada uno de los componentes con menor porcentaje dentro de cada uno de los 17 aceites esenciales analizados de cada uno de los meses en cuestión.

Cuadro 20. Compuestos de menor abundancia en cada aceite de *Bursera fagaroides* de los diferente meses de colecta.

NOMBRE	Abundancia %	TR (min)	ESTRUCTURA
metil valerato [Abril-10, ramas A]	1.07	5.02	
Cariofileno [Abril-10, fruto]	1.41	8.08	
α -pineno [Abril-10, ramas B]	4.25	4.01	
Germacreno [Mayo-10, fruto]	1.14	8.51	
4-careno [Mayo-10, hojas]	1.14	5.43	
eudesmenol-11 [Mayo-10, ramas]	2.51	9.59	
estireno [Junio-10, ramas]	1.31	3.48	
acetato de bornilo [Agosto-10, fruto]	0.96	7.00	
α -cariofileno [Septiembre-10, tallos A]	2.35	8.32	

<p>copaeno [Septiembre-10, tallos B]</p>	1.95	7.75	
<p>β-pineno [Marzo-11, ramas A]</p>	1.70	4.44	
<p>terpinenol-4 [Marzo-11, ramas B]</p>	1.89	6.20	
<p>α-felandreno [Abril-11, ramas]</p>	4.84	4.61	
<p>4 - isopropeniltolueno [Mayo-11, ramas]</p>	2.27	5.40	
<p>mentadieno [Junio-11, ramas]</p>	3.01	4.60	
<p>γ-elemeno [Agosto-11, ramas]</p>	3.35	8.91	
<p>camfeno [Septiembre-11, ramas]</p>	2.88	4.10	

- ♣ Con respecto a los porcentajes de los aceites analizados de los compuestos de mayor y menor abundancia se tiene la figura 5 en la cual se hace énfasis en cada uno.

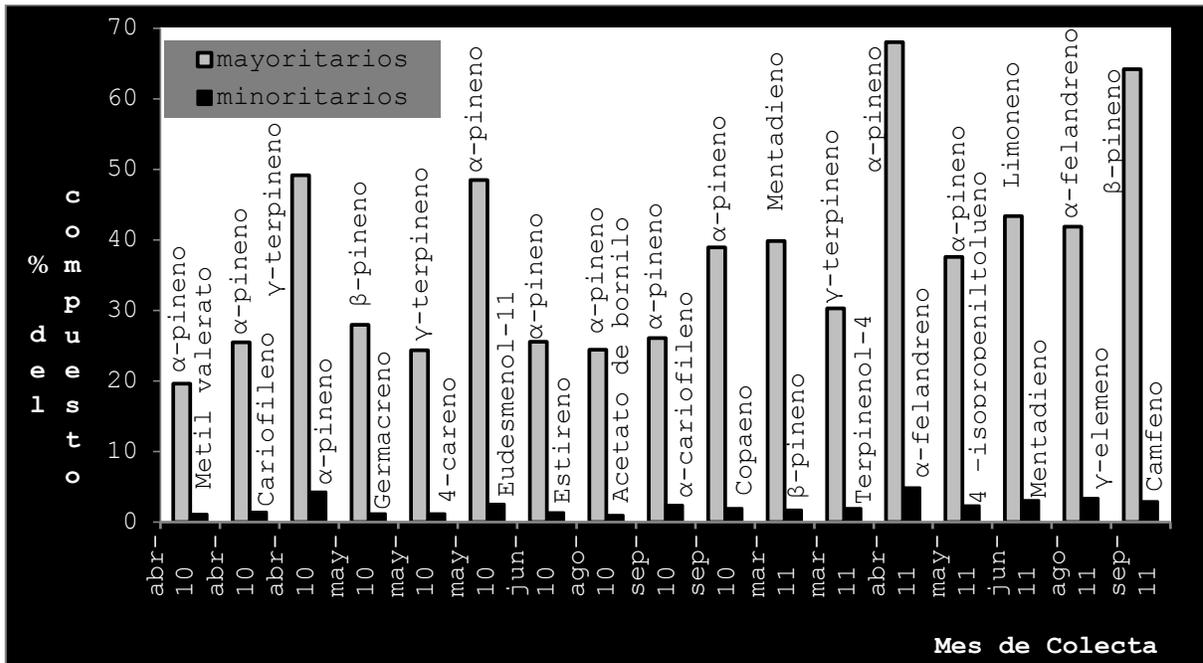
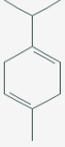
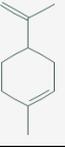
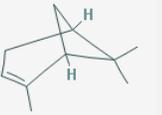
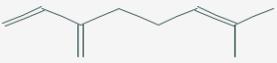
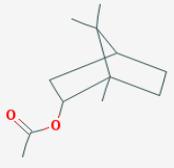
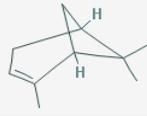


Figura 5. Porcentaje de los compuestos más y menos abundantes.

- ♣ Mientras que en la Cuadro 21 se muestran los compuestos del aceite de *B. fagaroides* empleado para las pruebas antimicrobianas -cualitativas y cuantitativas- e identificados por medio de CG-EM; mostrando su porcentaje (Cuadro 21 y Figura 6) y tiempo de retención de cada uno, en donde γ-terpineno es el de mayor porcentaje y α-pineno el que posee menor porcentaje dentro de este aceite esencial.

Cuadro 21. Compuestos del aceite de *B. fagaroides* (Abril-2010, ramas B) empleado para realizar las pruebas antimicrobianas.

NOMBRE	%	RT	ESTRUCTURA
γ-terpineno	49.15	3.94	
limoneno	9.59	4.86	
camfeno	9.35	4.11	
β-pineno	9.31	4.38	
β-mirceno	6.86	4.44	
sabieno	6.45	4.3293	
acetato de bornilo	4.99	7.06	
α-pineno	4.25	4.01	

B: segunda colecta a mediados del mes.

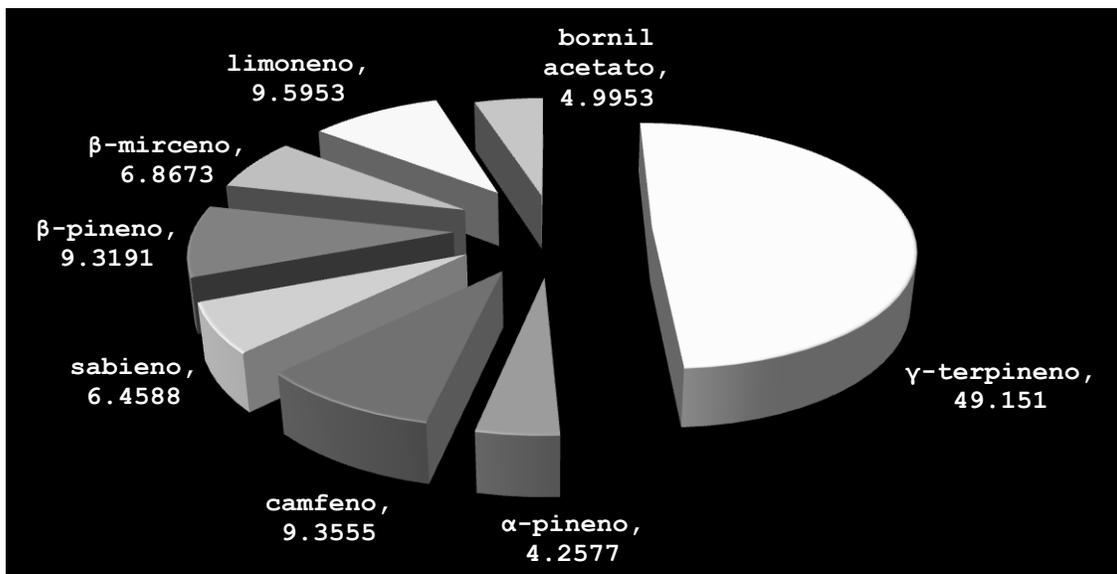


Figura 6. Porcentaje de cada compuesto presentes del total del aceite de *B. fagaroides* empleado en las pruebas antimicrobianas.

♣ **Pruebas cualitativas.** En cuanto a las pruebas cualitativas del aceite esencial probado, se obtuvieron los siguientes datos de los halos de inhibición (Cuadro 22) siendo *Vibrio cholerae* (El Tor) la de mayores halos de inhibición (14.333 ± 1.632), mientras que *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* ATCC 25922, no presentaron inhibición alguna ante el aceite esencial de *B. fagaroides*.

Cuadro 22. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera fagaroides*.

MICROORGANISMOS	Halos (mm)		
	PROMEDIO	±	S
<i>Candida albicans</i> (CUSI)	9.833		0.408
<i>Candida albicans</i> ATCC 10331	9.5		0.547
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	5.666		0.280
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Fes-C	4		0.198
<i>Vibrio cholerae</i> (El Tor)	14.333		1.632
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.833		0.283
<i>S. typhimurium</i>	0		0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0		0

♣ **Pruebas cuantitativas.** Mientras que para las pruebas cuantitativas se obtuvieron las CMI (concentración mínima inhibitoria) y CBM (concentración bactericida mínima) para las bacterias, en donde la que mostró mayor resistencia fue *Vibrio cholerae* (El Tor) con CMI de 8 mg/mL y CBM >8 mg/mL seguida de *Escherichia coli* ATCC 25922 con CMI de 7 mg/mL y CBM de 8 mg/mL (Cuadro 23).

Cuadro 23. CMI y CBM del aceite esencial de *B. fagaroides* ante seis cepas bacterianas.

Especie bacteriana	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	8
<i>Salmonella typhimurium</i>	5	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	6	8
<i>Vibrio cholerae</i> (El Tor)	8	>8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7	8

- ♣ En cuanto al efecto del aceite esencial de *B. fagaroides* sobre la cinética bacteriana en donde se empleó *Staphylococcus epidermidis*, se puede notar que no se encuentra una diferencia tan marcada en su comportamiento para la obtención de CBM, MIC y $\frac{1}{2}$ MIC, como se representa en la Figura 7.

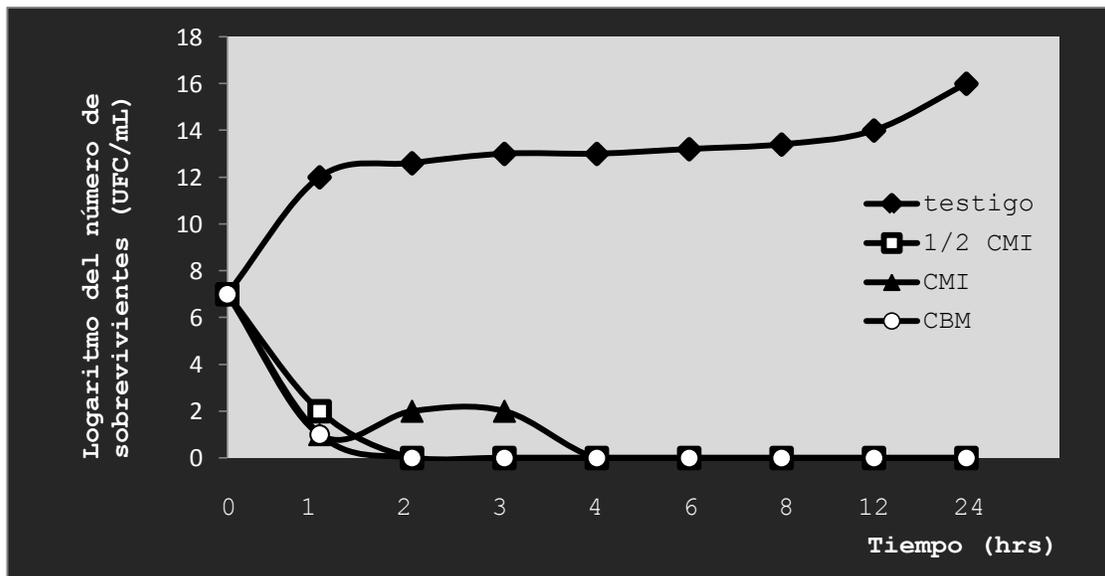


Figura 7. Efecto del aceite esencial sobre la curva de crecimiento bacteriano de *Staphylococcus epidermidis*.

- ♣ Comportamiento de *Candida albicans* ATCC 10231 en donde se observa una disminución de las colonias a partir de la concentración de 4 mg/mL con 85.1%, 99.6% en la concentración de 5 mg/mL y las siguientes de 99.8% de inhibición de forma contundente dentro de las 24hrs, Figura 8.

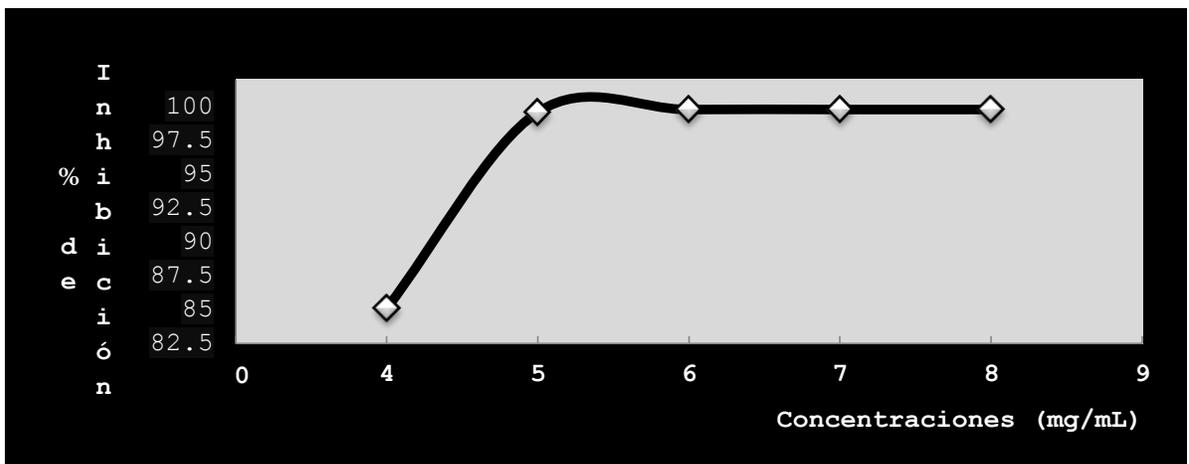


Figura 8. Porcentaje de inhibición de *Candida albicans* (ATCC 10231) a 24 hrs.

♣ La Figura 9 muestra las imágenes de la interacción entre *Candida albicans* ATCC 10231 y el aceite esencial de *Bursera fagaroides* del mes de abril en una concentración de 4 mg/mL en comparación con el testigo después de 24 hrs. de cultivo.

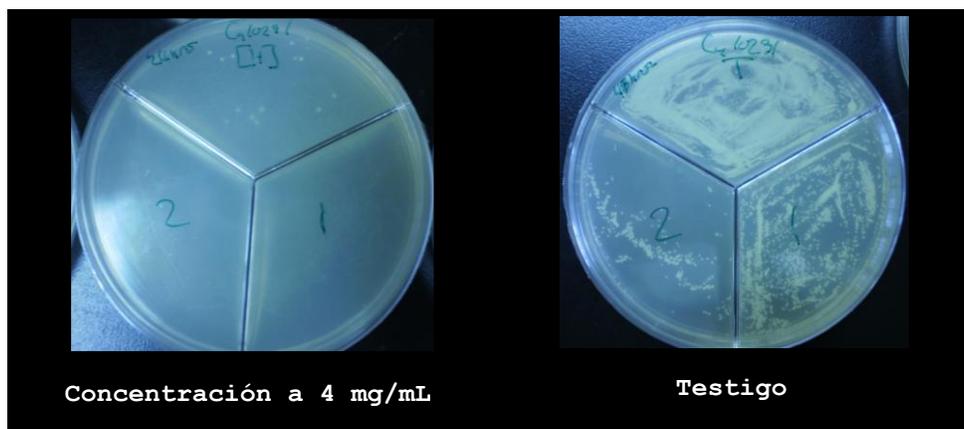


Figura 9. Comportamiento de *Candida albicans* (ATCC 10231) y el Testigo.

- ♣ En la figura 10 se tienen los resultados de la actividad del aceite esencial de *B. fagaroides* sobre *Candida albicans* ATCC 10231 en un periodo de 48 hrs, en concentraciones que van de 4 mg/mL a 8 mg/mL, y se puede observar que a una concentración de 4 mg/mL ya se ha dado más del 90% de inhibición, y a partir de la concentración de 6 mg/mL se ha inhibido más del 95% de la muestra de levadura.

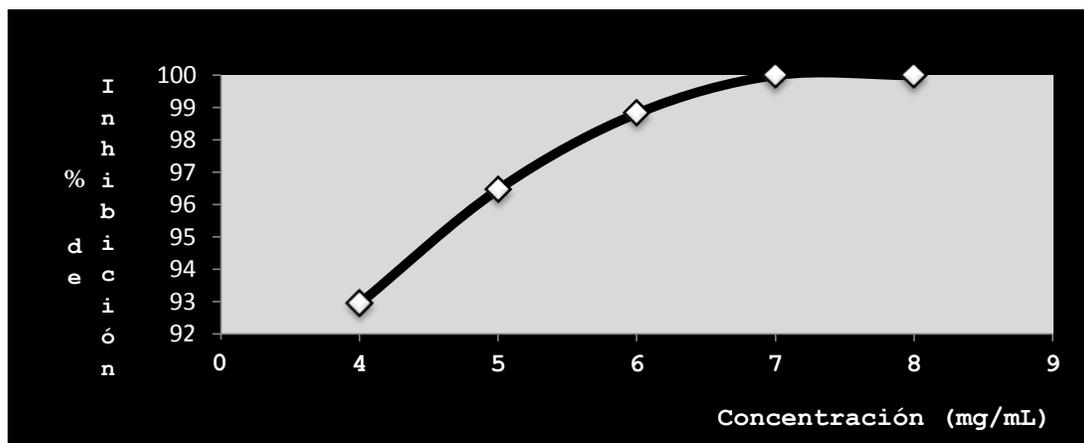


Figura 10. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *C. albicans* (ATCC 10231) en 48 hrs.

- ♣ En cuanto a la figura 11 se observa el porcentaje de inhibición de *Candida albicans* —aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala— ante concentraciones de 0.5 a 8 mg/mL, durante un periodo de 24 hrs por parte del aceite empleado de *Bursera fagaroides*.

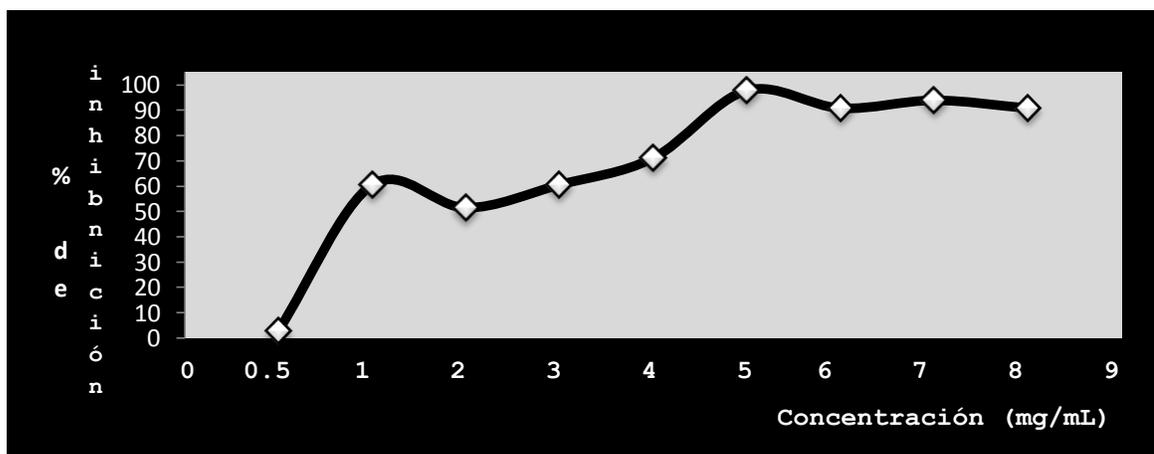


Figura 11. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *C. albicans* -CUSI- en 24 hrs.

- ♣ Mientras que en la figura 12 tenemos los datos con respecto a *Candida albicans* —aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala— ante concentraciones de 0.5 mg/mL a 8 mg/mL, durante un periodo de 48 hrs, en donde se observa un 100% de inhibición a partir de una concentración de 8 mg/mL.

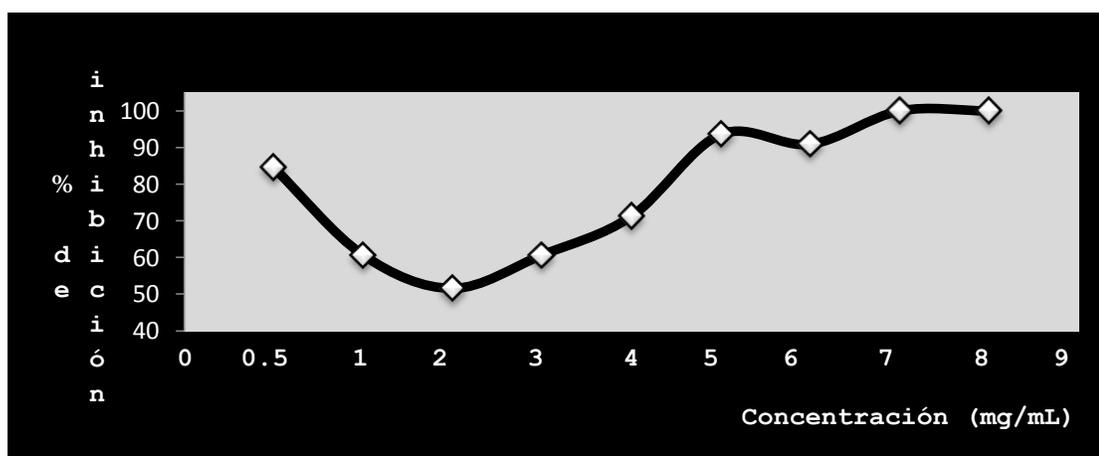


Figura 12. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *C. albicans* -CUSI- en 48 hrs.

- ♣ La figura 13 corresponde a la conducta de *Candida tropicalis* -donada por el hospital Los Ángeles- ante el aceite esencial de *Bursera fagaroides* a concentraciones de 3 mg/mL a 8 mg/mL en un periodo de 24 horas en donde tenemos un 100% de inhibición.

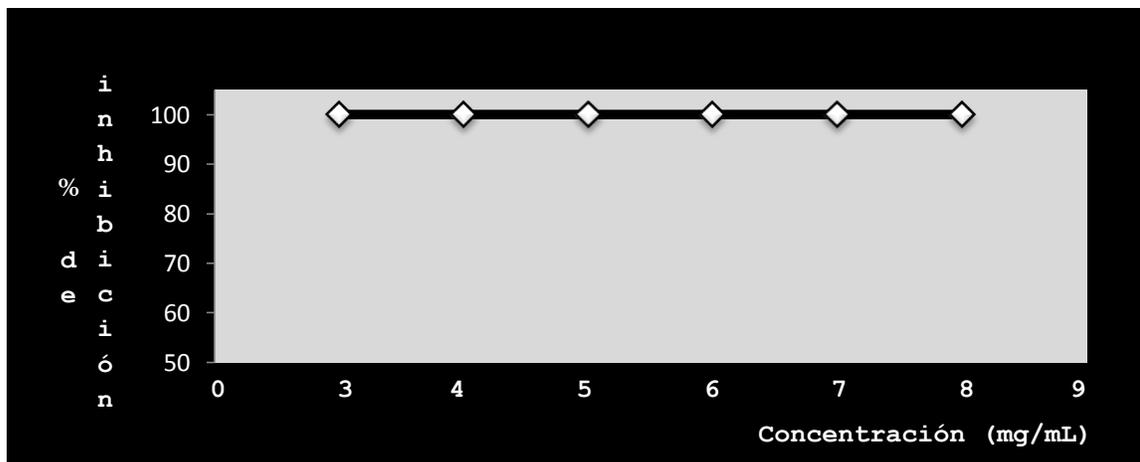


Figura 13. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *Candida tropicalis* en 24 hrs.

- ♣ Se observa el aumento de *Candida tropicalis* en un periodo de 48 horas al emplear el aceite de *B. fagaroides* a concentraciones que van de 3 mg/mL a 8 mg/mL, siendo de 100% la inhibición a partir de la concentración no. 5 (mg/mL), teniendo en cuenta el porcentaje del control negativo que fue de 27.19% (Figura 14).

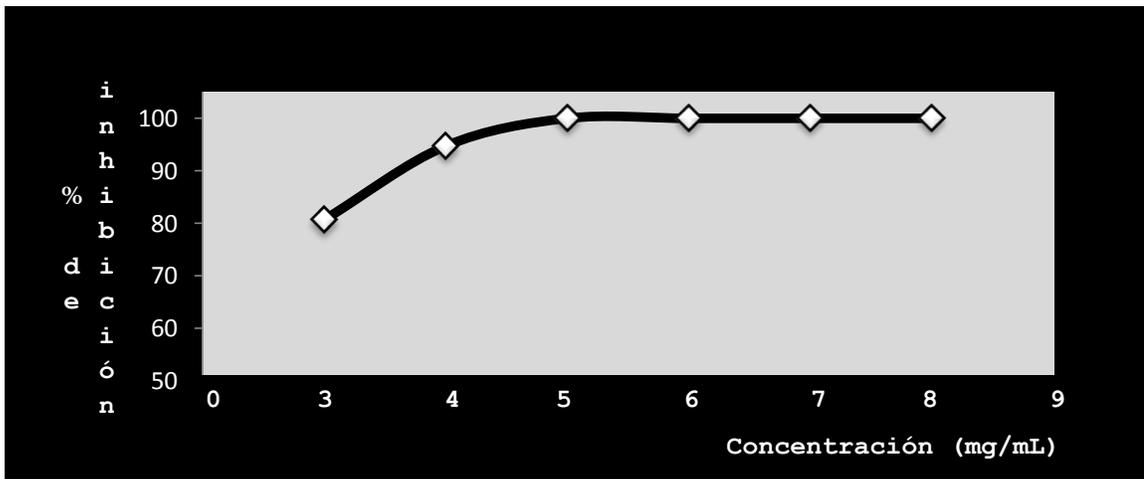


Figura 14. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *Candida tropicalis* en 48 hrs.

♣ En la figura 15 tenemos a las concentraciones empleadas de *Bursera fagaroides* ante *Candida albicans* ATCC 14065 durante las primeras 24 horas de su porcentaje de inhibición.

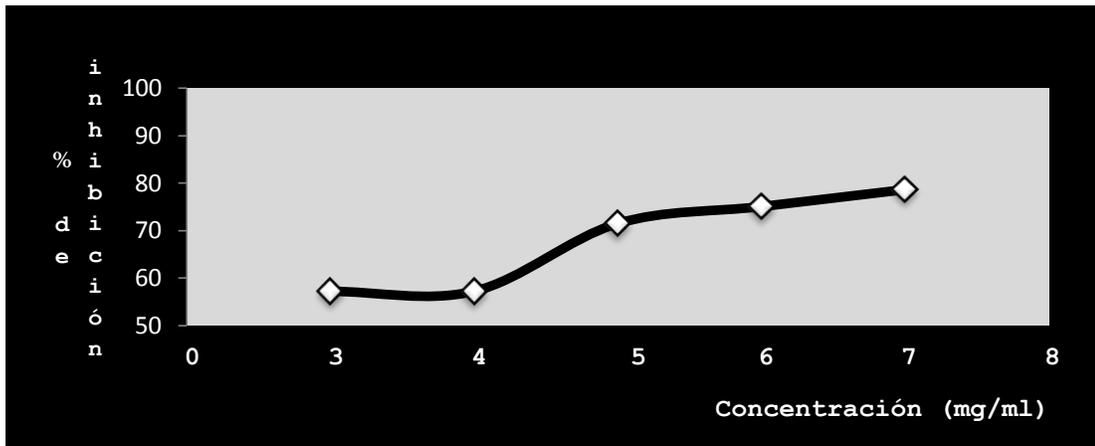


Figura 15. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *Candida albicans* ATCC 14065 en 24 hrs.

- ♣ Respecto al porcentaje de inhibición de *Candida albicans* ATCC 14065 en un periodo de 48 hrs frente al aceite esencial empleado de *Bursera fagaroides* tenemos como referencia al control negativo con 32.14% de inhibición en comparación con el primer dato de inhibición con 82.14% seguido de 89.28%; en adelante todos presentaron un 100% de inhibición (Figura 16).

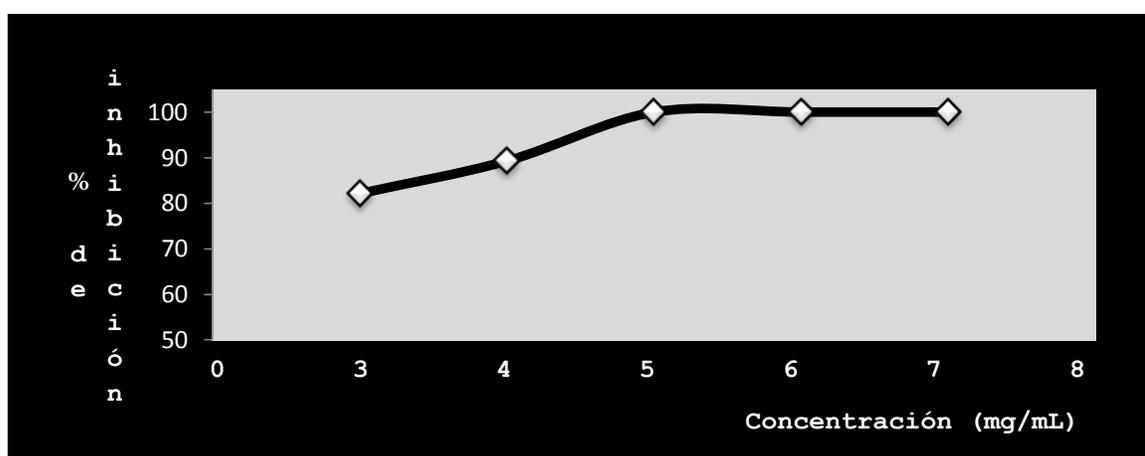


Figura 16. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *Candida albicans* ATCC 14065 en 48 hrs.

- ♣ La figura 17 representa los datos de inhibición obtenidos de *Candida glabrata* -donada por el hospital Los Ángeles- ante el aceite esencial empleado de *Bursera fagaroides* dentro de las primeras 24 horas, los cuales fueron de 100%.

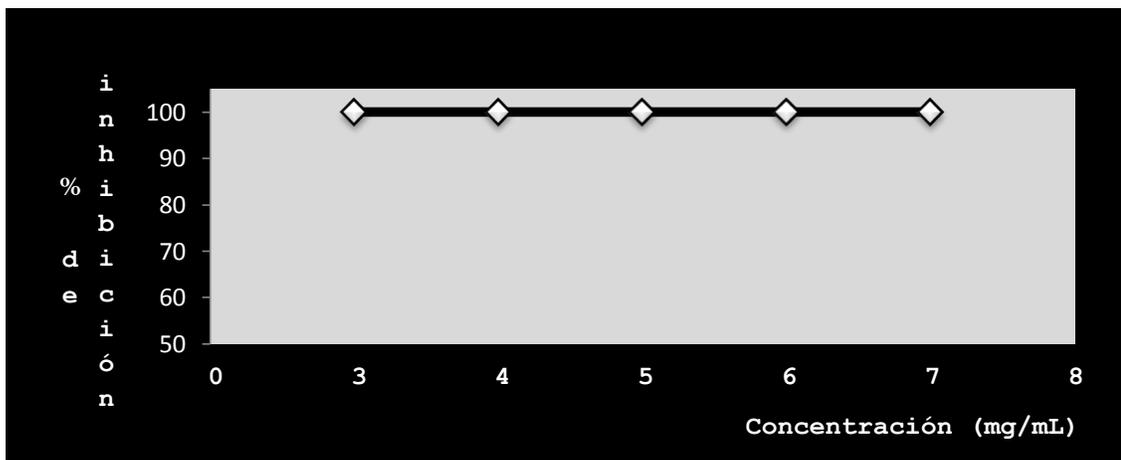


Figura 17. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *Candida glabrata* en 24 hrs.

- ♣ Los datos que se muestran en la figura 18 son con respecto a *Candida glabrata* dentro de 48 horas ante concentraciones que van de 3 mg/mL a 7 mg/mL que muestran una inhibición del 100%.

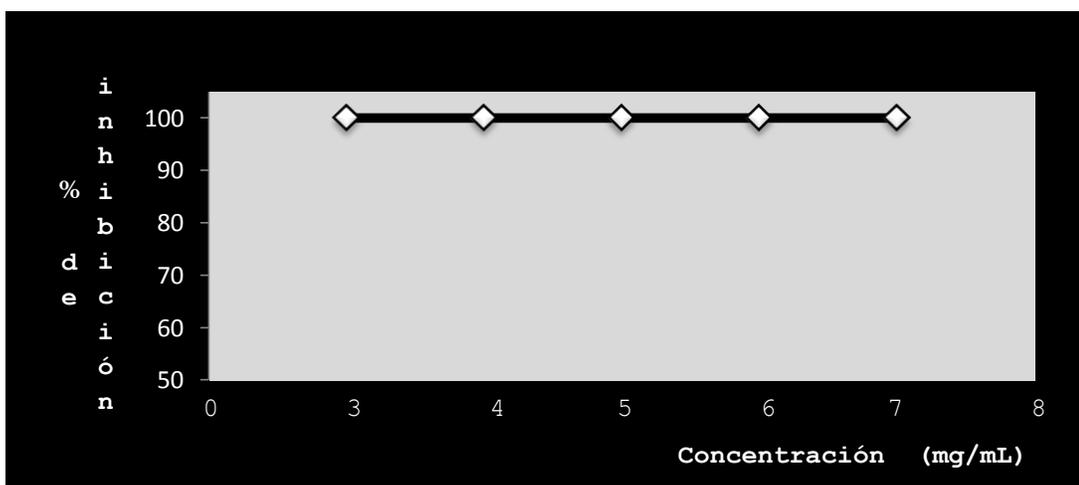


Figura 18. Actividad del aceite de *B. fagaroides* sobre *Candida glabrata* en 48 hrs.

♣ **Hongos filamentosos.** Para la actividad antifúngica del aceite esencial de *Bursera fagaroides* ante las cepas de hongos filamentosos, sólo dos (*Trichophyton mentagrophytes* (CDBB-H-1112) y *Fusarium moniliforme*) mostraron una ligera inhibición en la prueba cualitativa, mientras que *Aspergillus niger* (CDBB-H-179) se descartó por la resistencia mostrada claramente.

Mientras tanto, en la prueba cuantitativa a las concentraciones ensayadas, ninguna de las dos cepas (*Trichophyton mentagrophytes* (CDBB-H-1112) y *Fusarium moniliforme*) mostraron sensibilidad.

DISCUSIÓN

Los aceites esenciales son en lo general mezclas complejas de varias sustancias (metabolitos secundarios), y su síntesis en las plantas es afectada por el medio externo de manera cualitativa y cuantitativa (Vargas y Bottia, 2008); y estos aceites esenciales se pueden obtener de especies como son las del género *Bursera*, los cuales tienen terpenoides que proporcionan aromas intensos y variados.

Respecto a México se conocen cerca de 80 especies que pertenecen al género *Bursera*, la mayoría de las cuales se encuentran distribuidas en la vertiente del Pacífico que comprende los estados de Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Colima y Sinaloa, también crecen en algunos estados colindantes como el Estado de México, Puebla, Morelos, Hidalgo, Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí. De los cuales el estado de Guerrero tiene la mayor diversidad de especies, y el estado de Michoacán el cual cuenta con varias especies endémicas (Hernández et al., 2002). Con mayor concentración en la cuenca del río Balsas, el conocimiento es escaso y dista aún mucho de ser satisfactorio (Rzedowski et al., 2004). Por ello, he ahí la importancia de este trabajo, en donde no sólo hace falta el estudio de la distribución de *Bursera fagaroides*, sino se le suma una gran falta de información con respecto a estudios sobre su composición y pruebas de laboratorio diversas que avalen las sapiencias etnobotánicas.

Un ejemplo de la insipiente información es que *Bursera aptera* a menudo se confunde con *Bursera fagaroides*, sobre todo cuando las plantas no tienen hojas en pleno desarrolladas debido a que las dos especies presentan la corteza amarillenta exfoliante en láminas grandes y a que sus foliolos se parecen en las primeras etapas de desarrollo. Cuando hay hojas maduras, se tiene la facilidad de reconocerle debido a que *B. aptera* carece de raquis alado, tiene mayor número de foliolos y su fruto es marcadamente apiculado. Esta similitud llevó a Bullock a considerar a *Bursera aptera* como sinónimo taxonómico de *Bursera fagaroides*, pero autores posteriores reivindicaron a la primera como especie independiente al igual que *Bursera ariensis*, la cual formo parte del complejo de *B. fagaroides* (Rzedowski et al., 2004).

En el caso del género *Bursera* que es característico y diverso de la flora de una parte de México se puede afirmar que su comprensión es incompleta (Rzedowski et al., 2005).

Aunado a lo anterior, la sistemática del género *Bursera* es compleja y no se conoce bien la distribución de algunas de sus especies ni los factores que la determinan (Rzedowski et al., 2005). Caso concreto es *Bursera fagaroides*, que posee una menor especificidad climática y presenta un amplio intervalo de valores y distribución; como en el caso del estado de Morelos. Gran parte de esto nos indica el adjudicar la correlación de condiciones bioedafoclimáticas en rigor de las características de las colectas en donde impera un alto porcentaje de aceite esencial por parte de ramas y corteza, y a menor medida el aceite esencial extraído de los frutos, además de destacar que en todos estos es altamente asiduo el α -pineno, exceptuando la colecta de junio -2011, corteza- de la cual no se obtuvo aceite esencial (Hernández et al., 2011).

Con respecto a la composición química, en la mayoría de los aceites esenciales obtenidos por el método de hidrodestilación y analizados por medio de CG-EM de *Bursera fagaroides* se observó, en este caso, terpenos como α -pineno seguido de γ -terpineno y limoneno, en cuanto a porcentaje mayoritario en cada aceite, como lo reportado por Leyva en el 2007.

Referido a Moreno (2010) quien trabajó con *B. tomentosa*, reporta 28 compuestos y entre ellos tenemos cadinol, ocimeno, elemeno, germacreno-D, entre otros; y para Manzano et al., (2009) en lo respectivo al trabajo sobre la composición química del aceite esencial de *Bursera graveolens* se encontraron 11 componentes como son α -copaeno, limoneno, naftaleno, α -cadinol, etc. Y en cuestión del aceite esencial de *Bursera fagaroides* empleado durante las pruebas, tanto cualitativas como cuantitativas, tenemos a ocho compuestos, como son bornil acetato, limoneno, β -mirceno, β -pineno, sabieno, camfeno, α -pineno y γ -terpineno; en comparación con los resultados obtenidos por parte de trabajos de López en el 2011, quien trabajó con *Bursera morelensis* y registró 30 compuestos en total de una muestra de aceite, en la cual destacan en porcentaje 5 compuestos (α -pineno, α -felandreno, o-cimeno, β -felandreno e isocariofileno) los cuales presentan un registró en *B. fagaroides*. A diferencia de lo encontrado en el aceite esencial de *Bursera arida* que presentó cariofileno, α -pineno, α -felandreno y γ -terpineno sin excepción en todos sus aceites analizados (Rojas, 2012); y α -pineno, α -felandreno y nonano en la mayoría de sus aceites analizados de *Bursera schlechtendalii* por medio de CG-EM (Espinosa, 2012). Además de tener en cuenta que la producción y almacenamiento del aceite esencial viene determinado tanto por condiciones ambientales como fenológico y estado de desarrollo, en donde el rendimiento refleja una época de recolección, como lo son los

componentes identificados en un aceite esencial en donde un ejemplo es la cantidad del α -pineno, siendo este minoritario con el incremento de la edad.

Respecto a la actividad antimicrobiana se tiene el comportamiento de seis especies bacterianas probadas, de éstas, la que requirió de mayores concentraciones para presentar cierto grado de inhibición fue *Vibrio cholerae* (Tor) con CMI de 8 mg/mL y CBM >8 mg/mL seguida de *Escherichia coli* ATCC 25922 con CMI de 7 mg/mL y CBM de 8 mg/mL (Cuadro 23), lo que da que pensar debido a la mención por parte de algunos autores en donde reportan un excelente comportamiento por parte de los aceites esenciales de naturaleza terpénica (también llamadas isoprenoides o isopentanoïdes) que muestra actividad sobre bacterias Gram positivas como Gram negativas (Kamatou et al., 2005; Maguna et al., 2006; Brahmachari, 2009). Este tipo de comportamiento de la membrana citoplasmática con respecto a la pared celular pueden ser alteradas en su estructura debido a diversos componentes de los aceites esenciales (Sikkema et al., 1994; Helander et al., 1998; Ultee et al., 2000; Ultee et al., 2002; Di Pasqua et al., 2006; Turina et al., 2006) en donde se ha reportado que la permeabilidad y rompimiento de la membrana celular, pérdida de iones, reducción del potencial de membrana y funcionalidad del ATP son originadas por el contacto con algunos aceites esenciales (Gustafson et al., 1998; Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001).

Pero de una manera muy contrastante están las diferentes especies de *Candida*, las cuales sus niveles de inhibición fueron contundentes ante las concentraciones probadas del aceite esencial de *Bursera fagaroides* -abril 2010, ramas B- las cuales rondaron entre concentraciones de 3 mg/mL y 5 mg/mL para un descenso en las UFC (unidades formadoras de colonia). Cabe aclarar que este aceite fue empleado porque fue una de las primeras muestras obtenidas con un rendimiento adecuado que garantizó alcanzar para todos los ensayos realizados.

A pesar de estos datos, no se cuenta en la bibliografía, con datos en específico sobre esta especie en cuanto a sus efectos sobre diversas especies de *Candida* para poder comparar a mayores rasgos, uno de los pocos es por parte de Queiroga et al., (2007) donde evaluaron la actividad del aceite esencial de *Bursera aloexylon* ante diversas especies microbianas como lo es *Candida albicans* ATCC 10231, pero sin resultados aparentes. En cambio en los trabajos realizados por Rojas (2012) y Espinosa (2012), en el primero reporta una inhibición de *Candida albicans* (CUSI) por parte del aceite esencial de *Bursera arida* de la colecta del mes de Octubre (2010) en su evaluación cualitativa; en el segundo trabajo el aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* presentó inhibición principalmente ante *Candida albicans* y *Candida glabrata* de sus ocho cepas levaduriformes. Todo esto no implica que se puedan ingerir los aceites esenciales de una forma oral, debido a que muchos de ellos tienen cierta toxicidad conocida debido y gracias a referencias de investigaciones previas.

Al contrario si se tienen reportes sobre la actividad de *Bursera fagaroides* con respecto del modelo de linfoma Murino en ratones por parte de su extracto acuoso (Reynoso et al., 2008), o el de Rosas en el 2008, donde se nos da a saber los efectos del extracto etanólico de *B. fagaroides* sobre

Entamoeba histolytica de forma *in vitro*. Y en otros trabajos previos se ha demostrado tanto el α -pineno, limoneno, entre otros, afectan la actividad respiratoria de mitocondrias en raíces de maíz y soya; sin embargo, el mecanismo del β -pineno induce interferencia en mitocondrias de ratas, y para el β -mirceno se ha reportado su actividad inhibitoria antimicrobiana además de ser empleado en la industria de la perfumería del tipo estética como industrial y como parte de aditivos en saborizantes (Abraham et al., 2003; Muroi et al., 1993).

Con respecto a los hongos filamentosos, un punto para "descartar" la actividad antifúngica de estas concentraciones empleadas del aceite esencial de *Bursera fagaroides* ante *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Fusarium moniliforme* se dio al observar los nulos efectos que se obtuvieron sobre el desarrollo fúngico, de los cuales se tiene una dificultad para su inhibición, como lo reporta López (2006), el cual empleó aceite esencial de *Origanum vulgare*, *Aloysia triphilla* o también conocido como cedrón, entre otros dos y estos no observaron efectos sobre el desarrollo fúngico a bajas concentraciones, pero al emplear concentraciones de 200 $\mu\text{L/L}$ se tenía un 25% de reducción y cuando quisieron obtener una reducción de alrededor de un 50% se dio en concentraciones mayores de hasta 1000 $\mu\text{L/L}$ ante *Fusarium verticillioides*, de lo cual, nos dice todo esto es que en el caso de *Bursera fagaroides* podría ser un caso similar ante el cual nos topamos y debido a sus componentes similares como son terpineol, mircenona, alcanfor, germacreno-D, γ -terpineno y limoneno, entre otros, podríamos irnos por ese camino de emplear sus concentraciones similares y métodos para ver qué

resultados obtendríamos (López, 2006; Kazemi et al., 2012; García et al., 2000). En el caso de Espinosa (2012), reporta no tener inhibición por parte del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* ante las seis especies probadas de hongos filamentosos. Por caso contrario el aceite esencial de *Bursera arida* presentó actividad sobre cuatro cepas (*Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Fusarium sporotrichoides*), y con CFM mayores a 4.0 mg/mL (Rojas, 2012).

CONCLUSIONES

Se puede constatar que a pesar de la variación de meses de los aceites analizados hay una fuerte presencia del compuesto α -pineno, conjuntamente de ser el de mayor abundancia porcentual, seguido de γ -terpineno y limoneno, además de variar de mes en mes y también de la parte empleada para la extracción del aceite esencial. En cuanto a la más alta actividad inhibitoria fue de parte de las ocho candidas empleadas para los ensayos; caso contrario fueron los hongos filamentosos, los cuales presentaron resistencia ante las concentraciones de aceite de *Bursera fagaroides* aplicado.

PERSPECTIVAS

En lo referente a los aspectos a considerar a futuro se tendría la evaluación del aceite de *B. fagaroides* ante *Artemia salina* para realizar pruebas de toxicidad, aunque no es una prueba directa de mutagenicidad -en este caso se emplearía *Drosophila melanogaster*-, es utilizable como referencia para elaborar un examen más apropiado.

Así mismo evaluar y comprobar la actividad antibacteriana de todas las muestras obtenidas con la finalidad de determinar la parte empleada de *Bursera fagaroides* y el mes donde se generan los compuestos con mayor actividad.

Además ayudarían futuros estudios de modelación del nicho climático de las especies, junto con evidencias experimentales de intensidades de cosechas ante variaciones ambientales controladas -incremento de la temperatura, reducción de la precipitación y aumento de la estacionalidad-, permitirán predecir su abundancia y la sustentabilidad de su aprovechamiento.

APÉNDICE 1

♣ Descripción - Especie: *Bursera fagaroides* -

Se distribuyen principalmente en las áreas tropicales del mundo. En zonas tropicales de América hay 295 especies. Sus ejemplares se distinguen por tener resina, en general aromática y a menudo de aceite esencial (Elia, 2011). Son árboles o arbustos dioicos o a veces hermafroditas, de 0.5 a 8 m de alto, glabro, ramillas jóvenes con abundante resina transparente poco aromática; tronco hasta de 30 cm de diámetro, con corteza externa exfoliante en láminas delgadas de color amarillo grisáceo, las capas internas a menudo verde-azulosas a glaucas, látex blanquecino o amarillento; hojas imparipinnadas (excepcionalmente trifolioladas o simples), peciolo de 0.5 a 2.5 cm de largo, raquis con alas inconspicuas, con 3 a 5 pares de folíolos, sésiles o subsésiles excepto a veces el terminal, que puede llevar un peciólulo hasta de 1 cm de largo, de forma elíptica, oblonga a obovada o suborbicular, de 1 a 3.5 cm de largo y de 1 a 2 cm de ancho, aumentando de tamaño hacia el extremo distal de la hoja, ápice obtuso a agudo, base cuneada, pero a veces obtusa o redondeada, borde entero, crenado o serrado, de textura membranácea firme, la nervadura central conspicua en el envés, por lo general amarillenta, las laterales más o menos 6 pares, más débilmente marcadas; catáfilos morenos, inconspicuos, pronto decíduos; las flores generalmente solitarias o a veces agrupadas en inflorescencias cortas, aglomeradas densamente en las puntas de ramillas cortas; flores masculinas pentámeras, algunas veces trímeras o tetrámeras, lóbulos del cáliz angostamente triangulares, agudos, glandular dentados, verdes con tintes rojizos, de 1 a 2 mm de largo, pétalos verdosos a

blanco amarillentos, oblongos a oblongo-oblancoados, de 3 a 6 mm de largo, cuculados, ápice incurvado, reflejos en la madurez, estambres subiguales, filamentos de 1 mm de largo, anteras oblongas, de 1.5 mm de largo, disco verde, glutinoso; las flores femeninas similares en forma y tamaño, casi siempre trímeras, estaminodios de 1 mm de largo, ovario trilobular, estigmas 3; infructescencia con pedúnculos cortos de 1 a varios frutos, pedúnculos del fruto de 0.5 a 3 mm de largo, algo incurvados y engrosados, fruto trivalvado, obovoide a subesférico, cortamente apiculado, rojizo, de 0.5 a 0.8 cm de largo, el hueso recubierto totalmente por un pseudoarilo rojizo a amarillento en la madurez y forma una drupa (Elia, 2011).

Familia de unos 20 géneros y más de 600 especies, distribuidas en las regiones calientes del mundo, con mayor diversidad en América tropical, en el norte y en el sur de África y en Malasia (Andrés & Espinosa, 2002 y Elia, 2011).

CLAVE PARA DETERMINACIÓN DE ESPECIES (Elia, 2011).

- 1 Hojas bipinnadas..... *B. bipinnata*
- 1 Hojas pinnadas o trifolioladas.
 - 2 Fruto trivalvado; flores trímeras, tetrámeras o pentámeras; corteza externa del tronco exfoliante.
 - 3 Folíolos de hojas maduras de menos de 2.5 cm de largo; corteza externa del tronco amarillenta..... ***B. fagaroides***
 - 3 Folíolos de hojas maduras de más de 2.5 cm de largo; corteza externa del tronco roja, anaranjada, pardo-rojiza a rojizo-amarillenta.
 - 4 Folíolos 9 a 11, de margen entero.....*B. roseana*
 - 4 Folíolos 17 a 23, de margen serrado.....*B. multijuga*
 - 2 Fruto bivalvado; flores tetrámeras; corteza externa del tronco no exfoliante.

TAXONOMIA: Dominio: Eukaryota.
 Reino: Plantae.
 Subreino: Tracheobionta.
 División: Magnoliophyta.
 Clase: Magnoliopsida.
 Subclase: Rosidae.
 Orden: Sapindales / Bursales.
 Familia: Burseraceae.
 Género: *Bursera*.
 Especie: *Bursera fagaroides*.

Cuadro 24. Características generales de *Bursera fagaroides*.

Hojas:	Imparipinnadas, con cinco o siete folíolos alternos, los cuales son angostamente lanceolados. La cara superior es rugosa, con las nervaduras unidas, y la inferior es densamente tomentosa con las nervaduras prominentes.
Flor:	Actinomorfa. Panículas de color verde.
Fruto:	El fruto es una drupa.
Aspectos ecológicos:	Los frutos son dispersados por las aves.
Fenología:	Florece de mayo a julio y fructifica de julio a agosto.
Recomendaciones:	Aunque las semillas se producen desde

para su
propagación:

noviembre a diciembre hasta mayo-junio, se recomienda colectarlas desde enero o marzo, dependiendo de las épocas de lluvias del año anterior. Se deben tomar a partir de frutos maduros colectados directamente de la planta, dejando secar naturalmente para que solos abran y poder extraer la semilla. Las semillas bien limpias y secas se pueden almacenar en refrigeración por un año.



Figura 19. Ejemplar vivo y completo de *Bursera fagaroides*.



Figura 20. Ejemplar de *Bursera fagaroides* conservado por método de prensado. A. ramas con frutos; B. frutos; C. corteza (Elia, 2011).

APÉNDICE 2

♣ Zona de colecta



Figura 21. Ubicación de Coxcatlán, Puebla. Tomado de <http://www.maplandia.com/mexico/puebla/>

♦ Localidad.

La especie *Bursera fagaroides* se colectó en la localidad de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla (población: 19,639/año 2010) (INEGI. 2010), que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre $18^{\circ}12'$ y $18^{\circ}14'$ de latitud norte, así como $97^{\circ}07'$ y $97^{\circ}09'$ de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 21 y 22).

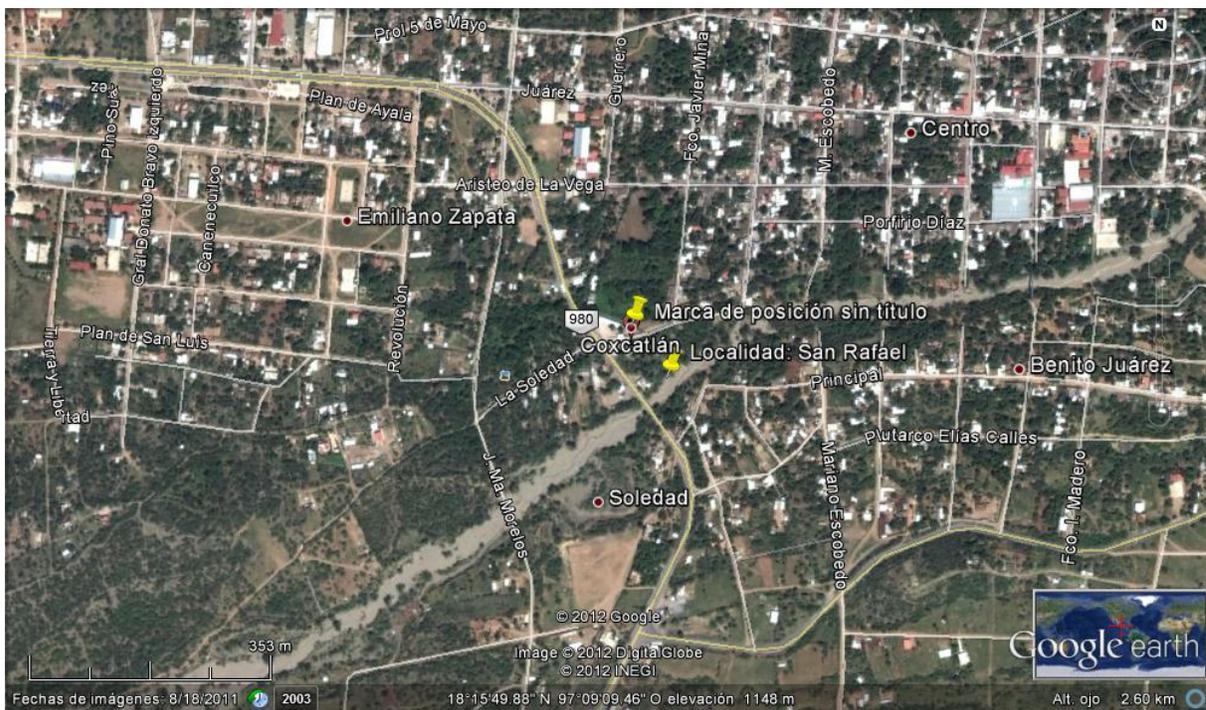


Figura 22. Ubicación de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tomado de <http://www.google.com/intl/es/earth/>. [2012].

◆ Clima.

El clima es de tipo Bs (h') w'' (w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García, M. E. (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.

Al sureste de Puebla se encuentra 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 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: 1°- Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones). 2°- 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. 3°- Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* (Ramírez), *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal. 4°- 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 fructicosa*. 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 por *Sanvitalia fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), 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 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 localidad de San Rafael se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 258 habitantes (129 hombres y 129 mujeres) (INEGI, 2010). La mayoría 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 caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

APÉNDICE 3

- ♣ Método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Van den Berghe y Vlietnick, 1991).

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

- ◆ Medio de cultivo: para los ensayos con las cepas fúngicas (candidas) se recurre al agar PDA como medio de cultivo, 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 No. 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 (5 μ L) por disco.
- ◆ Control positivo: se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos para la bacteria con 25 μ g/disco de cloranfenicol y para las levaduras con 25 μ g/disco 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 por 24 hrs.

APÉNDICE 4

- ♣ Método de dilución en caldo (Koneman, 1985); determinaciones de la CMI, CBM y CFM.
- ◆ Preparación de reactivos y diluciones: se prepara una suspensión de 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 dextrosa Sabouraud (levaduras) o Müeller-Hinton (bacterias), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se preparan diluyendo el aceite en frascos con 10 mL de caldo dextrosa Sabouraud (levaduras) y Müeller-Hinton (bacteria), según las concentraciones deseadas. Previamente el caldo se esteriliza en frascos con tapa de rosca, además de todo el material a emplear. Se coloca la cantidad necesaria del aceite para obtener la concentración requerida y de realizar las diluciones requeridas. Después de mezclar bien el contenido se transfiere a una caja de Petri.
- ◆ Inoculación e incubación de los frascos y tubos: se prepara un inóculo que contiene aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo (estándar de turbidez: estándar 0,5 de MacFarland). Incubar los frascos a 36 °C de 24 a 48 hrs, ya sea correspondiente a bacteria o levadura. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo; 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, produciéndose un botón violeta en

el fondo del tubo. Donde no hay desarrollo de levaduras o de las bacterias, la solución permanece clara.

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

En aquellas cajas en donde se observa una nula progresión 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).

APÉNDICE 5

- ♣ ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO (Muroi et al., 1993).
- ◆ Preparación de medios y diluciones: se prepara un tubo por lo menos para cada una de las concentraciones a evaluar del aceite esencial (1/2 MIC, MIC, CBM), para el muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después durante dos horas, durante 5 hrs y finalmente a las 12 y 24 hrs; además de preparar y rotular un control positivo y uno negativo. Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 microorganismos/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo dextrosa Sabouraud (levaduras) y Müeller-Hinton (bacterias).
- ◆ Inoculación e incubación: se inocula con ayuda de una micropipeta 100 μ L de la suspensión de microorganismos en los tubos que contendrán el aceite esencial, estos tendrán la concentración de CMI y sus múltiplos medios; esto es, la mitad del CMI y CBM. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 microorganismos/ mL de caldo en cada tubo. Se incuba en una estufa sin presión de CO₂.
- ◆ Interpretación de resultados: se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las "Y" contra el tiempo de incubación del eje de las "X", para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de los microorganismos, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis et al., 1996).

APÉNDICE 6

♣ INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL (Wang y Bun, 2002).

- ◆ Método Cualitativo: el ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas Petri que contengan entre 20 mL de agar de papa dextrosa (PDA) junto con el aceite (técnica de dilución en agar), en el cual se coloca un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan las cajas a reposo por 72 hrs: Incubación: Las cajas 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 7 µg/disco de Ketoconazol.
- ◆ Interpretación de resultados: en el caso de existir zonas de inhibición se reporta como activo -en este caso el aceite-, en todos los casos esta prueba se hace con sus respectivas repeticiones.
- ◆ Método Cuantitativo: el ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas Petri en donde se realizará la colocación del aceite en concentraciones requeridas. Las cajas son incubadas a 23 °C durante 72 hrs hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado, además de su control positivo.
- ◆ 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; mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF₅₀. El cálculo de la CF₅₀ se realiza con un modelo matemático.

REFERENCIAS

1. Abraham D., Francischini A. C., Pergo E. M., Kelmer-Bracht A. M. y Ishii-Iwamoto E. L. 2003. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. Brazil. Plant Physiology and Biochemistry 41, 985-991.
2. Andrés H. A. R. y Espinosa O. D. 2002. Morfología de plántulas de *Bursera jacq.* Ex L. (*Burseraceae*) y sus Implicaciones Filogenéticas. Boletín de la Sociedad Botánica de México 70, 5-12.
3. Arias T. A. A., Valverde V. M. T. y Reyes S. J. 2000. Las plantas de la Región de Zapotitlán Salinas, Puebla. México. Instituto Nacional de Ecología. Red para el Desarrollo Sostenible, A. C. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado el 28 de Julio de 2012 en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/download/335.pdf>
4. Brahmachari G. 2009. Natural Products: Chemistry, Biochemistry and Pharmacology. Alpha Science International LTD. India. 822 pp.
5. Cortez G. V., Macedo C. J. P., Hernández A. M., Arteaga A. G., Espinosa G. D. y Rodríguez L. J. F. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. UADY: Revista Biomédica - Historia de la medicina 15: 123-136.

6. Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R. y Wyllie S. G. 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170-175.
7. Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H.N y Ginsberg H. S. 1996. *Tratado de Microbiología*. 4ª edición. Editorial Masson, S. A. Barcelona. 1559 pp.
8. Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G. y Mauriello G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 54, 2745-2749.
9. Elia de la Cerda-Lemus M. 2011. La Familia Burseraceae en el Estado de Aguascalientes, México. *Acta Botánica Mexicana* 94, 1-25.
10. Espinosa E. L. 2012. Estudio comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* Engler. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 71 pp.
11. Fernández B. Ma. N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 98 pp.
12. García M. E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3ª ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 252 pp.

13. García M. R., Soto H. M. y Martínez V. M. 2000. Toxicidad de los Extractos de las Semillas de *Erythrina americana*. *Ciencia Ergo Sum*, Julio, vol. 7 no. 2. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. pp. 166-170.
14. Gustafson J. E., Liew Y. C., Chew S., Markham J. L., Bell H. C., Wyllie S. G. y Warmington J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26, 194-198.
15. Helander I. M., Alakomi H. L., Latva K. K., Mattila S. T., Pol I., Smid E. J., Gorris L. G. M. y Von W. A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46, 3590-3595.
16. Hernández D. J., García L., Hernández A., Alvarez R. y Román L. U. 2002. Glicósidos de luteolina y miricetina de Burseraceae. *Journal of the Mexican Chemical Society*, vol. 46, 295-300.
17. Hernández P. E., González E. M., Trejo I. y Bonfil C. 2011. Distribución del género *Bursera* en el estado de Morelos, México y su relación con el clima. *Revista Mexicana de Biodiversidad* no. 82: 964-976.
18. INEGI. 2010. Catálogo de localidades. Consultado el 17 de Septiembre de 2011 en: <http://mapserver.inegi.org.mx/>
19. Kamatou G. P., Viljoen A. M., Gono B. A. B., van Zyl R. L., van Vuuren S. F., Lourens A. C, Başer K. H, Demirci B., Lindsey K. L., van Staden J. y Steenkamp P. 2005. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical

investigation of three South African *Salvia* species. Journal of Ethnopharmacology 102, 382-390.

20. Kazemi M., Rostami H. y Ameri A. 2012. The Study of Compositions and Antimicrobial Properties of Essential Oil of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* on Human Pathogens. Current Research in Bacteriology, 5:1-12.
21. Koneman W. E. 1985. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 439 pp.
22. Leyva M. A., Martínez J. R. y Stashenko E. E. 2007. Composición Química del Aceite Esencial de Hojas y Tallos de *Bursera graveolens* (Burseraceae). Scientia et Technica Año XIII 33, 201-202.
23. López A. G. 2006. Regulación de Componentes de Aceites Esenciales sobre la Toxicogénesis de *Fusarium verticillioides*: Efectos "in vitro" de los aceites esenciales sobre el desarrollo de *Fusarium verticillioides* en un modelo bidimensional semicuantitativo. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA). Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. España. 11/36-43 pp. Consultado el 25 de Julio de 2012 en:
http://www.efn.uncor.edu/archivos/doctorado_cs_ing/
24. López H. L. R. 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 64 pp.

25. Maguna F. P., Romero A. M., Garro O. A. y Okulik N. B., 2006. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Resumen E: 057 No. 355. Argentina. Universidad Nacional del Noreste.
26. Manzano S. P., Miranda M., Gutiérrez Y., García G., Orellana T. y Orellana A. 2009. Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (palo santo) de Ecuador. Revista Cubana de Plantas Medicinales 14, 45-53.
27. Martínez G. M., Valencia Á. S. y Calónico S. J. 1997. Flora de Papalutla, Guerrero y de sus alrededores. Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Bot. 68(2), 107-133.
28. Medina S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Lic. Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 1-6, 35 pp.
29. Moreno J., Rojas L. B., Aparicio R., Marcó L-M. y Usubillaga A. 2010. Composición Química del Aceite Esencial de la Corteza de *Bursera tomentosa* (Burseraceae) (Jacq) Tr & Planch. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, Chile. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 9, 491-494.
30. Muroi H., Kubo A. y Kubo I. 1993. Antimicrobial Activity of Cashew Apple Flavor Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41, 1106-1109.

31. Queiroga C. L., Teixeira D. M. C., Baesa R. B. y Melillo de M. P. 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia* 78, 327-328.
32. Reynoso O. R., Delgado S. J. I., Puebla P. A. M., Calvo M. C., Carr D., Velázquez M. S. y Santerre A. 2008. Difluorometil Ornitina y el Extracto Acuoso de *Bursera fagaroides* en el Modelo de Linfoma Murino L5178Y en Ratones Balb/c: comparación de su efecto en el metabolismo de las poliaminas. *Revista de Salud Animal* 30, 128-132.
33. Rojas S. B. 2012. Variación temporal en la composición química del aceite esencial de *Bursera arida* (Rose) Standl., y variación de su actividad antimicrobiana. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 67 pp.
34. Rosas A. P., Arteaga N. P., Reynoso O. R., Villagómez C. J. C., sabanero L. M., Puebla P. A. M. y Calvo M. C. 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extracto n ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 119, 398-402.
35. Rosas L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 94 pp.
36. Rzedowski J., Medina L. R. y Calderón R. G. 2004. Las Especies de *Bursera* (Burseraceae) en la Cuenca Superior del Río Papaloapan, México. *Acta Botánica Mexicana*, número 66, 23-155.

37. 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.
38. Salcedo-Sánchez B. 1997. Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. 6-10 pp.
39. Sikkema J., De Bont J. A. M. y Poolman B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269, 8022-8028.
40. Turina A. V., Nolan M. V., Zygadlo J. A. y Perillo M. A. 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry* 122, 101-113.
41. Ultee A., Bennik M. H. y Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1561-1568.
42. Ultee A., Kets E. P., Alberda M., Hoekstra F. A. y Smid E. J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174, 233-238.
43. Valiente-Banuet A., Alcantara A., Dávila P., Flores-Hernández N., Arismendi M. C., Ortega-Ramírez J. y Soriano J. A. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 67, 25-75.

44. Valiente B. L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis. UNAM. México. 65 pp.
45. Van den Berghe D. A. y Vlietnick A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. *Methods in plant Biochemistry* 6, 47-69 pp.
46. 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 Del Peñon-Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
47. Wang H. y Bun T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61, 1-6.