

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE  
DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS USADAS EN MEDICINA  
TRADICIONAL**

Por

Q.F.B. LAURA GUERRA BOONE

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación terminal en  
Química Biomédica.

Septiembre , 2011

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE  
DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS USADAS EN MEDICINA  
TRADICIONAL**

Aprobación de la tesis:



---

**Dr. C. Luis Alejandro Pérez López**

Director de la tesis



---

**Dra. C. Rocío Álvarez Román**

Co-Director de la tesis



---

**Dr. C. Ricardo Salazar Aranda**

Co-Director de la tesis



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE  
DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS USADAS EN MEDICINA  
TRADICIONAL**

Aprobación de la tesis:



---

**Dr. C. Luis Alejandro Pérez López**

Director de la tesis



---

**Dra. C. Rocío Álvarez Román**

Co-Director de la tesis



---

**Dr. C. Ricardo Salazar Aranda**

Co-Director de la tesis



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE  
DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS USADAS EN MEDICINA  
TRADICIONAL**

Presentado por:

**Q.F.B. Laura Guerra Boone**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica y en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Luis Alejandro Pérez López y Co-dirección de la Dra. Rocío Álvarez Román y el Dr. Ricardo Salazar Aranda.

Director



---

**Dr. Luis Alejandro Pérez López**

Director de la tesis

Co-Directora



---

**Dra. Rocío Álvarez Román**

Co- Directora de la tesis

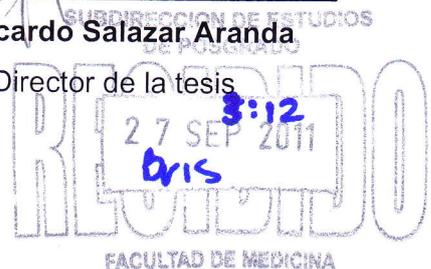
Co-Director



---

**Dr. Ricardo Salazar Aranda**

Co- Director de la tesis



## RESUMEN

Nombre: Laura Guerra Boone

Fecha de Graduación: Octubre 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS USADAS EN MEDICINA TRADICIONAL.**

Número de páginas: 120

Candidato a obtener el título de Maestro en Ciencias con orientación en Química Biomédica.

Área de Estudio: Química Analítica

**Propósito y Método del Estudio:** Las infecciones dermatológicas a pesar de poseer una baja tasa de mortalidad en comparación con otras infecciones, son de las más frecuentes en nuestro país. El uso desmedido de antimicrobianos para tratar estas infecciones genera una alza en la resistencia por parte bacterias y hongos. La creciente resistencia a antimicrobianos ha propiciado la búsqueda de alternativas terapéuticas que inhiban los mecanismos de resistencia de los microorganismos. Los productos naturales como los aceites esenciales son una excelente opción para este fin. Existen investigaciones científicas que reportan las propiedades antisépticas, antimicrobianas y antioxidantes de los aceites, lo que les permite ser capaces de inhibir el crecimiento microbiano de patógenos causantes de infecciones en piel y propiciar la regeneración celular en heridas causadas por éstas afecciones dermatológicas por su actividad antioxidante.

En el presente trabajo se propuso caracterizar los aceites esenciales de las plantas: *Magnolia grandiflora*, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis*, *Chrisactinia mexicana* Gray y *Schinus molle*. Se evaluó la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATTC 12598, *Staphylococcus aureus* IMSS/HE 25:01 y *Streptococcus pyogenes*. Se determinó la actividad antifúngica contra *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epydermophyton floccosum*, agentes etiológicos de infecciones dermatológicas y además se evaluó su actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH.

### Contribuciones y Conclusiones:

Se obtuvieron 12 aceites esenciales a partir de 6 plantas. Se identificó un 85-90 % de los componentes de cada uno de los aceites esenciales. De estos componentes, en su mayoría (90%) fueron monoterpenos y sesquiterpenos. La actividad antioxidante de los aceites esenciales fue baja en general ( $CE_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ). Los aceites esenciales que presentaron mayor actividad antibacteriana y actividad antifúngica fueron los aceites de *Thymus vulgaris* y *Origanum majorana*. Cabe destacar que no existían reportes de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum majorana* contra 6 cepas de dermatofitos y para *Thymus vulgaris* existen reportes sólo para algunos dermatofitos. Los aceites esenciales que resultaron con actividad antimicrobiana, tuvieron un mayor porcentaje de componentes monoterpénicos. Esta investigación contribuye con la caracterización química y actividad biológica de los aceites esenciales de plantas del noreste de México usadas en la medicina tradicional.

Director de Tesis

---

Dr.C. Luis Alejandro Pérez López

# ÍNDICE

Capítulo	Título	Página
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1.1	Enfermedades infecciosas	1
1.2	Infecciones dermatológicas	2
1.3	Tratamiento para las afecciones dermatológicas	4
1.4	Resistencia al tratamiento dermatológico	6
1.5	Plantas en la medicina tradicional	7
1.6	Aceites esenciales	8
1.7	Propiedades biológicas de aceites esenciales de plantas	10
	Actividad antibacteriana	10
	Actividad antifúngica	13
	Actividad antioxidante	14
1.8	Antecedentes	16
1.9	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	21
1.10	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	22
1.11	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	22

## 2

## MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Material, equipos y reactivos	23
2.1.1	Material	23
2.1.2	Equipos	23
2.1.3	Reactivos	24
2.1.4	Material biológico	24
2.2	Colecta de plantas	26
2.3	Obtención del aceite	26
2.4	Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y por cromatografía de gases con detector de ionización a la flama	27
2.5	Evaluación de la actividad antioxidante por la técnica DPPH	31
2.6	Evaluación de la actividad antimicrobiana	32
	Preparación de controles	32
	Preparación de inóculos de microorganismos	32
	Preparación de soluciones de aceites	33
	Técnica de dilución en placa	33
2.7	Evaluación de la actividad antimicótica	34
	Prueba preliminar: Prueba de susceptibilidad antifúngica por difusión en placa con microcultivo	35

Experimento 1: Prueba de susceptibilidad antifúngica por difusión en placa con disco.	35
Experimento 2: Prueba de susceptibilidad antifúngica por difusión en placa con crecimiento previo de 24 h.	37
Experimento 3: Prueba de susceptibilidad antifúngica por difusión en placa con pozo.	37
Experimento 4: Prueba de susceptibilidad antifúngica por inhibición de crecimiento por compuestos volátiles.	38

### 3

## RESULTADOS

3.1	Colecta de plantas	39
3.2	Obtención de aceites esenciales	40
3.3	Análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y por cromatografía de gases con detector de ionización a la flama	41
3.4	Evaluación de la actividad antioxidante	65
3.5	Evaluación de la actividad antibacteriana	66
3.6	Evaluación de la actividad antifúngica	67

<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	
4.1	Obtención de aceites esenciales de plantas por hidrodestilación	71
4.2	Caracterización química de los componentes principales de aceites esenciales mediante cromatografía de gases acoplado a masas y cromatografía de gases con detector de ionización a la flama	72
4.3	Determinación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales por la técnica DPPH	77
4.4	Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales: Actividad antibacteriana	80
4.5	Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales: Actividad antifúngica	85
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	90
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	92
<b>7</b>	<b>BIBIOLGRAFÍA</b>	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
I	Plantas colectadas.	26
II	Aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación y su porcentaje de rendimiento.	39
III	Constituyentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> .	41
IV	Constituyentes del aceite esencial de <i>Magnolia grandiflora</i> .	43
V	Constituyentes de la fracción incolora del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	45
VI	Constituyentes de la fracción amarilla del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	47
VII	Constituyentes de la fracción incolora del aceite esencial de <i>Chrysactinea Mexicana Gray</i> .	49
VIII	Constituyentes de la fracción amarillo del aceite esencial de <i>Chrysactinea Mexicana Gray</i> .	51
IX	Constituyentes de la fracción incolora del aceite esencial de <i>Origanum majorana</i> .	53
X	Constituyentes de la fracción amarilla del aceite esencial de <i>Origanum majorana</i> .	55
XI	Constituyentes de la fracción incolora de la Hoja del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	57
XII	Constituyentes de la fracción amarilla de la hoja del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	59

XIII	Constituyentes de la fracción incolora del fruto del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	61
XIV	Constituyentes de la fracción amarilla del fruto del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	63
XV	Porcentaje de reducción de DPPH (%) de aceites esenciales a una concentración máxima de 250 µg/mL.	65
XVI	CE <sub>50</sub> de aceites esenciales.	65
XVII	Valores de CMI de los aceites esenciales contra 2 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y 1 cepa <i>Streptococcus pyogenes</i> .	66
XVIII	Prueba de susceptibilidad preliminar para cada aceite esencial contra 6 cepas de dermatofitos. Porcentaje de inhibición (%).	67
XIX	Experimento 1: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con disco. Diámetros de inhibición (mm).	68
XX	Experimento 2: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión placa con crecimiento previo de 24 h. Diámetros de inhibición (mm).	68
XXI	Experimento 3: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con pozo. Diámetros de inhibición (mm).	69
XXII	Experimento 4: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante la técnica de inhibición de crecimiento por volatilidad. Diámetros de inhibición (mm).	69
XXIII	Porcentaje de área total de compuestos terpénicos en los aceites esenciales.	76



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructuras químicas de los componentes de aceites esenciales	9
2	Equipo de hidrodestilación Clevenger modificado	26
3	Cromatograma CG-EM del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> .	42
4	Cromatograma CG-EM del aceite esencial de <i>Magnolia grandiflora</i> .	44
5	Cromatograma CG-EM de la fracción incolora del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	46
6	Cromatograma CG-EM de la fracción amarilla del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	48
7	Cromatograma CG-EM de la fracción incolora del aceite esencial de <i>Chrysactinea Mexicana Gray</i> .	50
8	Cromatograma CG-EM de la fracción amarillo del aceite esencial de <i>Chrysactinea Mexicana Gray</i> .	52
9	Cromatograma CG-EM de la fracción incolora del aceite esencial de <i>Origanum majorana</i> .	54
10	Cromatograma CG-EM de la fracción amarilla del aceite esencial de <i>Origanum majorana</i> .	56

11	Cromatograma CG-EM de la fracción incolora de la hoja del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	58
12	Cromatograma CG-EM de la fracción amarilla de la hoja del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	60
13	Cromatograma CG-EM de la fracción incolora del fruto del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	61
14	Cromatograma CG-EM de la fracción amarilla del fruto del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> .	64

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS <sup>•+</sup>	ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenztiazolina)-6-sulfónico
APD	Agar Patata Dextrosa
°C	Centígrados
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CG/EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas
CG/FID	Cromatografía de Gases con detector de Ionización a la flama
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2- picrilhidrazilo
EUA	Estados Unidos de América
<i>FID</i>	<i>Flame Ionization Detector</i>
g	Gramos
h	Horas
IA	Índice Aritmético
IA <sup>a</sup>	Índice Aritmético calculado
IA <sup>b</sup>	Índice Aritmético reportado por Adams R., 2002.
IK	Índice de Kovats
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
m	Metros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligramos

mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	Minutos
nm	Nanómetros
NA	No activo
OMS	Organización Mundial de la Salud.
p/v	Peso sobre volúmen
%	Porcentaje
%A	Porcentaje de area
<i>spp</i>	Especie
SLP	San Luis Potosí
SINAIS	Sistema Nacional de Información en Salud.
TR	Tiempo de retención

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedades infecciosas

La Organización Mundial de la Salud reporta que las enfermedades infecciosas, son las causantes del 25% de la morbilidad mundial; ocasionando alrededor de 17 millones de decesos al año y disminuyen la calidad de vida de miles de personas (*OMS., 2002-2005*)(*Olshansky J., et al, 1997*).

En el mercado farmacéutico, existe tratamiento adecuado para erradicar algunas infecciones de mayor incidencia a nivel mundial, pero la falta de medios económicos para atacar estas infecciones provocan su rápida diseminación. Es por esto que la mayoría de las muertes, debido a enfermedades infecciosas, ocurren en países industrialmente subdesarrollados y en áreas tropicales; pues la poca infraestructura en salud de estos países, la pobreza, la negligencia y las condiciones insalubres crean un ambiente propicio para el desarrollo de estas enfermedades (*OMS., 2002-2005*).

Una infección es el establecimiento de un microorganismo patógeno dentro de un huésped y puede tener lugar durante un breve espacio de tiempo y causar una enfermedad. El patógeno es cualquier microorganismo con capacidad de causar una enfermedad; sin embargo, no todos los patógenos tienen la misma probabilidad de provocar una enfermedad infecciosa en el huésped (*Mandell G.L., et al., 2006*).

Las enfermedades infecciosas se pueden clasificar según el agente transmisible y/o patógeno que las causa. Por ejemplo, infecciones causadas por bacterias, hongos, parásitos, virus o priones (proteínas) (Nelson K., et al., 2000).

Otra forma de clasificar a las enfermedades infecciosas, es de acuerdo a su comportamiento dentro del huésped u hospedero. Cualquier enfermedad infecciosa que se disemina de un huésped a otro, de forma directa o indirecta, se denomina enfermedad transmisible. Las enfermedades transmisibles contagiosas son enfermedades que se diseminan con facilidad de una a otra persona. Una enfermedad no transmisible, no se desarrolla de una huésped a otro (Nelson K., et al., 2000).

Además las enfermedades infecciosas, también se clasifican de acuerdo al órgano, sistema o bien donde se observan las manifestaciones clínicas presentes en la infección (Nelson K., et al., 2000). Entre las cuales se encuentran las infecciones respiratorias altas o bajas, gastrointestinales, renales e infecciones dermatológicas.

## 1.2 Infecciones dermatológicas

La piel funciona como una barrera flexible que protege contra las infecciones, tóxicas y los efectos de la radiación ultravioleta. La capa más externa de la piel, el estrato córneo, proporciona protección mediante una barrera impermeable constituida por ácidos grasos, colesterol y ceramidas, cementadas entre células ricas en proteínas y muy juntas (Habif T., et al., 2006). Su flora microbiana incluye bacterias, hongos y ácaros. Si por alguna razón sus defensas se ven alteradas, una variedad de microorganismos oportunistas pueden causar una infección. Las infecciones que atacan el órgano de la piel, tienen una baja tasa de mortalidad, en comparación con otras infecciones; sin embargo, es evidente que las infecciones en piel son de las más comunes, debido a que es nuestra primera barrera de protección contra el ambiente exterior (Bensouliah J. y Buck P., 2006).

Las infecciones en la piel son provocadas generalmente por: bacterias y hongos. Bacterias como *Streptococcus spp* y *Staphylococcus spp*. Los agentes causantes de las infecciones bacterianas, particularmente, *Streptococcus pyogenes* que causa impétigo y celulitis, las cepas de *Staphylococcus spp* que además son causan infecciones en piel como erisipela, pústulas, carbúnculos, infecciones postoperatorias, además de inflamaciones agudas. Esta última bacteria es el agente patógeno más importante de infecciones en piel y presenta resistencia a ciertas terapias antibacterianas. Es posible que *Staphylococcus spp* sea capaz de causar diferentes infecciones en distintas zonas de la piel (*Bensouliah J. y Buck P., 2006*).

Con respecto a las infecciones dermatológicas causadas por hongos y levaduras, también conocidas como dermatomicosis, afectan principalmente piel, uñas y pelo; y son capaces de penetrar otros tejidos, proliferar y convertirse en infecciones en tejido más profundo, así se vuelven infecciones crónicas, difíciles de erradicar (*Bensouliah J. y Buck P., 2006*). Específicamente, los dermatofitos son los causantes de las infecciones más comunes en piel como dermatofitosis, se les conoce como hongos predadores de la piel. Se les denomina de esta forma, debido a que poseen enzimas queratinasas encargados de degradar la queratina de la piel. Las dermatofitosis son causadas por tres géneros de dermatofitos *Microsporum spp.*, *Tricophyton spp.* y *Epidermophyton spp.* (*Johnson L., 2003*). Estas dermatofitosis se nombran de acuerdo a la localización anatómica de la infección con el prefijo en latín *tinea*:

- *Tinea capitis* en el cuero cabelludo.
- *Tinea corporis* en el tronco y extremidades.
- *Tinea cruris* en la ingle.
- *Tinea pedis* en los pies.
- *Tinea unguium* en las uñas.
- *Tinea manuum* en las manos.

Las infecciones dermatológicas dañan la piel alterando el estrato córneo, causando irritabilidad en la piel, erupciones, descamación, inflamación crónica del área afectada y comezón. Estos síntomas generan gran incomodidad en los pacientes. Las lesiones típicas en las dermatofitosis, son descamaciones anulares con un margen de relieve y sus características exactas dependerán de la localización de la infección (*Bensouliah J. y Buck P., 2006*).

Las dermatofitosis son padecimientos cosmopolitas, comunes en climas cálidos y húmedos. En lo que respecta a México, los dermatofitos más frecuentes son: *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton tonsurans*, *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum* (*Bonifaz A., 2010*).

Son padecimientos que no comprometen la vida de los pacientes, por lo que los reportes son escasos al no ser enfermedades de información obligatoria. Estadísticas del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) indican que en un período de 2004-2008, cerca de 24 millones de pacientes fueron hospitalizados en instituciones públicas de todo el país a causa de alguna infección dermatológica de origen bacteriano (*SINAIS, 2004-2007*). La frecuencia de consultas dermatológicas de estos casos, es aproximadamente del 5 % (*Arenas R., 2002*).

De acuerdo a datos de un censo realizado en el Hospital Universitario José Eleuterio González en el área metropolitana de Monterrey, durante el período de 1978 a 1990, aproximadamente 2400 pacientes fueron atendidos por dermatofitosis. Donde se encontró que la tiña de mayor incidencia fue *tinea pedis* con 30% de los pacientes atendidos (*Welsh O., et al., 2002*).

### 1.3 Tratamiento para las afecciones dermatológicas

Una adecuada prescripción dermatológica, se basa en un diagnóstico preciso de la infección. Por lo que el tratamiento dependerá de la naturaleza de la infección, la topografía clínica, la extensión de la lesión causada y la profundidad de la lesión. Cuando la infección dermatológica es causada por una bacteria, comúnmente, se utilizan antimicrobianos como mupirocina, ácido

fusídico, eritromicina, gentamicina, clindamicina, rifampicina y sulfadiazina de plata para erradicarlos. En el caso de las infecciones causadas por hongos se utilizan anfotericina B, nistatina, griseofulvina, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, terbinafina, ciclopiroxolamina y amorolfina, son los antifúngicos más utilizados (*Arenas R, 2005*). Estos tratamientos, se pueden administrar vía sistémica y/o tópica, dependiendo la gravedad de la infección (*Bonifaz A., 2010*).

La vía de administración sistémica incluye preparaciones inyectables en disolución, emulsión o suspensión estéril destinadas a su inyección en el cuerpo humano a través de la piel o de mucosas (*Trillo F.I., 1993*). Los antimicrobianos de vía de administración sistémica son una alternativa utilizada cuando se requiere un rápido efecto terapéutico, contra una afección dermatológica que ha comprometido la salud del paciente.

La vía de administración tópica incluye preparados farmacéuticos en diferentes vehículos, como emolientes, geles, pomadas, ungüentos, cremas, suspensiones y/o soluciones. Los antimicrobianos tópicos, específicamente, son preparaciones antimicrobianas aplicadas en piel y mucosas con acción antimicrobiana local (*Gerbino P., 2006*). La vía de administración tópica, tiene un rol importante en los tratamientos dermatológicos, pues constituyen una alternativa útil frente a otras vías de administración en infecciones cutáneas muy localizadas (*Sáenz-Anduaga E. y Sánchez-Saldaña L., 2005*). Además, este tratamiento dermatológico también busca restaurar y conservar las funciones esenciales de la barrera cutánea que fueron alteradas por una infección (*Habif T., et al., 2006*). A ésta vía de administración se le atribuye ciertas ventajas:

- Libera concentraciones del antibiótico directamente en el área de infección.
- Posee una mínima absorción sistémica evitando toxicidad y pocos efectos adversos.
- Disminuye la inducción de resistencia bacteriana.
- Posee alta versatilidad, ya que son utilizados en profilaxis y tratamiento de infecciones.

#### 1.4 Resistencia al tratamiento dermatológico

La prescripción y el uso desmedido de los antimicrobianos han contribuido al aumento de resistencia por parte de algunos microorganismos. Conforme más se prescriben antimicrobianos con el objetivo de combatir estas afecciones, algunas de las cepas causantes de las principales infecciones dermatológicas llegan a ser insensibles a los diferentes tratamientos antimicrobianos, ya sea tópicos o sistémicos (*Bonifaz A., 2010*).

En dermatología uno de los problemas de resistencia más importantes, lo presentan los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp*, debido a que son los causantes de la mayoría de las infecciones dermatológicas (*Sáenz-Anduaga E. y Sánchez-Saldaña L., 2005*). Al elegir correctamente el tratamiento tópico antimicrobiano, disminuye el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos.

Está demostrado, que los agentes antimicrobianos tópicos prescritos correctamente y usados apropiadamente en heridas, aminoran el riesgo de infección y morbilidad; pues las heridas infectadas se curan lentamente y evitan llegar a infectar órganos más profundos (*Sáenz-Anduaga E. y Sánchez-Saldaña L., 2005*).

La creciente resistencia a antimicrobianos y la poca disponibilidad económica para adquirir fármacos que combatan las afecciones dermatológicas, ha propiciado la búsqueda de nuevos compuestos como alternativa terapéutica, que inhiban los mecanismos de resistencia de estos microorganismos. Principalmente, se buscan nuevas terapias de origen natural, que sean seguras, no tóxicas, eficaces y de bajo costo, es por eso que los productos naturales utilizados en la medicina tradicional, como extractos e infusiones, son una excelente opción (*Abad M.J., 2007*).

### 1.5 Plantas en medicina tradicional

Muchas plantas han sido utilizadas desde la antigüedad como tratamientos no convencionales seguros. En la actualidad, la OMS estima que un 80% de la población en países desarrollados utilizan la medicina tradicional como tratamiento contra enfermedades o como suplemento al tratamiento convencional. Un porcentaje importante, de plantas utilizadas en la medicina tradicional, son plantas aromáticas (*Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*).

En dermatología, un buen número de productos naturales se han utilizado junto a las terapias convencionales para el tratamiento de ciertas enfermedades o sintomatologías dermatológicas. Plantas como *Avena sativa*, *Arnica montana* y *Ananas comosus*, han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de prurito, inflamaciones de la piel, erupciones y dolores musculares específicamente (*Dattner A., 2003*).

Las plantas son utilizadas completas o algunas de sus partes, en extractos o en forma de infusión y ofrecen una ilimitada gama de compuestos químicos, algunos de ellos biológicamente activos (*Abad M.J., 2007*).

La efectividad de los productos herbolarios depende del tipo y la cantidad de sus componentes químicos, del método de extracción utilizado, de las condiciones ambientales de la localización de la planta y de la época de colecta (*Dattner A., 2003*). Los compuestos activos son aislados como extractos crudos o aceites esenciales de plantas. Una vez extraídos y purificados, pueden usarse como tal, o con la ayuda de la química sintética, utilizarlos como precursores de fármacos (*Cordell G.A., 2000*).

## 1.6 Aceites esenciales

El aceite esencial es el aceite volátil y oloroso de la planta, producido por glándulas secretoras o células especializadas dentro del tejido vegetal o bien en la superficie de esta. Los aceites esenciales son el resultado del metabolismo secundario de las plantas (*Bensouliah J. y Buck P., 2006*). Son mezclas muy complejas que juegan un papel imprescindible en la naturaleza como antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas.

Los aceites esenciales se caracterizan por tener 2 ó 3 tipos de componentes en mayor proporción (20% a 70%) en comparación con otros componentes, que se encuentran en trazas, generalmente, estos compuestos mayoritarios determinan las propiedades biológicas del aceite esencial. El grupo mayoritario de componentes de los aceites esenciales son los terpenos (generalmente monoterpenos y sesquiterpenos) (Figura 1), mientras que otros grupos, están constituidos por compuestos aromáticos y alifáticos con grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas (*Bakkali F., et al, 2008*).

Los aceites esenciales son extraídos utilizando distintos métodos como: hidrodestilación, extracción con solventes, presión física y fluidos supercríticos (*Bakkali F., et al, 2008*).

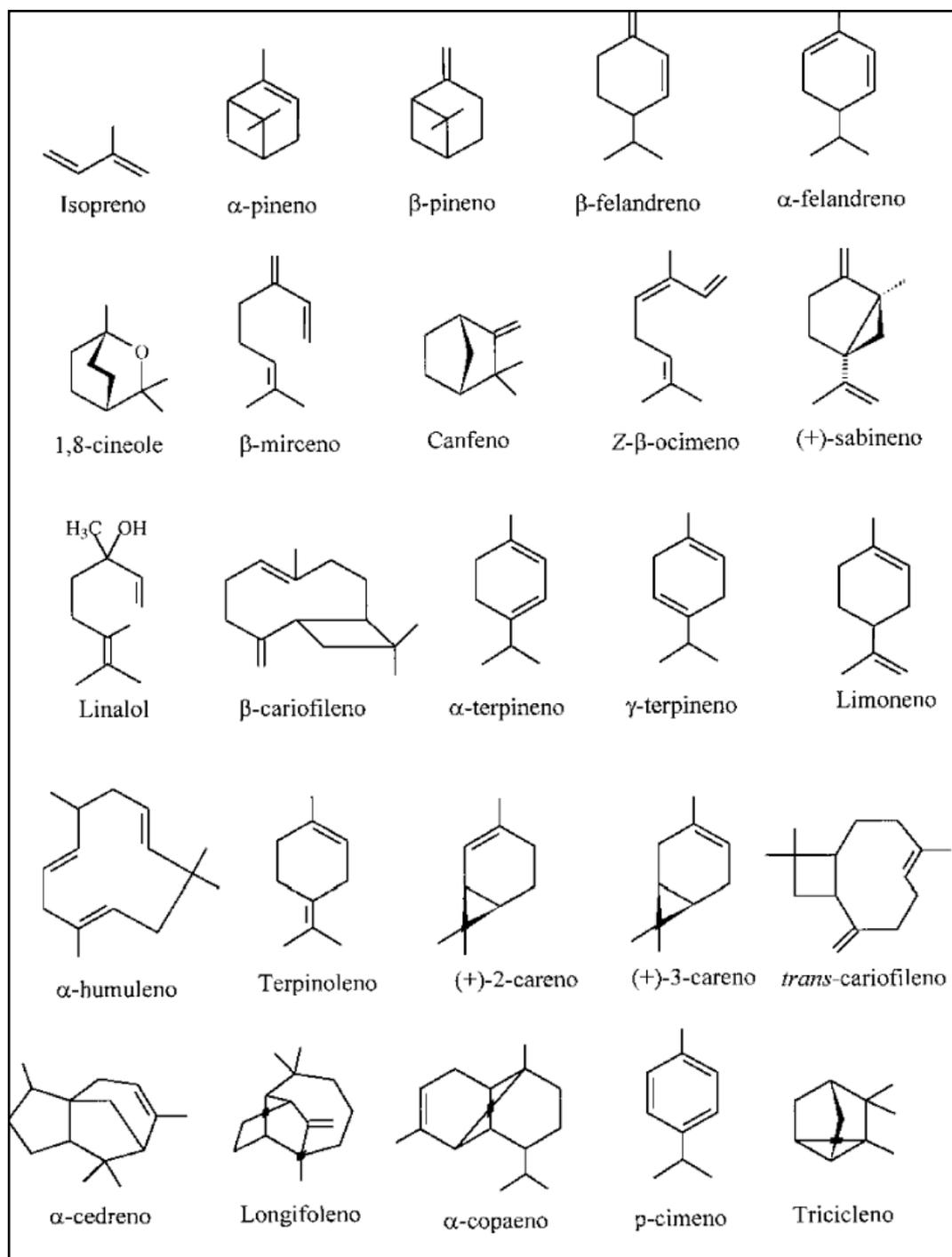


Figura 1. Estructuras químicas de los componentes de aceites esenciales

### 1.7 Propiedades biológicas de aceites esenciales de plantas

Los aceites esenciales son utilizados desde la antigüedad debido a sus propiedades terapéuticas (*Edris A., 2007*). Investigaciones científicas, en las últimas 2 décadas, demuestran las diferentes actividades biológicas de los aceites esenciales; desde su actividad anticancerígena, antiviral, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, así como su capacidad para favorecer el paso de moléculas activas a través de piel.

Los componentes que constituyen el aceite esencial tienen un rol importante, pues definen el aroma de los aceites, su densidad, textura, color, atracción lipofílica, distribución celular y su capacidad de penetrar a través de la célula, por su facilidad para fijarse en paredes y membranas celulares (*Bakkali F., et al., 2008*).

Las propiedades biológicas de un aceite esencial, se atribuyen, generalmente a sus componentes mayoritarios como los compuestos terpénicos; sin embargo, en ocasiones éstos componentes actúan en sinergia con otros componentes minoritarios y favorecen las propiedades biológicas. Por lo que cabe la posibilidad de que la actividad biológica de algunos aceites esenciales sea debido tanto a sus componentes mayoritarios como a los minoritarios (*Bakkali F., et al., 2008*).

- Actividad antibacteriana

Un considerable número de investigaciones, ha demostrado que los aceites esenciales son capaces de inhibir y controlar la proliferación de diversos microorganismos, desde microorganismos causantes de la putrefacción de alimentos, de la caries dental (*Sartoratto A., et al., 2004*) hasta microorganismos patógenos causantes de infecciones gastrointestinales, respiratorias (*Husnu Can Baser K., et al., 2006*) y en piel (*Sartoratto A., et al., 2004*).

Evidencias *in vitro*, indican que los aceites esenciales actúan como agentes antimicrobianos de amplio espectro. Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*, inhiben distintas cepas bacterianas Gram (-) como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y cepas Gram (+) como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp* (Roldán L.P., et al., 2010).

Inclusive algunos aceites esenciales, como el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, ha presentado actividad antibacteriana a concentraciones de 11 mg/mL contra cepas mutadas de microorganismos resistentes de *Escherichia coli* (Luqman S., et al., 2007).

Por ejemplo, el aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) ha mostrado tener actividad contra microorganismos que afectan la piel como: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* y *Trochophyton mentagrophytes*. En un estudio realizado con 124 pacientes, que presentaban acné por *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnes*, se comparó la eficacia de un gel con aceite esencial del árbol de té contra un gel con peróxido de benzoilo. Al cabo de 3 meses, se encontró una mejora en pacientes que utilizaron el tratamiento con gel de *Melaleuca alternifolia*. Los efectos adversos del tratamiento con peróxido de benzoilo, como sequedad de la piel, irritación y rosaduras, no se observaron o fueron mínimos con el tratamiento natural de *Melaleuca alternifolia*. Bedi y Sehefelt, sugieren que los monoterpenos que se encuentran en el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, actúan como antimicrobianos y agentes sensibilizantes en la piel. Confirmando que el aceite esencial del árbol de té, es seguro y efectivo para el tratamiento del acné (Bedi M.K. y Shenefelt P., 2002).

Otro ejemplo, es el uso de manzanilla (*Matricaria recutita*) es utilizada en el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas, así como dermatitis y e irritación en piel. El aceite esencial de los pétalos de la flor de manzanilla, tiene como constituyentes mayoritarios el  $\alpha$ -bisabolol, los óxidos A y B del  $\alpha$ -bisabolol y del camazuleno. Además de poseer un alto

contenido de flavonoides como apigenina, luteolina y quercetina, a los cuales se les atribuye la actividad (Brown D.J. y Dattner A., 1998).

Además de estos ejemplos, existen diversos reportes que demuestran que los componentes de aceites esenciales son responsables de limitar la proliferación y crecimiento de microorganismos. La inhibición del crecimiento bacteriano se justifica por diferentes mecanismos de acción dependiendo de sus componentes.

Un mecanismo propuesto está relacionado a la hidrofobicidad de los aceites que le confieren ciertos componentes. Por su origen lipofílico, tienen la capacidad de distribuirse de manera homogénea en la bicapa lipídica de las células (Edris A., 2007) rompiendo las estructuras de diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos que forman su pared celular y membrana citoplasmática atravesándola y de ésta manera limitar la proliferación de microorganismos (Bakkali F., et al., 2008).

Otro de los mecanismos de acción, se atribuye al alto contenido de grupos fenólicos en los aceites esenciales, como el del carvacrol, mentol y el timol. Se ha encontrado que estos grupos fenólicos causan la inhibición de *Bacillus subtilis* (Edris A., 2007).

Sokovick y colaboradores en 2010, probaron que la actividad antibacteriana del aceite esencial, de las especies *Thymus spp* y *Origanum spp* es debido a la presencia de un alto porcentaje de compuestos fenólicos. Estos investigadores, indican que el carvacrol, componente mayoritario de los aceites de especies como *Thymus spp* y *Origanum spp*, interfiere con las enzimas responsables de la síntesis de pared celular del microorganismo patógeno (Sokovic M., et al., 2010).

En el caso especial de los aceites esenciales que carecen de este tipo de componentes, pero presentan actividad antibacteriana, estos deben su actividad, a la sinergia de los componentes minoritarios oxigenados (con grupos funcionales fenólicos) (Sokovic M., et al., 2010).

- Actividad antifúngica

Los aceites esenciales han demostrado tener actividad contra diversos hongos patógenos, causantes de diversas afecciones. En la mayoría de los reportes existentes, se ha probado la actividad de los aceites contra hongos filamentosos y levaduras (Tabanca N., et al., 2006). Un considerable número de investigaciones en décadas recientes, demuestran que esta actividad antifúngica es debida principalmente a compuestos terpénicos de los aceites esenciales, como los sesquiterpenos y sesquiterpenlactonas (Abad M.J., et al., 2007).

Abad y cols en 2007, analizaron la actividad del aceite esencial de plantas aromáticas de 2 familias: *Lamiaceae* y *Asteraceae*. El efecto antifúngico de los aceites esenciales de la familia *Lamiaceae*, específicamente, *Lavandula angustifolia*, se probó contra 50 aislados clínicos de *Candida spp*, resultando las moléculas responsables de la actividad antifúngica, el linalol y linalil acetato. Los aceites de la familia *Asteraceae*, mostraron actividad antifúngica contra otros hongos patógenos como *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*; la actividad antifúngica se le atribuyó a la piperitona y piperitenona, 2 componentes principales de estas plantas. Componentes como las sesquiterpenlactonas aisladas de especies de la familia *Asteraceae*, también han demostrado tener actividad antifúngica contra 9 diferentes especies de hongos mediante la técnica de dilución en microplaca (Abad M.J., et al, 2007).

Las infecciones dermatológicas, son causadas principalmente por levaduras de la especie *Candida spp* y hongos filamentosos, como las diferentes especies de dermatofitos (Bonifaz A., 2009). En 2002, Hammer y colaboradores demostraron que los aceites esenciales tienen

actividad específica contra los hongos causantes de las dermatofitosis. Se analizaron los aceites esenciales de *Melaleuca alternifolia* contra dermatofitos del género *Epydermophyton spp*, *Tricophyton spp* y *Microsporum spp* y otros hongos filamentosos del género *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium* y *Cladosporium spp*, mostrando mediante diferentes técnicas, que el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* tiene actividad de inhibición de crecimiento antifúngico (Hammer K.A., et al., 2002).

Bajpai y colaboradores en 2009, determinaron la actividad antidermatofítica de los aceites esenciales y extractos de la flor de *Metasequoia glyptostroboides*. El efecto antidermatofítico del aceite fue mayor contra *Tricophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*. Las investigaciones, atribuyen este efecto, a la presencia de moléculas como  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -tujeno,  $\delta$ -3-careno, sabineno, 2- $\beta$ -pineno, lilanil acetato, bornileno, óxido de cariofileno, totarol y acetato de totarol. Los cuales fueron caracterizados en el mismo aceite (Bajpai V., et al., 2009)<sup>a</sup>.

- Actividad antioxidante

Un agente antioxidante actúa como supresor de radicales libres, inhibiendo la peroxidación de cualquier proceso mediado por estos radicales. Los compuestos antioxidantes son vitales para el cuerpo humano, pues poseen la capacidad de protegerlo contra el estrés oxidativo de diversas enfermedades (Bajpai, V., et al, 2009)<sup>b</sup>.

Existen agentes antioxidantes de origen natural y de origen sintético. Ambos son utilizados con el objetivo de contrarrestar el daño causado por radicales libres en enfermedades. Específicamente, el uso de agentes antioxidantes sintéticos, genera efectos secundarios, como daño hepático y/o carcinogénesis. Por lo que es preferible la utilización compuestos antioxidantes de origen natural para combatir el daño causado por estrés oxidativo (Yadegarini D., et al, 2006).

Los aceites esenciales presentan además de actividades biológicas antisépticas y antimicrobianas, actividad antioxidante (Yang-Seun-Ah J., et al, 2006). La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de radicales libres; por tanto se enfocan en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para capturar de radicales libres o la de inhibir su formación. Este es el principio de los mecanismos de ensayos como DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y la técnica ABTS<sup>+</sup>, (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) (Mosquera O., et al., 2005).

Grigore y colaboradores, reportaron una CE<sub>50</sub> de 3 mg/mL para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* con la técnica antioxidante de radical libre de DPPH (Grigore A., et al., 2010). El aceite esencial de *Thymus vulgaris*, está constituido por moléculas con grupos funcionales fenólicos, como el timol (Sokovic M., et al., 2010), al cual se le adjudica la actividad antioxidante del aceite. Compuestos como los bioflavonoides, están presentes en las plantas como agentes protectores, pues actúan como antioxidantes cuidándola contra daños oxidativos del ambiente. Por ejemplo, el aceite esencial de *Calendula officinalis* tiene compuestos flavonoides como el triterpeno pentacíclico trihidroxilado y saponinas, que poseen una acción inmunomoduladora, antiinflamatoria y regenerativa. Debido a que estimulan el incremento de glicoproteína y el metabolismo del colágeno en donde se localiza una herida (Dattner A., 2003).

La actividad antioxidante de un aceite esencial puede ser útil en la prevención y cura de enfermedades relacionadas con la piel. En dermatología, se utilizan agentes antioxidantes naturales cuando existen heridas en piel (Dattner A., 2003). La propiedad antioxidante evita la formación cicatrices hipertróficas y queloidales, suprimiendo la síntesis de colágeno mediada por fibroblastos que actúan en cicatrices hipertróficas y no la síntesis de colágeno de tejido normal (Taguchi J., et al, 1995). En la práctica clínica, se ha demostrado que utilizar productos naturales que contengan estos agentes antioxidantes, previene el riesgo a contraer enfermedades en piel mediadas por radicales libres (Dattner A., 2003).

### 1.8 Antecedentes

Las plantas utilizadas en esta investigación fueron elegidas de acuerdo a criterios quimiotaxónomicos y etnofarmacológicos.

El criterio etnofarmacológico, es el conocimiento de uso popular de una planta particular por un pueblo indígena y se utiliza para direccionar la investigación. En este caso, la observación de un uso en particular de una planta, permite la colección del material vegetal y una subsecuente determinación de la actividad biológica. Los criterios quimiotaxonómicos se basan en conocer el contenido químico de un grupo particular de plantas. Esto permite predecir la actividad biológica de plantas que están taxonomicamente relacionadas, debido a que comparten compuestos estructuralmente similares (Osorio-Durango J., 2009).

Se han encontrado reportes históricos de la medicina herbolaria tradicional, donde se describe el frecuente uso de la corteza de *Magnolia spp* como antiséptico, sedante, anticonvulsivo e inclusive como relajante muscular y contra infecciones gastrointestinales (Sarker S.D. y Maruyama Y., 2002).

La actividad antimicrobiana de la especie *Magnolia*, se muestra en diversas investigaciones; por ejemplo, Lai Wah Chan y colaboradores en 2008 mostraron que la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *Magnoliae officinalis* contra *Mycobacterium smegmatis* era mayor que la actividad antibacteriana que proporciona la estreptomina B. Ellos adjudican la actividad antimicrobiana al sinergismo entre las moléculas del honokiol y magnolol, los cuales son causantes de la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis*; la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y algunas cepas de dermatofitos (Bajpai V., et al., 2009)<sup>b</sup>. Definiendo a la *Magnolia officinalis* como un potencial producto medicinal por su efecto antimicrobiano (Chan L.W., et al., 2008). En Venezuela, Jiménez y colaboradores en 2007, analizaron e identificaron los componentes volátiles de las hojas de *Magnolia grandiflora* mediante CG/EM y su porcentaje de área, por

CG/FID, el germacreno-D resultó el componente mayoritario. Estos investigadores, concluyen que las propiedades antimicrobianas del aceite pueden ser debido al germacreno-D (*Jiménez-Medina D., et al., 2007*). La actividad antioxidante se determinó por Bajpai y colaboradores en 2009, en *Magnolia liliflora* mediante la técnica DPPH. Los extractos de *Magnolia liliflora* presentaron  $CE_{50}$  de entre 10.11 y 178.10  $\mu\text{g/mL}$  (*Bajpai V., et al., 2009*)<sup>b</sup>.

El aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*) y diferentes especies de *Thymus*, han sido utilizados desde la antigüedad como saborizantes de comidas, conservadores y como antisépticos (*Pinto E., et al., 2006*). El uso común como antiséptico de este aceite, es por sus propiedades antimicrobianas, las cuales son demostradas en diferentes reportes científicos, que corroboran la inhibición de ciertos microorganismos. Centeno y colaboradores en 2010, demostraron la capacidad antimicrobiana de este aceite, al probar la actividad antifúngica de extractos alcohólicos de *Thymus vulgaris* contra cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*. Los extractos causaron zonas de inhibición de entre 11 y 16 mm (*Centeno S., et al., 2010*). Pinto y colaboradores en 2006, de igual manera mostraron actividad antifúngica del aceite de *Thymus spp*, al obtener buenas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de entre 0.08 y 0.32  $\mu\text{g/mL}$  contra diferentes cepas de hongos filamentosos, dermatofitos y levaduras mediante técnicas de macrodilución (*Pinto E., et al., 2006*). Por otra parte, la actividad antibacteriana de *Thymus spp* fue evaluada contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus equi* y *Micrococcus luteus*. *Thymus vulgaris* mostró una buena actividad antibacteriana, es decir una baja CMI, a 0.49 mg/mL contra la cepa de *Bacillus subtilis* (*Sartoratto A., et al., 2004*).

En 2011, De Lisi y colaboradores, analizaron aceites de la especie *Thymus spp* originaria de Italia. El análisis del aceite se realizó mediante CG/EM y CG/FID, siendo sus componentes mayoritarios el geranial, timol y  $\alpha$ -terpineol (*De Lisi A., et al., 2011*). Anteriormente, en 2006, ya se había realizado un análisis del aceite de *Thymus pulegioides* originario de Portugal,

donde Pinto y colaboradores, demostraron que de entre los componentes mayoritarios del aceite, se encontraba el timol, carvacrol, Y-terpineno y p-cimeno (Pinto E., et al., 2006).

Los extractos y aceites de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) han sido utilizados por sus propiedades medicinales, culinarias y cosméticas (Luqman S., et al., 2007). En diversas investigaciones han confirmado sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Luqman y colaboradores en 2007, analizaron la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra diversas cepas de *Escherichia coli* y *Candida albicans* resistentes a diversos fármacos como ciprofloxacino en concentraciones de 0.09 a 6.25 µg/mL, clotrimazol a una concentración de 1.56 µg/mL y anfotericina B a una concentración de 1.53 µg/mL (Luqman S., et al., 2007). La actividad antioxidante del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* fue reportada por Geneva y colaboradores, utilizando la técnica DPPH. Sus resultados muestran valores de CE<sub>50</sub> en un rango de 9.23 a 25.84 µg/mL, para 11 aceites esenciales de romero de la región de Brasil (Geneva A., et al., 2008).

La planta de *Chrysactinia mexicana gray* es conocida como la hierba de San Nicolás o falsa Damiana, es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones respiratorias e infecciones de la piel. La actividad antimicrobiana de esta planta fue determinada por investigaciones que respaldan su actividad contra diferentes cepas de hongos y bacterias. Su actividad antifúngica se evaluó contra el hongo *Aspergillus flavus*, obteniendo CMI de 1 y 1.25 mg/mL (Cárdenas-Ortega N.C., et al., 2005). La actividad antibacteriana del aceite esencial de raíz de *Chrysactinia mexicana gray* fue evaluada contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, resultando una CMI de 250 µg/mL (Guevara B., et al., 2010).

La actividad antioxidante de *Chrysactinia mexicana gray* fue analizada por Salazar-Aranda y colaboradores en 2009, en extractos de las hojas, flores y raíz, mediante la técnica de DPPH, determinando una CE<sub>50</sub> menor a 10 µg/mL (Salazar-Aranda R., et al., 2009).

Cárdenas-Ortega y colaboradores, en 2005, determinaron la composición del aceite esencial de hojas de *Chrysactinia mexicana gray*, mediante CG/EM y CG/FID, siendo el eucaliptol y la piperitona los componentes mayoritarios, de un total de 30 compuestos identificados (Cárdenas-Ortega N.C., et al., 2005).

El aceite de orégano (*Origanum vulgare*) es utilizado como saborizante y conservador de alimentos en la cocina tradicional de muchos países. Su propiedad para preservar alimentos, es debida a su actividad antibacteriana (Manohar V., et al., 2001). En 2005, Faleiro y colaboradores, mostraron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Oreganum vulgare*. El aceite presentó actividad contra diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*, generó halos de inhibición máxima de 33.75 mm. El aceite de *Oreganum vulgare* también es activo contra otras cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus equi* y *Micrococcus luteus*. El aceite de *Oreganum vulgare* mostró actividad antibacteriana contra la cepa de *Enterococcus faecium*, presentando una CMI de 0.40 mg/mL (Sartoratto A., et al., 2004). Recientemente en 2010, Weerakkody y colaboradores, determinaron que diferentes extractos de *Oreganum vulgare*, también presentan actividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*, demostrando que la especie *Oreganum spp*, es una especie con actividad antibacteriana de amplio espectro, es decir, capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de cepas Gram positivas y Gram negativas (Weerakkody N., et al., 2010).

La actividad antifúngica del aceite de *Oreganum vulgare*, fue reportada por Manohar y colaboradores, a una CMI de 0.125 mg/mL contra *Candida albicans* (Manohar V., et al., 2001). En lo que respecta a la actividad antioxidante del aceite, mediante la técnica antioxidante ATBS•<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), el aceite mostró una actividad antioxidante a concentraciones mayores de 800 mg/L (Faleiro L., et al., 2005).

Faleiro y colaboradores, analizaron el aceite esencial de *Oreganum vulgare*, mediante CG/EM y CG/FID. Estos análisis demostraron que el timol,  $\gamma$ -terpieneno y p-cimeno son los constituyentes mayoritarios del aceite (Failero L., et al., 2005). Las actividades antimicrobiana y antioxidante de un aceite, puede deberse a estos componentes, por lo que su caracterización es importante.

El aceite esencial de hoja de *Schinus molle* de California fue analizado en 1983, por Hákan Gustafsson y Fahlgren. Ambos determinaron que los componentes mayoritarios del aceite esencial del fruto de *Schinus molle* son mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\delta$ -cadineno, limoneno,  $\alpha$ -cadinol y  $\beta$ -felandreno (Hákan Gustafsson K. y Fahlgren C.H., 1983). Más tarde en 2010, Devici y colaboradores, analizaron el aceite de *Schinus molle* de la región de Turquía, encontrando que los compuestos volátiles mayoritarios del aceite esencial de la hoja de *Schinus molle* son:  $\alpha$ -cadinol y  $\delta$ -cadineno (Devici O., et al., 2010). Fuselli y colaboradores en 2006, demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas y fruto de *Schinus molle* contra cepas de *Paenibacillus larvae larvae* con CMI de entre 608 mg/L y 716.6 mg/L (Fuselli S., et al., 2006). Devici y colaboradores, también analizaron la actividad antibacteriana del aceite esencial; obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias entre 2 y 8 mg/mL contra las cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina y *Micrococcus luteus* (Devici O., et al., 2010).

La actividad antioxidante del extracto de *Schinus molle*, fue analizado por Marzouk y colaboradores; ellos evaluaron la actividad antioxidante de 7 flavonoides glicosilados, aislados de un extracto de la planta, mediante la técnica de xantina oxidasa. Las  $CE_{50}$  reportadas para los 7 compuestos aislados, se encuentran entre un rango de 170 y 210  $\mu$ M (Marzouk M., et al., 2006). La actividad antioxidante del extracto del fruto de *Schinus molle* mostró una  $CE_{50}$  de 15.2  $\mu$ g/mL. Los aceites esenciales del fruto de *Schinus molle* y de las hojas de *Schinus molle* no han sido analizados para corroborar su actividad antioxidante.

### **1.9 Justificación**

Dada la creciente resistencia a antimicrobianos en los diferentes tratamientos utilizados contra este tipo de infecciones dermatológicas. Resulta interesante la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural que sean capaces de inhibir el crecimiento microbiano de patógenos causantes de infecciones en piel y que además tengan la capacidad de ser antioxidantes. Debido a lo anterior y la necesidad de atacar las enfermedades infecciosas dermatológicas con nuevos y potentes agentes antimicrobianos, se propuso caracterizar de aceites esenciales de plantas utilizadas en la medicina tradicional, evaluar sus actividades antimicrobianas contra agentes etiológicos de estas infecciones, así como verificar su actividad antioxidante.

### **1.10 Objetivo general**

Caracterizar y evaluar *in vitro* las actividades antibacteriana, antifúngica y antioxidante de aceites esenciales.

### **1.11 Objetivos Específicos**

1. Obtener aceites esenciales de plantas por hidrodestilación.
2. Caracterizar químicamente los componentes principales de los aceites mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas y Cromatografía de Gases con detector de ionización a la flama.
3. Analizar la actividad antioxidante de los aceites esenciales mediante la técnica DPPH.
4. Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra diferentes cepas de hongos y bacterias.

## CAPÍTULO 2

# MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material, equipos y reactivos.

#### 2.1.1 Material

- Microjeringa, 2  $\mu$ L, Hamilton
- Columna capilar para CG/EM HP-5MS 60 m (di. 0.250 mm x 0.025  $\mu$ m)  
Agilent Technologies.
- Columna capilar para CG/FID HP-5MS 30 m (di. 0.320 mm x 0.025  $\mu$ m) Agilent  
Technologies.
- Placas para microdilución con 96 pozos, Corning
- Cajas Petri, Corning

#### 2.1.2 Equipos

- Hidrodestilador modificado de Clevenger
- Circulador de agua temperada, Haake
- Balanza analítica, And GR-120
- Balanza Scout-Pro, Ohaus
- Cromatógrafo de Gases con Espectrometría de Masas
- Cromatógrafo de Gases con detector de ionización a la flama, Perkin Elmer  
Autosystem XL
- Espectrofotómetro UV-Visible, Sequoia-Turner Modelo 390

- Minishaker, JK MS1 IKA
- Autoclave, Market Froge Industries INC.
- Campana, ESCO Smart control
- Incubadora, Shel Lab
- Incubadora, Quincy Lab Industries Modelo 10-140

#### 2.1.3 Reactivos

- Cloruro de metileno, J.T.Baker
- Metanol, grado reactivo Fermont
- Hexano, grado reactivo Fermont
- Solución estándar de n-alcanos C-8 – C-20, Sigma Aldrich.
- Agua Bidestilada Plus, Laboratorio Monterrey
- Alcohol etílico Absoluto ACS Fermont
- DPPH, Sigma Aldrich
- Quercetina, TCI América
- Caldo Muller-Hinton BBL, Becton, Dickinson & Company
- Agar Patata Dextroza, Becton, Dickinson & Company
- Carvacrol, Fluka Analytical
- Timol, Fluka Analytical

#### 2.1.4. Material biológico

- Hojas de *Magnolia grandiflora*
- Hojas de *Thymus vulgaris*
- Hojas de *Chrysactinia mexicana*
- Hojas de *Schinus molle*
- Hojas de *Rosmarinus officinalis*
- Hojas de *Origanum majorana*
- Fruto rojo de *Schinus molle*

- Cepa *Staphylococcus aureus* ATTC 12598
- Cepa *Staphylococcus aureus* IMSS/HE 25:01 resistente a oxacilina
- Cepa *Streptococcus pyogenes* aislado clínico
- Cepa *Trichophyton tonsurans* aislado clínico
- Cepa *Trichophyton mentagrophytes* aislado clínico
- Cepa *Trichophyton rubrum* aislado clínico
- Cepa *Epidermophyton floccosum* aislado clínico
- Cepa *Microsporum canis* aislado clínico
- Cepa *Microsporum gypseum* aislado clínico

## 2.2 Colecta de plantas

Las plantas se colectaron en diferentes lugares del Norte de México (Tabla I).

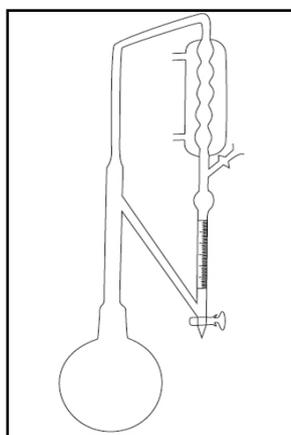
**Tabla I. Plantas colectadas**

Planta	Familia	Parte utilizada	Lugar de colecta	Folio de identificación
<i>Magnolia grandiflora</i>	Magnoliaceae	hojas	Allende, Nuevo León	Sin folio*
<i>Chrysactinia mexicana</i>	Asteraceae	hojas	Arteaga, Coahuila	3379,023795
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	hojas	Real de Catorce, S.L.P.	024009,017486
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	hojas	Real de Catorce, S.L.P.	010970
<i>Oreganum majorana</i>	Lamiaceae	hojas	Real de Catorce, S.L.P.	Sin folio*
<i>Schinus molle</i>	Anacardiaceae	hojas	Arteaga, Coahuila	Sin folio*
<i>Schinus molle</i>	Anacardiaceae	frutos	Arteaga, Coahuila	Sin folio*

\*Sin folio aquellas plantas con las que no se cuenta con especímenes en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL

## 2.3 Obtención del aceite

Para cada una de las plantas se separaron las hojas de las ramas. En el caso de *Schinus molle* se incluyeron también los frutos. Posteriormente, se trituraron en un molino eléctrico, el material molido de cada planta se pesó individualmente Tabla II. En un matraz bola se dispusieron 300 ml de agua destilada por cada 100 g de muestra. La hidrodestilación se llevó a cabo en un equipo de hidrodestilación Clevenger modificado (Figura 1), y se mantuvo a una temperatura a 100° C durante 4 h aproximadamente.



**Figura 2. Equipo de hidrodestilación Clevenger modificado**

En el caso de las plantas *Chrysactinia mexicana*, *Schinus molle*, *Rosmarinus officinalis* y *Origanum majorana*, los aceites obtenidos fueron colectadas en dos fracciones: una incolora y otra amarilla. Los aceites obtenidos se colocaron en tubos de vidrio y posteriormente fueron pesados y dispuestos en viales de vidrio ambar en atmósfera de nitrógeno para almacenarlos hasta su uso en el análisis químico y ensayos.

#### 2.4 Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas y Cromatografía de Gases con detector de ionización a la flama.

El análisis cualitativo de cada aceite esencial se realizó utilizando una columna HP-5 MS (60 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m) en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas selectiva 5973 INERT.

Las condiciones analíticas se desarrollaron hasta que pudieron eluir todos los n-alcanos de C-8 a C-20 a una concentración de 40 ppm. El programa de temperatura inició a 35 °C, se mantuvo 9 min y se elevó a una temperatura de 150 °C a razón de 3 °C/min, se mantuvo por 10 min. Nuevamente, se elevó la temperatura hasta 250 °C a razón de 10 °C/min. Finalmente, se elevó temperatura hasta 270 °C a razón de 3 °C/min. La temperatura en el inyector fue de 220 °C en modo splitless. El volumen inyectado fue de 2  $\mu$ L de una solución de 2 mg/mL de aceite en cloruro de metileno. La fase móvil fue helio 99,999% de pureza con un flujo de 0,5 mL/min. La temperatura del detector fue de 150 °C. Esta rampa de temperaturas se utilizó para el análisis de todos los aceites. La adquisición de datos se realizó mediante el modo de escaneo.

La identidad de los componentes se asignó por comparación de sus índices aritmético (IA) e índice de Kovats (IK) en relación a n-alcanos de C-8 a C-20. Además, los espectros de masas de cada componente, se compararon con los espectros de masas de la biblioteca NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) de los EUA y con datos de referencia (*Adams R., 2001*).

El IK, es un número asignado a cada uno de los componentes del aceite esencial. Se obtiene por interpolación logarítmica, del tiempo de retención de cada uno de los componentes, con ayuda del tiempo de retención de estándares de n-alcanos de C-8 a C-20. Para obtener el índice de Kovats de cada componente, se aplica la fórmula 1. En donde se calcula el logaritmo de los alcanos estándar, que se encuentren antes y después, del componente a analizar (*IUPAC, 2006*).

$$IK = 100 \left[ \frac{\log_{10} X_i - \log_{10} X_z}{\log_{10} X_{z+1} - \log_{10} X_z} \right]$$

Fórmula 1. Determinación del Índice de Kovats.

Donde  $X_i$  es el tiempo de retención del componente,  $X_z$  es el tiempo de retención del estándar que eluye previamente y  $X_{z+1}$  es el tiempo de retención del estándar que eluye después del componente de interés. El número 100 corresponde al resultado de multiplicar el n-alcano que eluye antes del componente de interés por 100 y restarlo al n-alcano que eluye posterior al componente de interés (*IUPAC, 2006*).

El IK se determina bajo condiciones isotérmicas. Cuando se analiza en el cromatógrafo de gases con temperatura programada, se puede determinar el índice aritmético. El IA se calcula utilizando directamente los tiempos de retención de los componentes y los estándares de los n-alcenos, en lugar de utilizar sus logaritmos. Para el cálculo del IA, se aplica la fórmula 2:

$$IA = 100 \left( \frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} \right)$$

Fórmula 2. Determinación del índice aritmético.

Donde  $t_{Ri}^T$  es el tiempo de retención del componente,  $t_{Rz}^T$  es el tiempo de retención del estándar que eluyó previo al componente y  $t_{R(z+1)}^T$  es el tiempo de retención del estándar que eluye después del componente de interés. El número 100 corresponde al resultado de multiplicar el n-alceno que eluye antes del componente de interés por 100 y restarlo al n-alceno que eluye posterior al componente de interés (IUPAC, 2006).

El análisis cuantitativo del porcentaje de área de cada aceite esencial se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (FID por sus siglas en inglés) marca Perkin Elmer Autosystem XL con inyector split/splitless. Este análisis, se realizó utilizando una columna HP-5 MS (30 m x 0,32 mm, 0,25  $\mu$ m).

Para el aceite de *Magnolia grandiflora* las condiciones del equipo fueron las siguientes: El programa de temperatura del horno fue de 60 °C por 3 min, se elevó la temperatura a 280 °C a razón de 10 °C/min y se mantuvo durante 3 min. La temperatura en el inyector fue de 250 °C con modo split 1:20; el volumen inyectado fue 2  $\mu$ L de una solución de 2 mg/mL en cloruro de metileno. La temperatura del detector fue de 280 °C.

Las fracciones incolora y amarilla del aceite de *Chrysactinia mexicana*, se analizaron en las siguientes condiciones: El programa de temperatura del horno fue 60 °C durante 2 min, se elevó la temperatura a 100 °C a razón de 5 °C/min y se mantuvo por 2 min. La temperatura se elevó hasta 150 °C a razón de 5 °C/min y se mantuvo durante 2 min. Al final la temperatura se elevó hasta 200 °C a razón de 11°C/min. La temperatura en el inyector fue de 250 °C con modo split 1:20; el volumen inyectado fue de 2 µL de una solución de 2 mg/mL de aceite en cloruro de metileno. La temperatura del detector fue de 280 °C.

Para las fracciones incolora y amarilla del aceite de *Rosmarinus officinalis*, las condiciones del equipo fueron las siguientes: El programa de temperatura del horno fue de 60 °C durante 2 min, se elevó la temperatura a 80 °C a razón de 11 °C/min y se mantuvo por 1 min. La temperatura en el inyector fue de 280 °C con modo de inyección modo split 1:20; el volumen inyectado fue de 2 µL de una solución de aceite de 2 mg/mL en cloruro de metileno. La temperatura del detector fue de 280 °C.

El análisis cuantitativo del aceite de *Thymus vulgaris*, se realizó mediante las siguientes condiciones: El programa de temperatura del horno fue a 60 °C durante 1 min, se elevó la temperatura a 120 °C a razón de 6 °C/min y se mantuvo durante 1 min. De nuevo se elevó la temperatura a hasta 280 °C a razón de 25 °C/min y se mantuvo 1 min. La temperatura en el inyector fue de 250 °C con modo split 1:20; el volumen inyectado fue de 2 µL de una solución de aceite de 2 mg/mL en cloruro de metileno. La temperatura del detector fue de 280 °C.

Las fracciones incolora y amarilla del aceite de *Origanum majorana*, fueron analizadas bajo las siguientes condiciones: El programa de temperatura del horno fue 60 °C durante 1 min, se elevó la temperatura a 140 °C a razón de 8 °C/min y se mantuvo durante 1 min. La temperatura se elevó hasta 250 °C, a razón de 11 °C/min y se mantuvo por 1 min. La temperatura en el inyector fue de 250 °C con modo split 1:20; el volumen inyectado fue de 2 µL de aceite. La temperatura del detector fue de 280 °C.

Para las fracciones incolora y amarilla del aceite de hoja de *Schinus molle*, el programa de temperatura inicial del horno fue 60 °C durante 1 min. La temperatura se elevó a 120 °C a razón de 8 °C/min durante 1 min. Se aumentó la temperatura a 150 °C a razón de 25 °C/min durante 1 min. Posteriormente la temperatura se elevó a 250 °C, a razón de 8 °C/min durante 1 min. La temperatura en el inyector fue de 280 °C con modo split 1:20; el volumen inyectado fue de 2 µL de una solución de aceite de 2 mg/mL en cloruro de metileno. La temperatura del detector fue de 280 °C. Este método también fue utilizado para las fracciones incolora y amarilla del aceite de fruto de *Schinus molle*.

El porcentaje de área (% *A*) de cada componente se calculó mediante normalización de áreas. Para calcularlo se suman las áreas totales obtenidas y se divide entre el área de cada pico cromatográfico que proporciona el equipo (fórmula 3):

$$\% A = 100 \left( \frac{\text{Área de componente}}{\text{Áreas totales}} \right)$$

Fórmula 3. Normalización de áreas.

## 2.5 Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH

Se determinó el porcentaje de reducción del radical libre por espectroscopia de Ultravioleta-visible de acuerdo al método utilizado por Salazar-Aranda (2009). Se prepararon soluciones de cada uno de los aceites en etanol a una concentración de 1 mg/mL. Para cada aceite se colocaron 500 µL de etanol y se realizaron diluciones seriadas de emulsión de aceite para

obtener un rango de concentraciones de 250 a 0.24 µg/mL. Se añadieron 500 µL de la solución de DPPH (125 µM). La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad. Además se incluyó el timol y el carvacrol puro en un rango de concentraciones de 250 a 0.24 µg/mL. La quercetina, la rutina y el pirocatecol como controles positivos en un rango de concentraciones de 250 a 0.01 µg/mL y una solución de referencia de DPPH a 62.5 mM.

La lectura espectrofotométrica se realizó a  $\lambda = 517$  nm en una celda de cuarzo con un equipo Beckman DU 7500 con arreglo de diodos. El porcentaje de reducción de DPPH se calculó mediante la fórmula 4:

$$\% \text{ Reducción DPPH} = 100 \left[ \frac{(A-B)}{A} \right]$$

Fórmula 4. Porcentaje de reducción de DPPH.

Donde A corresponde al promedio de la absorbancia de 2 soluciones de referencia de DPPH, leídas antes de comenzar el experimento y al final. B es la absorbancia de cada muestra problema. Posteriormente, se graficó el porcentaje de reducción de DPPH contra las concentraciones utilizadas de aceites. Al obtener la gráfica de correlación, se determinó la ecuación de la recta resultante. Con la ecuación de la recta  $y=mx+b$ , se calcula la concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) de cada aceite (Fórmula 5).

$$CE_{50} = \frac{50 + b}{m}$$

Fórmula 5. Ecuación de la recta para calcular  $CE_{50}$ .

Donde  $b$  corresponde a la intersección de la recta en  $y$ , mientras  $m$  es la pendiente de la recta. La actividad antioxidante con la que se logra el 50 % de reducción DPPH se expresa como  $CE_{50}$ , la concentración de cada extracto, que reduce efectivamente el 50 % del radical libre DPPH.

## 2.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

- Preparación de controles

Controles de Antibióticos: Se prepararon soluciones acuosas a una concentración de 256 µg/mL de vancomicina, la cual se usó como control positivo y de oxacilina empleada como control negativo a la misma concentración. Estas soluciones se esterilizaron por filtración con acrodiscos GHP de 0.22 µm Gelman®.

Control de solvente: El control de solvente se preparó mezclando 200 µL de DMSO concentrado y 800 µL de medio de cultivo.

- Preparación de los inóculos de microorganismos

Las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 y *Staphylococcus aureus* resistente IMSS/HE 25:01 fueron sembradas en placas de agar Muller-Hinton y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después del tiempo de incubación se transfirieron 5 colonias a 3 mL de caldo Muller-Hinton y se incubaron 24 h a 37 °C, 100 µL de este cultivo se transfirieron a 3 mL de caldo Muller-Hinton y se incubaron a 37 °C por 2 a 4 h con agitación a una velocidad de 150 rpm hasta obtener un crecimiento que presentó una turbidez igual al estándar 0.5 de McFarland (0.085 a 0.100 de absorbancia a  $\lambda$  625 nm). A partir de este cultivo se realizó una dilución 1:50 con caldo Muller-Hinton para tener la suspensión de trabajo.

La cepa de *Streptococcus pyogenes* se inoculó en una placa de agar sangre y se incubó a 37 °C por 18 a 24 h. A partir del crecimiento obtenido se preparó una suspensión en solución salina fisiológica (0.85% p/v) con una turbidez igual al estándar 0.5 de McFarland (0.085 a 0.100 de absorbancia a  $\lambda$  = 625 nm); de esta suspensión se preparó una dilución 1:50 con caldo Muller-Hinton catión ajustado suplementando con sangre de caballo lisada (*NCCLS document M-100-S12, 2002*).

- Preparación de soluciones de aceites:

Se pesaron 2 mg de cada aceite y se disolvieron en 200  $\mu$ L de DMSO concentrado, se agitaron en un vortex y posteriormente se añadieron 800  $\mu$ L de medio de cultivo Muller-Hinton.

- Técnica de dilución en placa

Se colocaron 200  $\mu$ L de agua bidestilada esteril en los pozos situados en las 4 orillas de la placa y 100  $\mu$ L de medio de cultivo en los pozos restantes. Posteriormente, se transfirieron 100  $\mu$ L de la solución preparada del aceite a los primeros pozos de cada hilera. Se realizaron diluciones seriadas al doble, descartando los últimos 100  $\mu$ L de cada hilera. En cada placa se incluyeron controles de esterilidad del medio, control de crecimiento, control de solvente, control de muestra y controles positivo y negativo de antibióticos. Las concentraciones para los antibióticos (Vancomicina y Oxacilina) fueron de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.500, 0.250, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.007  $\mu$ g/mL.

El control de esterilidad de medio lleva sólo medio de cultivo y el control de crecimiento lleva medio de cultivo y el microorganismo. Como control de muestra se usaron pozos con las mismas concentraciones de los aceites pero sin microorganismo, mientras que para el control de solvente de aceites se utilizó DMSO. Una vez realizadas las diluciones se añaden 100  $\mu$ L de suspensión de microorganismos (dilución 1:50) a todos los pozos que deben llevarlo. Las concentraciones finales de cada aceite fueron 500, 250, 125, 62.5 y 31.25  $\mu$ g/mL.

Las placas de 96 pozos se colocaron en bolsas de plástico con control de humedad (algodón humedecido con agua) durante 24 h. A las microplacas con cepas de *Staphylococcus aureus*, se les añadió 32  $\mu$ L de una solución de alamar azul (12  $\mu$ L de solución de alamar azul con 20  $\mu$ L de solución salina a cada pozo) y se incubaron a 37 °C durante 1 h para ser reveladas.

Se observó un vire de color de azul a rosa en los pozos donde existió crecimiento microbiano y se mantuvieron de color azul, los pozos sin crecimiento. Para la cepa de *Streptococcus pyogenes*, no fue necesario el uso de una solución de Alamar azul, debido a la composición del medio utilizado; solo se consideró la presencia de turbidez en el pozo como indicador de crecimiento bacteriano.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano (NCCLS document M-100-S12, 2002).

## 2.7 Evaluación de la actividad antimicótica

Se evaluó la actividad contra los dermatofitos *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton mentagrophyton*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum* que fueron obtenidos de aislados clínicos. Para evaluar la actividad antimicótica de los aceites se realizaron experimentos preliminares de difusión, con el objetivo de identificar los aceites con actividad y descartar aquellos que no resultaran activos. Los aceites que demostraron alguna inhibición contra alguna de las 6 cepas de hongos dermatofitos, fueron analizados mediante 4 diferentes métodos de difusión para conocer su capacidad de inhibición.

- Prueba preliminar: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con microcultivo.

Se prepararon inóculos de cada una de las cepas de dermatofitos. Para lo cual, los hongos, *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton mentagrophyton*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum*, se sembraron en APD. Se incubaron a 30 °C por 7 días; después del tiempo de incubación, a cada placa se le añadió 1 mL de solución salina al 0.85%. Se removió cuidadosamente con un hisopo estéril todas las conidias

jóvenes de cada cultivo. Se repitió de dos a tres veces esta acción hasta conseguir una suspensión equivalente al estándar 0.5 de McFarland. La suspensión de cada dermatofito, se inoculó uniformemente, en una placa de APD. Se incubaron a 30 °C durante 2 ó 5 días.

Se removieron los microcultivos ya crecidos en forma de círculo con ayuda de un sacabocados circular de 6 mm de diámetro. Ambos se dispusieron sobre una placa de APD. Un inóculo removido fue utilizado como control de crecimiento del dermatofito; mientras que el otro se dispuso un papel filtro con 5 µL de cada aceite esencial. Se incubaron a 30 °C durante 7 días. Después de determinar la actividad de cada uno de los aceites con ésta prueba preliminar se realizaron los experimentos de difusión.

- Experimento 1: Prueba de susceptibilidad antifúngica por la técnica de difusión en placa con disco.

Se sembraron *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton mentagrophyton*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum* en agar patata dextrosa y se incubaron a 30 °C por 7 días. Después del tiempo de incubación a cada placa se le añadió 1 mL de solución salina al 0.85% y se removieron cuidadosamente con un hisopo estéril todas las conidias jóvenes de cada cultivo. Se repitió de dos a tres veces esta acción hasta conseguir una suspensión equivalente al estándar 0.5 de McFarland. Con la cual se inoculó superficialmente una placa de APD presionando firmemente un hisopo contra la superficie de la placa. Se dejó secar la placa con el inóculo durante 5 minutos.

La placa se dividió en dos secciones. Una se utilizó como control de crecimiento y sobre la otra se dispuso un papel filtro con 5 µL de cada aceite esencial. Se incubaron a 30 °C por 48 h. Transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición en mm (*CLSI documento M44-A2,2010*).

- Experimento 2: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con disco en cultivo con crecimiento previo de 24 h.

Se sembraron *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton mentagrophyton*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum* en agar patata dextrosa y se incubaron a 30 °C por 7 días. Después del tiempo de incubación, a cada placa se le añadió 1 mL de solución salina al 0.85% y se removieron cuidadosamente con un hisopo estéril todas las conidias jóvenes de cada cultivo. Se repitió de dos a tres veces esta acción hasta conseguir una suspensión turbia equivalente al estándar 0.5 de McFarland, con la cual se inoculó superficialmente una placa de APD presionando firmemente un hisopo contra la superficie de la placa. La placa con el inóculo se dejó secar. Se incubó a 30 °C por 24 h o 48 h dependiendo del crecimiento del inóculo. La placa se dividió en dos secciones, una se utilizó como control de crecimiento y sobre la otra, se dispuso un papel filtro con 5 µL de cada aceite esencial. Se incubaron a 30 °C por 48 h. Transcurrido este tiempo, se midió el halo de inhibición en mm. (*adaptación CLSI documento M44-A2,2010*).

- Experimento 3: Prueba de susceptibilidad antifúngica por difusión en placa con pozo.

Se sembraron *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton mentagrophyton*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum* en agar patata dextrosa y se incubaron a 30 °C por 7 días. Después del tiempo de incubación, a cada placa se le añadió 1 mL de solución salina al 0.85% y se removieron cuidadosamente con un hisopo estéril todas las conidias jóvenes de cada cultivo. Se repitió de dos a tres veces esta acción hasta conseguir una suspensión turbia equivalente al estándar 0.5 de McFarland, con la cual se inoculó superficialmente una placa de APD presionando firmemente un hisopo contra la superficie de la placa. Se dejó secar la placa con el inóculo durante 5 minutos. La placa se dividió en dos secciones, en una sección se removió con sacabocado circular parte del agar,

generando un pozo de 6 mm, donde se dispusieron 5  $\mu$ L de cada aceite esencial. La otra sección se utilizó como control de crecimiento. Se incubaron a 30 °C por 48 h. Transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición en mm. (*adaptación CLSI documento M44-A2,2010*).

- Experimento 4: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante inhibición de crecimiento por compuestos volátiles

Se sembraron *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton mentagrophyton*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum* en agar patata dextrosa y se incubaron a 30 °C por 7 días. Después del tiempo de incubación a cada placa se le añadió 1 mL de solución salina al 0.85% y se removieron cuidadosamente con un hisopo estéril todas las conidias jóvenes de cada cultivo. Se repitió de dos a tres veces esta acción hasta conseguir una suspensión turbia equivalente al estándar 0.5 de McFarland. Con la cual, se inoculó superficialmente una placa de APD presionando firmemente un hisopo contra la superficie de la placa. La placa con el inóculo se dejó secar. Sobre la cubierta de la placa inoculada se colocó un papel filtro con 5  $\mu$ L de cada aceite esencial. Se incubaron a 30 °C, después de 48 h. Transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición en mm (*adaptación CLSI documento M44-A2,2010*).

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Colecta de plantas.

De la planta *Magnolia grandiflora* se colectaron 983 g de hojas. Las plantas de *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* y *Oreganum majorana*, se colectaron 461 g, 450 g y 420 g de hoja de cada planta respectivamente. De *Chrysactinia mexicana* se colectaron 350 g de hojas del arbusto. De *Schinus molle* se colectaron por separado sus frutos y hojas, 1001 g y 815 g, respectivamente (Tabla II).

**Tabla II. Aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación y porcentaje de recuperación**

Planta utilizada	Fracción obtenida	Cantidad de planta puesta (g)	Cantidad de aceite obtenido (g)	Porcentaje de recuperación (%)
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	984	1.64	0.16
<i>Chrysactinia mexicana</i>	incolora	350	4.65	1.33
	amarilla	350	0.22	0.06
<i>Rosmarinus officinalis</i>	incolora	450	1.31	0.29
	amarilla	450	0.83	0.18
<i>Thymus vulgaris</i>	única	461	1.05	0.22
<i>Oreganum majorana</i>	incolora	420	0.30	0.07
	amarilla	420	0.42	0.10
Hoja <i>Schinus molle</i>	incolora	815	2.29	0.28
	amarilla	815	0.96	0.11
Fruto <i>Schinus molle</i>	incolora	1001	19.35	1.93
	amarilla	1001	3.92	0.39

### 3.2 Obtención de aceites esenciales.

Cada una de las plantas fue molida, pesada y posteriormente puesta a hidrodestilación. Del aceite de *Magnolia grandiflora* se obtuvieron 1.64 g. Del aceite de las hojas de *Chrysactinia mexicana* se obtuvieron 2 fracciones, 4.65 g de la fracción incolora y 0.22 g de la fracción amarilla. De las hojas de *Rosmarinus officinalis* se obtuvieron dos fracciones de aceite, una incolora y otra amarilla de las cuales se recuperaron 1.31 y 0.83 g respectivamente. De las hojas de *Thymus vulgaris* se recuperaron 1.05 g de aceite. Las hojas de *Oreganum majorana* generaron una fracción amarilla y otra incolora, de las cuales se recuperaron 0.30 g y 0.42 g respectivamente. Se obtuvieron aceites de las hojas y frutos de *Schinus molle*. El aceite de las hojas se colectó en 2 fracciones, 2.29 g de la fracción incolora y 0.96 g de fracción amarilla. De igual manera se recuperaron 2 fracciones del aceite del fruto de *Schinus molle*, una fracción amarilla de 19.35 g y una fracción incolora de 3.92 g. A partir de los gramos pesados de cada aceite o fracción de aceite de las plantas se obtuvo el porcentaje de recuperación reportado en la Tabla II. El aceite con mayor porcentaje de recuperación fue la fracción incolora del aceite del fruto de *Schinus molle* 1.94%. Mientras que el aceite con menor porcentaje de recuperación fue la fracción amarilla del aceite de *Chrysactinia mexicana gray* 0.06%.

3.3 Análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y cromatografía de gases con detector de ionización a la flama.

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* fue analizado por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM). En el cromatograma del aceite esencial del *Thymus vulgaris* (figura 3). Se detectaron 17 señales, las cuales pudieron ser identificados. Los compuestos de mayor porcentaje de área son: o-cimeno con 37.10%,  $\gamma$ -terpineno con un área de 19.98% y timol con 17.03% (Tabla III).

El porcentaje total muestra que los monoterpenos alifáticos fue 47.05% como los de mayor porcentaje (Tabla III).

**Tabla III. Constituyentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.51	$\alpha$ -tujeno	0.69	926	923	924	Monoterpeno alifático
18.83	$\alpha$ -pineno	0.87	932	928	932	Monoterpeno alifático
19.72	camfeno	0.68	946	943	946	Monoterpeno alifático
21.48	sabineno	0.04	974	971	969	Monoterpeno alifático
22.02	3-octenol	0.04	982	980	974	Alcohol
22.62	mircenol	2.08	991	989	988	Monoterpeno alifático
23.98	$\alpha$ - terpineno	1.11	1013	1012	1014	Monoterpeno alifático
24.51	o- cimeno	37.10	1024	1022	1022	Monoterpeno alifático
26.45	$\gamma$ -terpineno	19.98	1059	1057	1054	Monoterpeno alifático
28.75	linalool	6.15	1098	1099	1095	Monoterpeno oxigenado
30.95	camfor	0.15	1143	1141	1141	Monoterpeno oxigenado
32.06	borneol	1.87	1165	1162	1165	Monoterpeno oxigenado
32.66	4-terpinenol	4.06	1176	1173	1174	Monoterpeno oxigenado
35.93	carvacrol, metil éter	1.26	1244	1242	1241	Monoterpeno oxigenado
38.3	timol	17.03	1293	1292	1289	Monoterpeno oxigenado
38.64	carvacrol	4.89	1299	1299	1298	Monoterpeno oxigenado
43.83	E-cariofileno	2.00	1419	1418	1417	Sesquiterpeno alifático
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		47.05				
Monoterpenos oxigenados		41.17				
Sesquiterpenos alifáticos		5.88				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams, R., 2002.

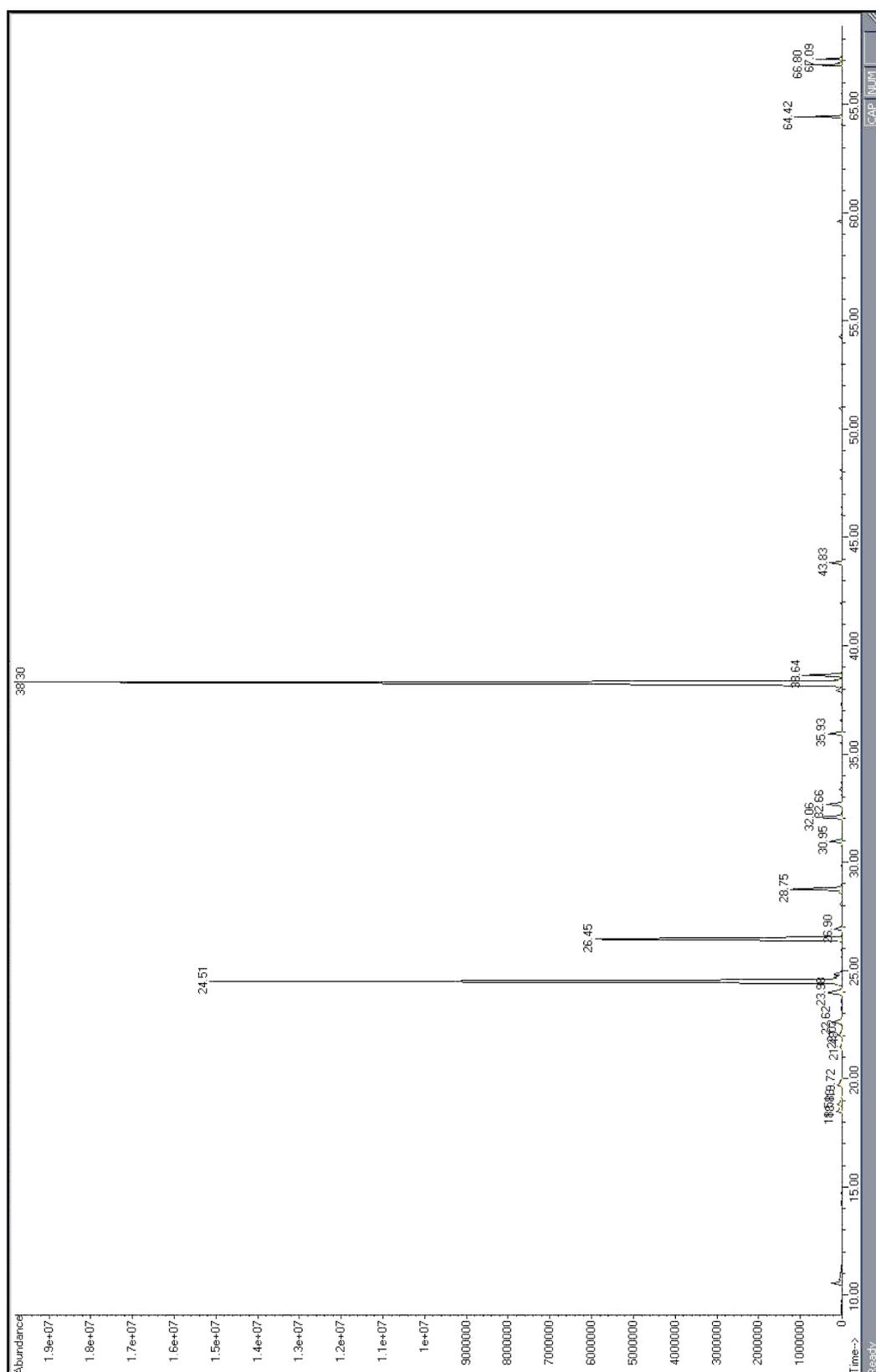


Figura 3. Cromatograma CG-EM del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

En el cromatograma de gases masas del aceite de *Magnolia grandiflora* (figura 4), se observan 33 señales de las cuales 31 fueron identificados. Los componentes mayoritarios son: bornil acetato con un 20.92 % y E-cariofileno con 15.10% (Tabla IV).

El porcentaje total muestra a los sesquiterpenos alifáticos con 43.75% como compuestos de mayor porcentaje (Tabla IV).

**Tabla IV. Constituyentes del aceite esencial de *Magnolia grandiflora* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.85	α-pineno	0.84	933	929	932	Monoterpeno alifático
19.75	camfeno	1.55	947	943	946	Monoterpeno alifático
21.53	β-pineno	4.53	975	972	974	Monoterpeno alifático
22.33	No se identifica	0.99	985	984	-	-
24.68	limoneno	1.87	1027	1025	1024	Monoterpeno alifático
24.81	eucaliptol	2.18	1029	1027	1026	Monoterpeno oxigenado
28.02	terpinoleno	0.52	1086	1085	1086	Monoterpeno alifático
28.76	linalool	1.95	1098	1098	1095	Monoterpeno oxigenado
29.65	No se identifica	2.85	1116	1115	-	-
30.98	camfor	5.53	1143	1141	1141	Monoterpeno oxigenado
32.06	isoborneol	0.93	1165	1163	1165	Monoterpeno oxigenado
33.34	α-terpineol	0.93	1189	1188	1186	Monoterpeno oxigenado
38.03	bornil acetato	20.92	1287	1287	1284	Monoterpeno oxigenado
40.25	δ- elemeno	0.58	1337	1336	1335	Sesquiterpeno alifático
42.36	No se identifica	1.38	1385	1384	-	-
42.77	β- elemeno	0.82	1394	1394	1389	Sesquiterpeno alifático
43.45	E-cariofileno	15.10	1410	1410	1409	Sesquiterpeno alifático
43.63	No se identifica	0.48	1414	1414	-	-
43.9	-4,8 β- epoxy-cariofileno	0.24	1421	1420	1423	Sesquiterpeno alifático
44.25	No se identifica	0.56	1429	1428	-	-
44.41	γ- elemeno	0.24	1434	1433	1434	Sesquiterpeno alifático
44.63	α-guaieno	6.79	1439	1438	1437	Sesquiterpeno alifático
45.28	allo- aromadendreno	2.32	1455	1454	1458	Sesquiterpeno alifático
45.5	9-epi-E-cariofileno	4.10	1460	1459	1466	Sesquiterpeno alifático
46.47	germacreno D	8.40	1483	1487	1480	Sesquiterpeno alifático
46.65	β-selineno	0.87	1487	1487	1489	Sesquiterpeno alifático
47.13	germacreno A	2.55	1490	1498	1508	Sesquiterpeno alifático
47.43	β- bisaboleno	1.52	1505	1505	1505	Sesquiterpeno alifático
47.76	γ-cadineno	1.27	1512	1512	1513	Sesquiterpeno alifático
48.19	δ-cadineno	0.96	1522	1521	1522	Sesquiterpeno oxigenado
49.94	nerolidol -E	0.42	1559	1558	1561	Sesquiterpeno alifático
50.71	espatulenol	3.10	1575	1574	1577	Sesquiterpeno oxigenado
51.04	globulol	2.71	1582	1581	1590	Sesquiterpeno oxigenado
TOTAL		100%				
Monoterpenos alifáticos		15.62				
Monoterpenos oxigenados		18.75				
Sesquiterpeno alifáticos		43.75				
Sesquiterpeno oxigenados		9.37				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> índice aritmético reportado por Adams, R., 2002.

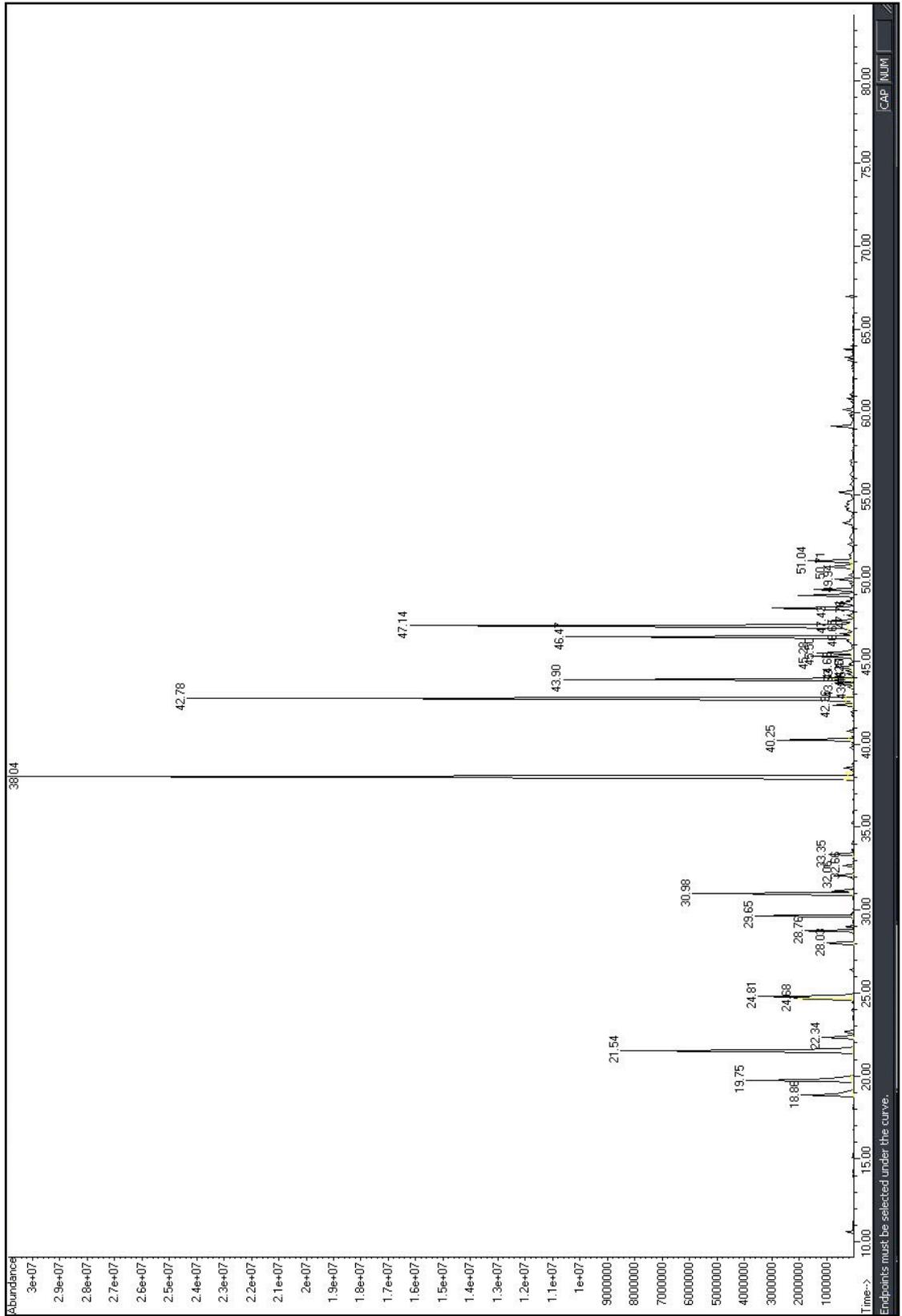


Figura 4. Cromatograma CG-EM del aceite esencial de *Magnolia grandiflora*.

Para el aceite de *Rosmarinus officinalis* se analizó la fracción incolora y la fracción amarilla. En el cromatograma de gases correspondiente a la fracción incolora de *Rosmarinus officinalis* (figura 5) muestra 15 señales, de las cuales 14 fueron identificadas. Los componentes con mayoritarios fueron el borneol con 45.89% y el 1, 8-cineol con 23.77% (Tabla V).

El porcentaje total muestra que el 46.66 % son monoterpenos oxigenados (Tabla V).

**Tabla V. Constituyentes de la fracción incolora del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.84	$\alpha$ -pineno	3.81	932	928	932	Monoterpeno alifático
19.71	camfeno	2.17	946	942	946	Monoterpeno alifático
22.03	3-octenol	1.32	982	979	974	Alcohol octílico
22.63	mircenol	1.79	991	989	988	Monoterpeno alifático
23.23	$\alpha$ -felandreno	2.75	999	999	1002	Monoterpeno alifático
24.46	p- cimeno	2.43	1023	1020	1020	Monoterpeno alifático
24.67	$\beta$ -felandreno	8.41	1027	1025	1026	Monoterpeno alifático
24.84	1, 8-cineol	23.77	1029	1027	1029	Monoterpeno oxigenado
26.42	$\gamma$ -terpineno	1.05	1058	1056	1054	Monoterpeno oxigenado
28.75	linalol	0.38	1098	1098	1095	Monoterpeno oxigenado
31.04	camfor	0.93	1144	1142	1141	Monoterpeno oxigenado
32.66	borneol	45.89	1176	1174	1177	Monoterpeno oxigenado
33.34	No identificado	3.24	1189	1188	-	-
34.25	verbenona	1.44	1206	1206	1204	Monoterpeno oxigenado
37.91	isobornil acetato	0.63	1285	1284	1283	Monoterpeno oxigenado
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		40				
Monoterpenos oxigenados		46.66				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams, R., 2002.

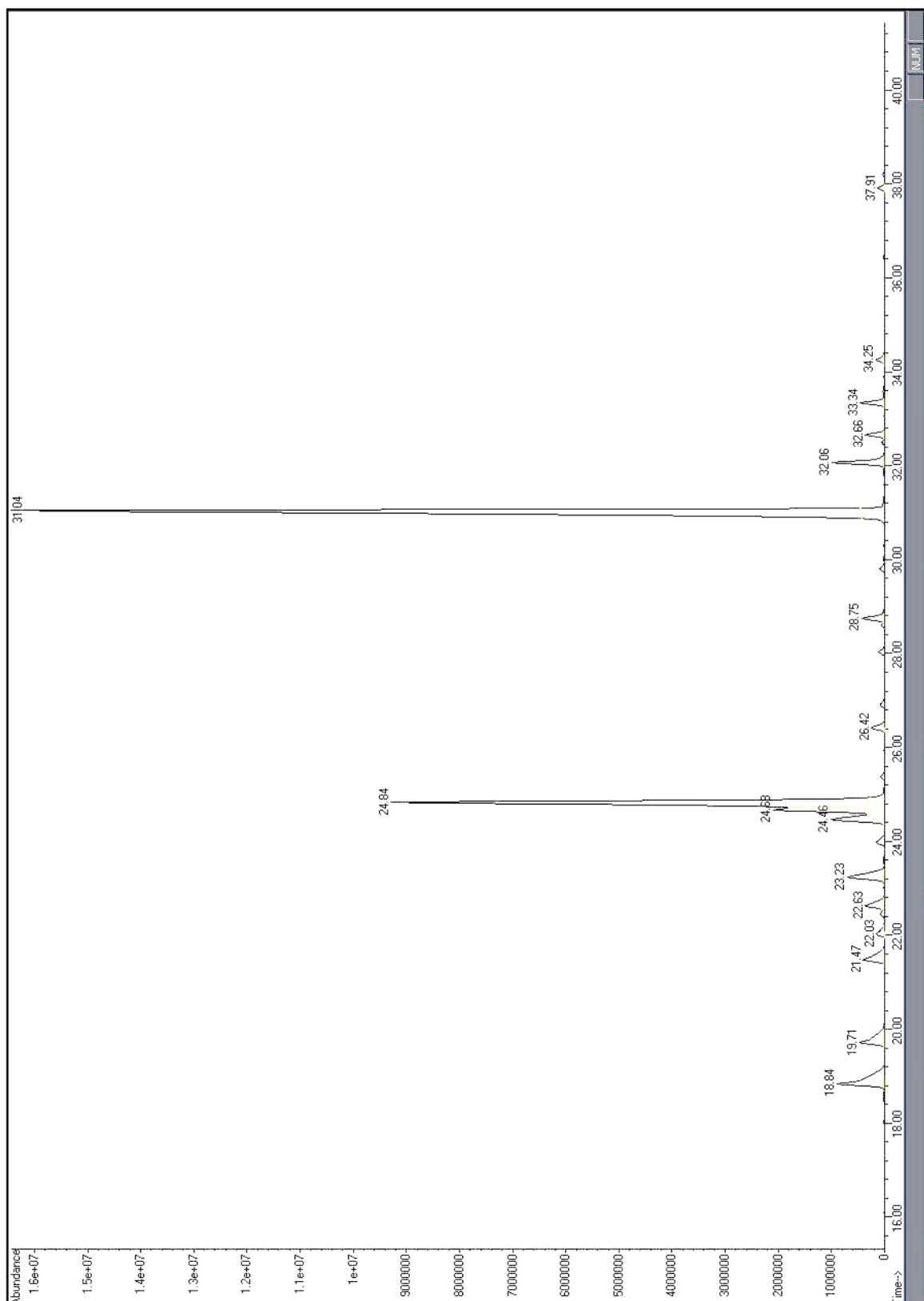


Figura 5. Cromatograma CG-EM de la fracción incolora del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

El cromatograma de gases de la fracción amarilla del aceite de *Rosmarinus officinalis* (figura 6), muestra 16 señales de las cuales fueron identificados 13. El cromatograma mostró al borneol con 87.59 % de área, como componente mayoritario (Tabla VI).

El porcentaje total muestra un 50 % de monoterpenos alifáticos (Tabla VI).

**Tabla VI. Constituyentes de la fracción amarilla del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* obtenido por CG/EM.**

T.R.(min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.85	$\alpha$ -pineno	1.49	932	929	932	Monoterpeno alifático
19.71	camfeno	0.87	946	942	946	Monoterpeno alifático
21.47	$\beta$ -pineno	0.77	974	971	974	Monoterpeno alifático
22.03	mirceno	0.94	982	980	988	Monoterpeno alifático
22.63	$\alpha$ -felandreno	1.18	991	989	1002	Monoterpeno alifático
23.24	$p$ -cimeno	0.29	999	999	1020	Monoterpeno alifático
24.69	$\beta$ -felandreno	1.31	1023	1021	1026	Monoterpeno alifático
24.81	eucaliptol	2.29	1027	1025	1029	Monoterpeno oxigenado
26.42	$\gamma$ -terpineno	0.47	1059	1056	1054	Monoterpeno alifático
28.75	No se identifica	0.21	1098	1097	-	-
31.01	camfor	0.32	1144	1142	1141	Monoterpeno oxigenado
32.06	isoborneol	0.17	1164	1163	1165	Monoterpeno oxigenado
32.66	borneol	87.59	1176	1174	1177	Monoterpeno oxigenado
33.34	$\alpha$ -terpineol	1.19	1188	1188	1186	Monoterpeno oxigenado
34.25	No se identifica	0.40	1205	1206	-	-
37.91	No se identifica	0.56	1286	1284	-	-
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		50				
Monoterpenos oxigenados		31.25				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams, R., 2002.

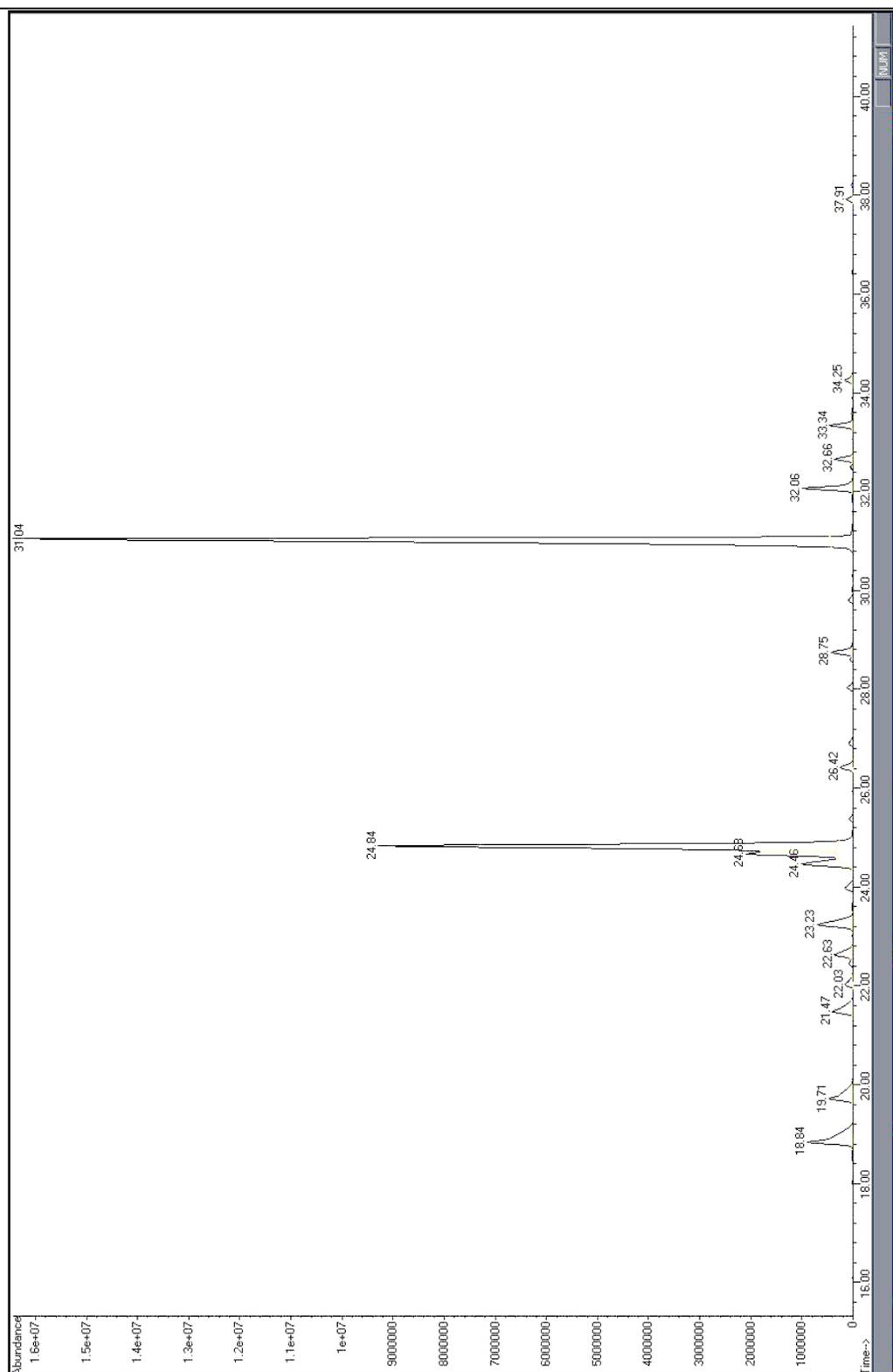


Figura 6. Cromatograma CG-EM de la fracción amarilla del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

Se analizaron las 2 fracciones de aceite, de la hoja de *Chrysactinia mexicana* Gray. En el cromatograma de la fracción incolora de *Chrysactinia mexicana* Gray (figura 7) se observan 26 señales, de las cuales 18 fueron identificadas. El componente mayoritario fue el silvesteno con un área de 36.77% (Tabla VII).

El porcentaje total de componentes son sesquiterpenos alifáticos con 26.92% (Tabla VII).

**Tabla VII. Constituyentes de la fracción incolora del aceite de *Chrysactinia mexicana* G. obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
22.66	β-mirceno	5.73	991	989	988	Monoterpeno alifático
23.26	α-felandreno	6.57	999	999	1002	Monoterpeno alifático
24.70	o-cimeno	3.44	1023	1021	1022	Monoterpeno alifático
24.78	silvestreno	36.77	1027	1025	1025	Monoterpeno alifático
30.08	metil octanoato	0.66	1125	1123	1123	Éster
33.80	No se identifica	0.93	1197	1197	-	-
38.62	timol	0.60	1299	1299	1289	Monoterpeno oxigenado
39.29	No se identifica	0.52	1315	1314	-	-
42.66	β-elemeno	1.79	1391	1391	1389	Sesquiterpeno alifático
43.42	α-gurjuneno	1.38	1409	1408	1409	Sesquiterpeno alifático
43.86	-4, 8,β-epoxicariofileno	5.36	1420	1419	1423	Sesquiterpeno alifático
45.26	α-humuleno	1.31	1454	1453	1454	Sesquiterpeno alifático
46.22	α-amorfeno	1.07	1477	1476	1483	Sesquiterpeno alifático
46.43	germacreno- D	2.52	1482	1481	1480	Sesquiterpeno alifático
47.20	No se identifica	4.12	1500	1500	-	-
47.70	No se identifica	4.19	1511	1511	-	-
48.26	δ- cadineno	0.00	1523	1522	1522	Sesquiterpeno alifático
48.77	α-copaen-11-ol	0.81	1534	1533		Sesquiterpeno oxigenado
49.28	hedicariol	1.13	1545	1544	1546	Sesquiterpeno oxigenado
49.75	palustrol	0.52	1555	1554	1567	Sesquiterpeno oxigenado
50.60	No se identifica	0.59	1565	1563	-	-
50.50	No se identifica	1.12	1571	1569	-	-
51.44	No se identifica	1.17	1590	1589	-	-
54.43	epi-α-muurolol	6.41	1639	1638	1640	Sesquiterpeno oxigenado
55.32	α.-cadinol	8.89	1652	1651	1652	Sesquiterpeno oxigenado
57.75	shibunol	1.69	1688.53	1687	1688	Sesquiterpeno oxigenado
TOTAL						
Monoterpenos alifáticos		15.38				
Monoterpenos oxigenados		3.84				
Sesquiterpenos alifáticos		26.92				
Monoterpenos oxigenados		23.07				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams, R., 2002.

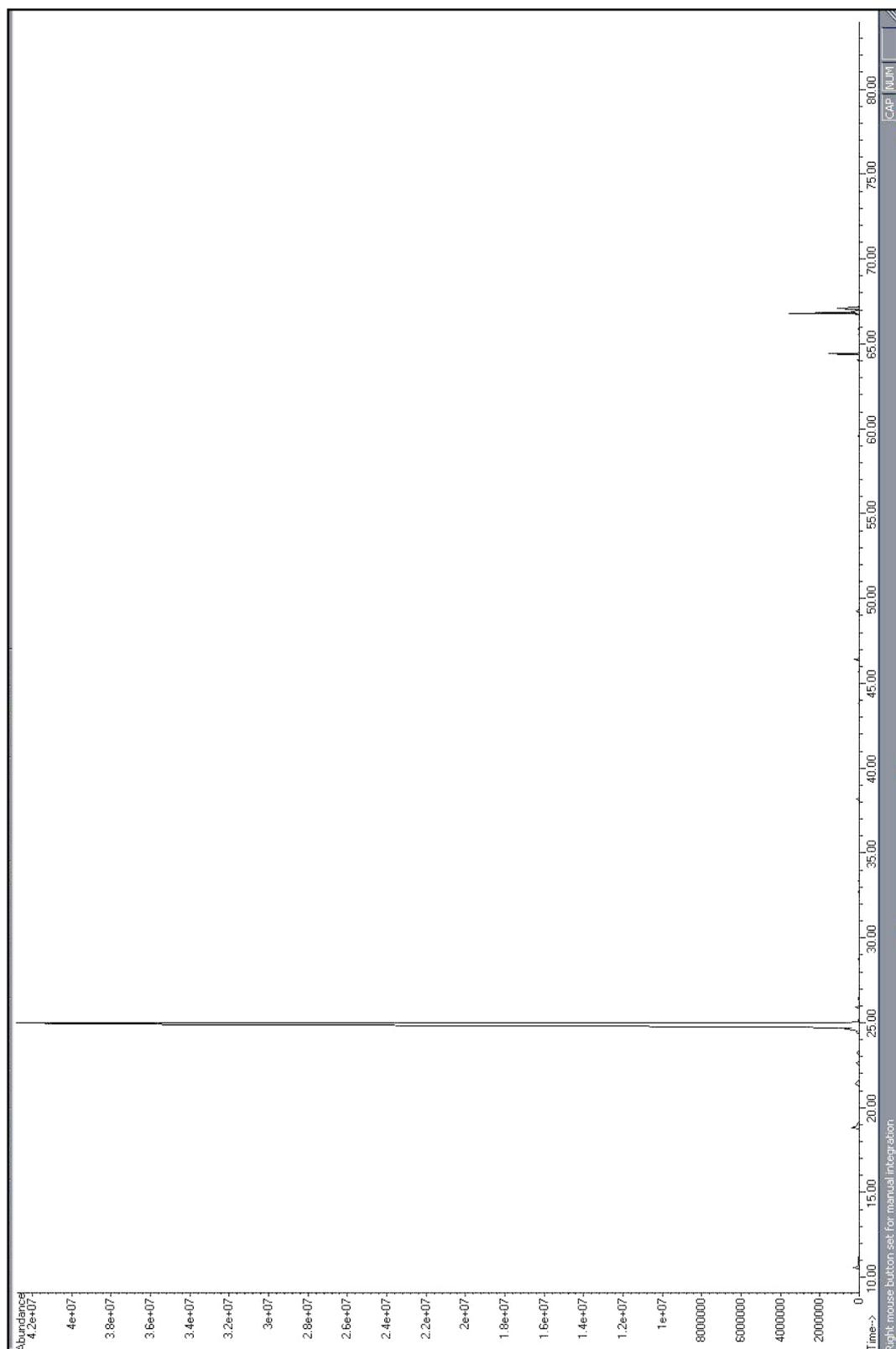


Figura 7. Cromatograma CG-EM de la fracción incolora del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray.

El cromatograma de la fracción amarilla de *Chrysactinia mexicana* Gray (figura 8) muestra 11 señales de las cuales todas fueron identificadas (Tabla VIII). Los componentes mayoritarios son silvestreno con 41.08% y el limoneno con 26.08%. El porcentaje total de los componentes son monoterpenos alifáticos con 63.63% (Tabla VIII).

**Tabla VIII. Constituyentes de la fracción amarilla del aceite de *Chrysactinia mexicana* G. obtenido por CG/EM.**

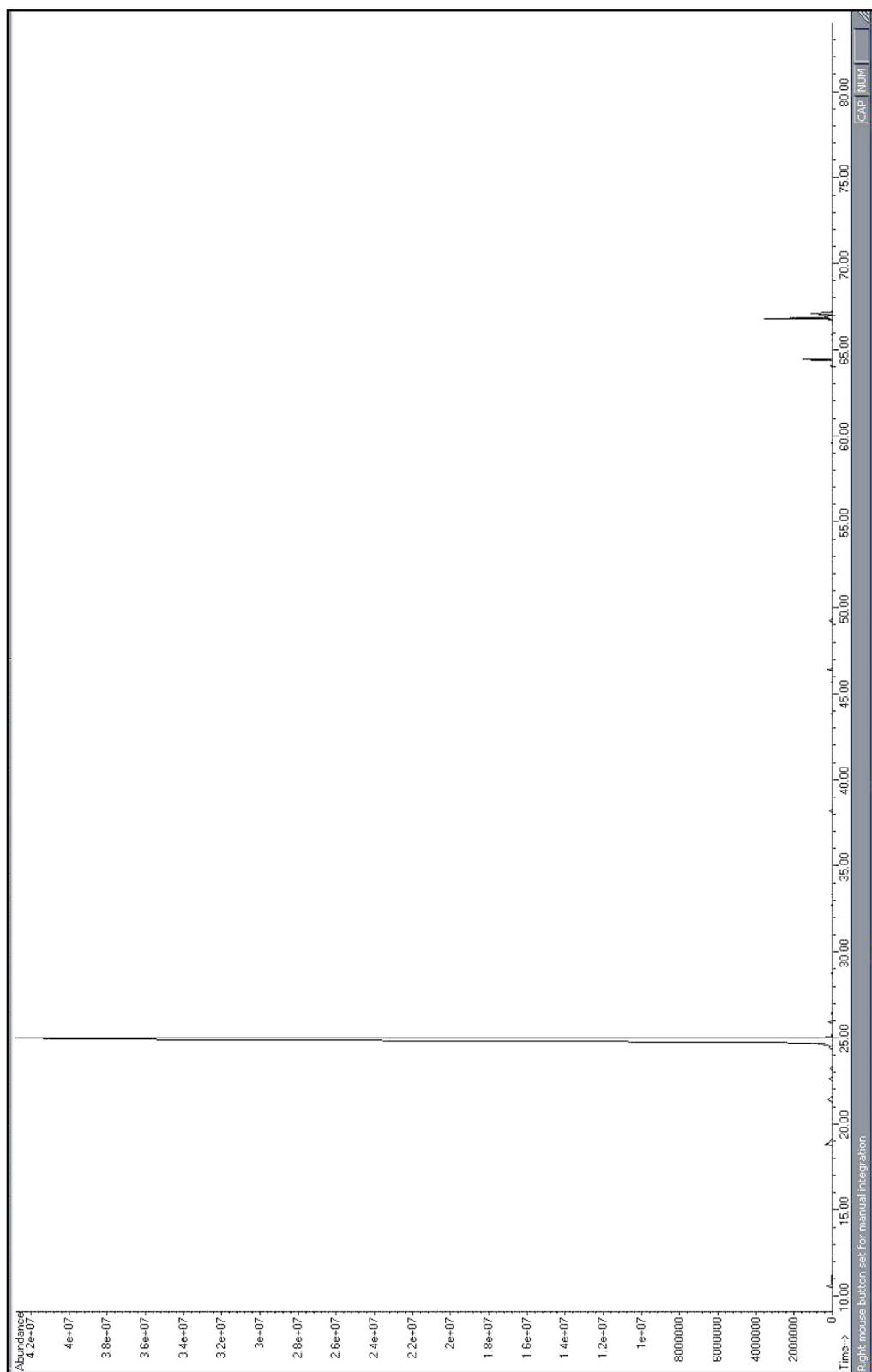
T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.85	α-pineno	7.43	932	929	932	Monoterpeno alifático
21.44	α-felandreno	4.38	973	970	1002	Monoterpeno alifático
22.63	mirreno	4.12	991	989	988	Monoterpeno alifático
23.24	β-pineno	2.60	999	999	974	Monoterpeno alifático
24.70	limoneno	26.08	1019	1023	1024	Monoterpeno alifático
24.86	silvestreno	41.08	1030	1028	1026	Monoterpeno oxigenado
25.93	E-β-ocimeno	1.31	1049	1047	1044	Monoterpeno alifático
26.42	γ-terpineno	1.69	1058	1056	1054	Monoterpeno alifático
32.65	terpinen-4-ol	1.44	1175	1174	1174	Monoterpeno oxigenado
46.41	germacreno D	4.54	1481	1481	1480	Sesquiterpeno alifático
49.27	hedicariol	5.32	1545	1543	1546	Sesquiterpeno oxigenado
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		63.63				
Monoterpenos oxigenados		18.18				
Sesquiterpeno alifático		9.09				
Sesquiterpeno oxigenado		9.09				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams R., 2002.



**Figura 8. Cromatograma CG-EM de la fracción amarilla del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray.**

Las 2 fracciones del aceite de *Oreganum majorana* fueron analizadas. En el cromatograma de gases de la fracción incolora de *Oreganum majorana* (figura 9) presenta 20 señales de los cuales 17 han sido identificadas. Los componentes mayoritarios son terpinen-4-ol con 23.11%, el timol con 16.32% y el trans- hidrato sabineno con 15.25 % (Tabla IX).

El porcentaje total de los componentes son monoterpenos oxigenados con un 45% (Tabla IX).

**Tabla IX. Constituyentes de la fracción incolora del aceite esencial de *Origanum majorana* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
21.40	sabineno	1.03	929	969	969	Monoterpeno alifático
22.62	mircenol	0.89	990	989	988	Monoterpeno alifático
23.98	α-terpineno	3.36	1009	1011	1014	Monoterpeno alifático
24.46	p- cimeno	5.46	1022	1021	1020	Monoterpeno alifático
25.37	E-β- ocimeno	2.10	1039	1037	1044	Monoterpeno alifático
26.44	γ- terpineno	11.49	1059	1056	1054	Monoterpeno alifático
26.88	cis- hidrato sabineno	3.04	1066	1064	1065	Monoterpeno alifático
28.03	terpinoleno	2.22	1086	1085	1086	Monoterpeno alifático
28.58	trans- hidrato sabineno	15.25	1095	1095	1098	Monoterpeno alifático
29.79	deshidro-sabinen cetona	0.48	1119	1118	1117	Monoterpeno oxigenado
30.26	allo-ocimeno	1.86	1129	1127	1128	Monoterpeno alifático
32.06	borneol	0.65	1164	1162	1165	Monoterpeno oxigenado
32,71	terpinen-4-ol	23.11	1177	1175	1174	Monoterpeno oxigenado
33.34	α-terpineol	4.54	1188	1187	1186	Monoterpeno oxigenado
35.50	timol, metil éter	3.36	1234	1232	1232	Monoterpeno oxigenado
35.94	anetol	2.60	1243	1242	-	Monoterpeno oxigenado
38.24	timol	16.32	1291	1291	1289	Monoterpeno oxigenado
41.44	No se identifica	0.73	1364	1363	-	-
43.82	No se identifica	0.76	1419	1418	-	-
62.17	No se identifica	0.74	1808	1808	-	-
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		45				
Monoterpenos oxigenados		35				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams R., 2002.

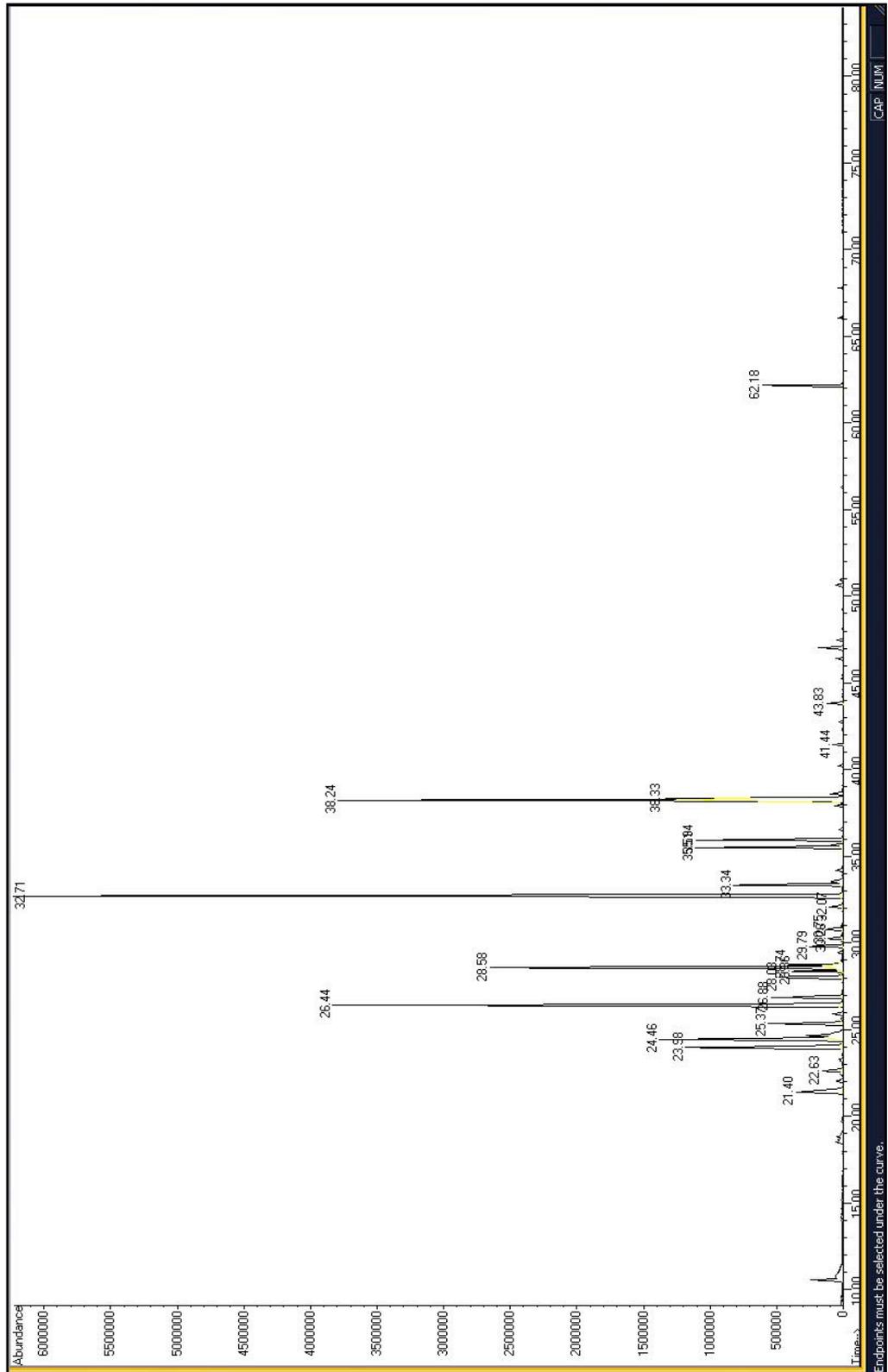


Figura 9. Cromatograma CG-EM de la fracción incolora del aceite esencial de *Origanum majorana*.

En el cromatograma de gases correspondiente a la fracción amarilla, del aceite de *Origanum majorana* (figura 10) se observan 19 señales, de las cuales se identificaron 18 señales. Los componentes mayoritarios son el terpinen-4-ol con 27.72% y el timol con 26.64% (Tabla X).

El porcentaje total de los componentes son monoterpenos oxigenados con 42% (Tabla X).

**Tabla X. Constituyentes de la fracción amarilla del aceite esencial de *Origanum majorana* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
23.99	δ- careno	0.72	1009	1011	1008	Monoterpeno alifático
24.48	o- cimeno	0.82	1023	1021	1022	Monoterpeno alifático
25.37	β -ocimeno	1.50	1039	1037	1032	Monoterpeno alifático
26.47	γ- terpineno	4.66	1059	1056	1054	Monoterpeno alifático
26.88	No se identifica	2.89	1066	1064	-	-
28.03	terpinoleno	2.11	1086	1084	1086	Monoterpeno alifático
28.56	β-terpineol	10.49	1095	1094	-	Monoterpeno oxigenado
29.78	cis-p- ment-2-en-1-ol	1.60	1119	1118	1118	Monoterpeno oxigenado
30.73	β-trans-dihidro terpineol	3.60	1138	1137	1138	Monoterpeno oxigenado
32.8	terpinen-4-ol	27.72	1178	1177	1174	Monoterpeno oxigenado
33.36	α- terpineol	1.43	1189	1188	1186	Monoterpeno oxigenado
35.51	timol metil éter	3.93	1234	1233	1232	Monoterpeno oxigenado
35.94	carvacrol metil éter	4.55	1243	1242	1241	Monoterpeno oxigenado
38.29	Timol	24.64	1292	1292	1289	Monoterpeno oxigenado
43.81	-4,8,β,epoxi-cariofileno	3.49	1419	1418	1424	Sesquiterpeno alifático
46.39	germacreno-D	1.02	1481	1480	1480	Sesquiterpeno alifático
47.02	biciclogermacreno	1.87	1496	1496	1500	Sesquiterpeno alifático
47.47	β- bisaboleno	1.28	1506	1505	1505	Sesquiterpeno alifático
50.65	globulol	1.67	1574	1573	1590	Sesquiterpeno oxigenado
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		26.31				
Monoterpenos oxigenados		42.10				
Sesquiterpenos alifáticos		21.05				
Sesquiterpenos oxigenados		5.26				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams R., 2002.

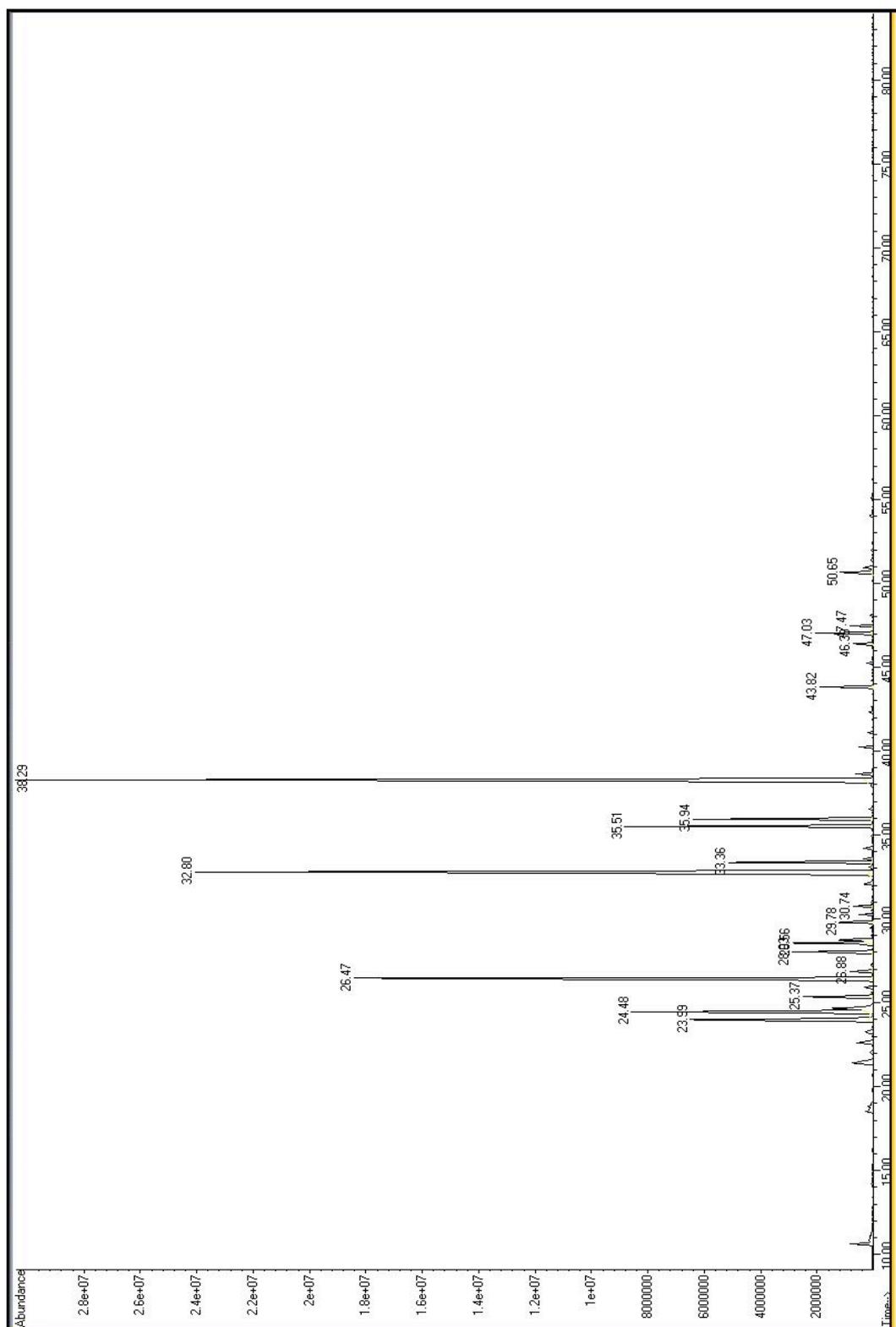


Figura 10. Cromatogramas CG-EM de la fracción amarilla del aceite esencial de *Origanum majorana*.

Se analizaron las fracciones incolora y amarilla, del aceite de la hoja de *Schinus molle*. En el cromatograma de gases del aceite incoloro de la hoja de *Schinus molle* (figura 11) se observan 21 señales de las cuales 20 fueron identificadas. Los componentes mayoritarios son  $\alpha$ -felandreno con 32.78% y el silvestreno con 22.32% (Tabla XI).

El porcentaje total de componentes son sesquiterpenos alifáticos con 38.09% (Tabla XI).

**Tabla XI. Constituyentes de la fracción incolora del aceite esencial de la hoja de *Schinus molle* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.85	$\alpha$ -pineno	2.53	932	929	932	Monoterpeno alifático
19.73	camfeno	1.66	946	943	946	Monoterpeno alifático
21.47	sabineno	0.85	973	971	969	Monoterpeno alifático
22.65	mirceno	1.02	991	989	988	Monoterpeno alifático
23.37	$\alpha$ -felandreno	32.78	1001	1001	1002	Monoterpeno alifático
24.48	ocimeno	1.67	1023	1021	1022	Monoterpeno alifático
24.75	silvestreno	22.32	1028	1026	1025	Monoterpeno alifático
42.64	$\beta$ -elemeno	0.10	1391	1390	1389	Sesquiterpeno alifático
43.40	$\alpha$ -gurjuneno	1.42	1409	1408	1409	Sesquiterpeno alifático
43.83	cariofileno	4.49	1419	1418	1423	Sesquiterpeno alifático
45.24	$\alpha$ -humuleno	1.17	1454	1452	1452	Sesquiterpeno alifático
46.40	germacreno D	3.46	1481	1480	1480	Sesquiterpeno alifático
47.16	$\alpha$ -muuroleno	2.09	1499	1499	1500	Sesquiterpeno alifático
47.72	$\delta$ -amorfeno	1.13	1512	1511	1511	Sesquiterpeno alifático
48.14	$\delta$ -cadineno	7.62	1521	1520	1522	Sesquiterpeno alifático
49.27	elemol	4.27	1545	1544	1548	Sesquiterpeno oxigenado
50.54	No se identifica	1.61	1571	1571	-	-
53.65	eudesmol-epi- $\delta$	0.23	1627	1626	1622	Sesquiterpeno oxigenado
54.31	cadinol-epi- $\alpha$	1.59	1637	1636	1638	Sesquiterpeno oxigenado
55.14	$\alpha$ -cadinol	3.46	1650	1648	1652	Sesquiterpeno oxigenado
57.69	shibunol	4.53	1687	1687	1688	Sesquiterpeno oxigenado
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		33.33				
Sesquiterpenos alifáticos		38.09				
Sesquiterpenos oxigenados		23.80				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams R., 2002.

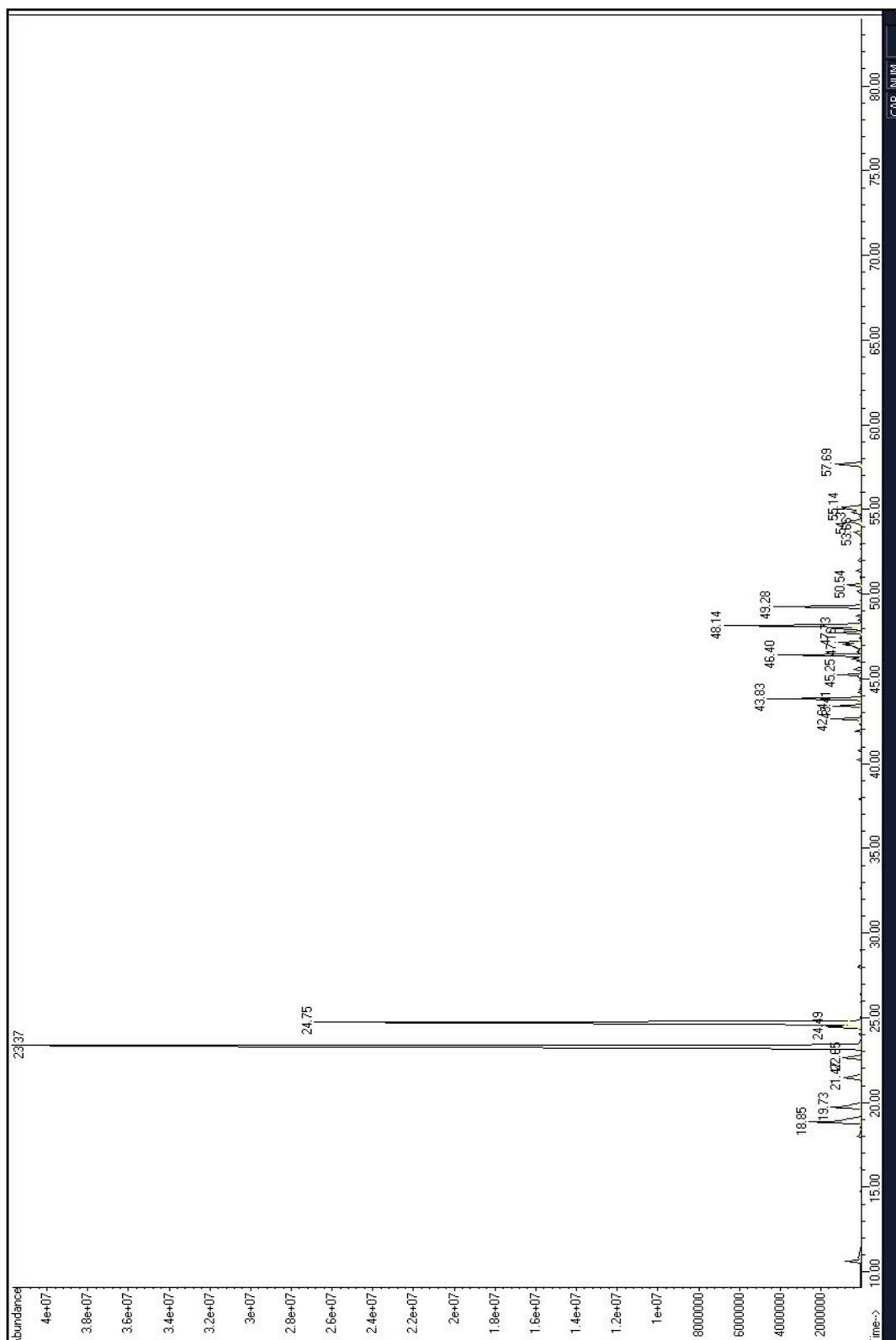


Figura 11. Cromatografía CG-EM de la fracción incolora del aceite esencial de hoja *Schinus molle*.

El cromatograma de gases correspondiente a la fracción amarilla del aceite de hoja de *Schinus molle* (figura 12) presenta 14 señales de las cuales todos se identificaron. Los componentes mayoritarios son el  $\alpha$ -felandreno y el silvestreno con 45.04% y 34.33% respectivamente (Tabla XII).

El porcentaje total de monoterpenos y sesquiterpenos alifáticos es de 46.66% para ambas fracciones (Tabla XII).

**Tabla XII. Constituyentes de la fracción amarilla del aceite de hoja de *Schinus molle* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.85	$\alpha$ -pineno	2.94	932	929	932	Monoterpeno alifático
19.73	camfeno	0.92	946	943	946	Monoterpeno alifático
21.47	sabineno	5.13	973	971	969	Monoterpeno alifático
22.65	mirceneno	1.86	991	989	988	Monoterpeno alifático
23.41	$\alpha$ -felandreno	45.04	1001	1001	1002	Monoterpeno alifático
24.79	silvestreno	34.33	1025	1023	1025	Monoterpeno alifático
30.08	$\beta$ -elemeno	1.12	1391	1391	1389	Sesquiterpeno alifático
33.85	-4,8, $\beta$ ,epoxi-cariofileno	0.74	1419	1419	1423	Sesquiterpeno alifático
42.63	$\alpha$ -humuleno	0.78	1454	1452.9	1452	Sesquiterpeno alifático
46.39	germacreno D	3.82	1481	1480.9	1480	Sesquiterpeno alifático
47.15	$\alpha$ -muuroleno	0.66	1499	1499.2	1500	Sesquiterpeno alifático
47.72	$\delta$ -amorfeno	0.73	1511	1511.3	1511	Sesquiterpeno alifático
48.13	$\delta$ -cadineno	1.08	1521	1520.04	1522	Sesquiterpeno alifático
49.25	elemol	0.83	1545	1544	1548	Sesquiterpeno oxigenado
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		46.66				
Sesquiterpenos alifáticos		46.66				
Sesquiterpenos oxigenados		6.66				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams R., 2002.

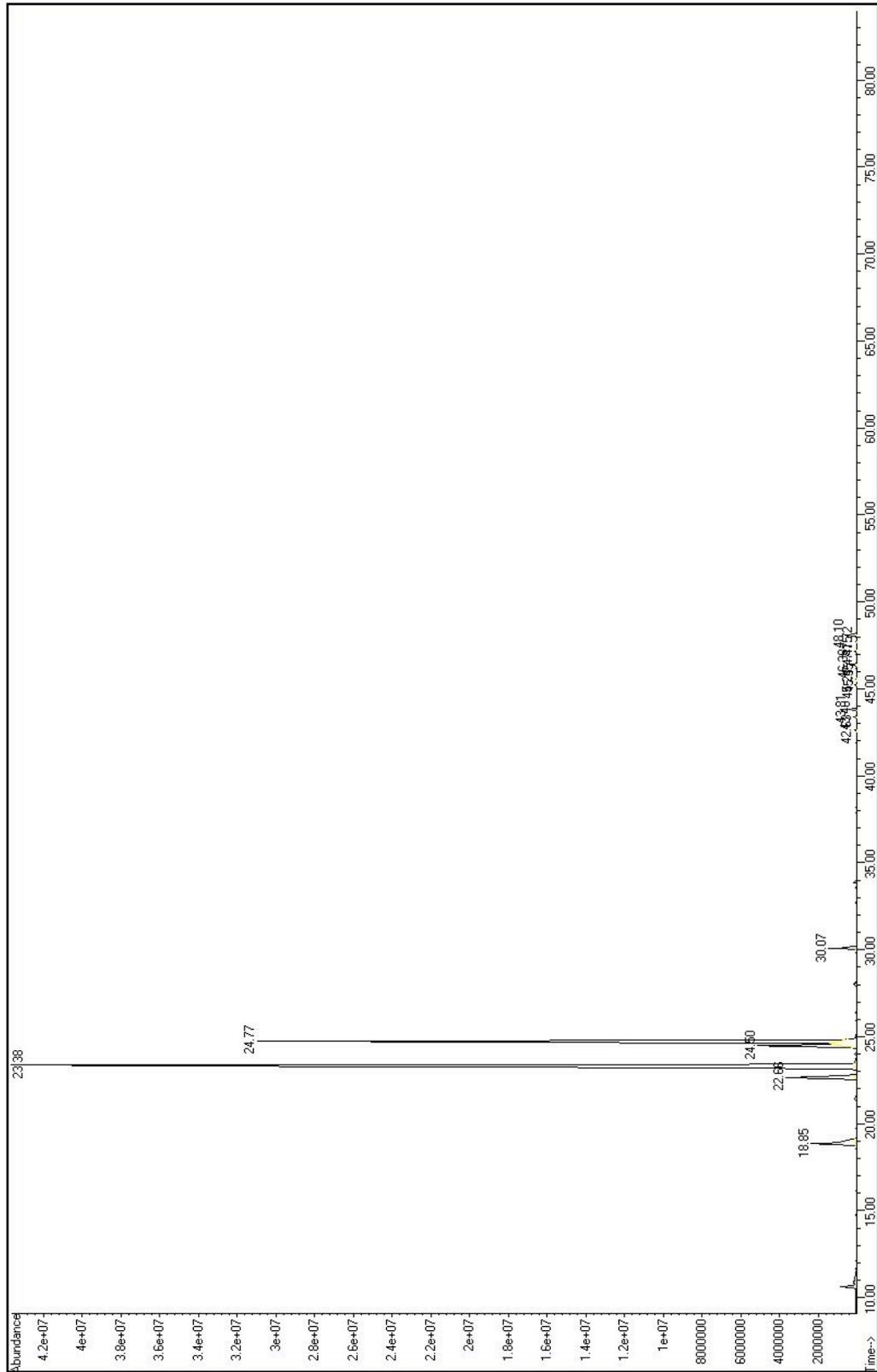


Figura 12. Cromatografía CG-EM de la fracción amarilla del aceite esencial de hoja de *Schinus molle*.

Se analizaron los cromatogramas de las 2 fracciones obtenidas de aceite, del fruto de *Schinus molle* (figura 13). Se presentaron y se observaron 15 señales, de las cuales 14 fueron identificadas. Los componentes mayoritarios son el  $\alpha$ -felandreno con 41.28% y el silvestreno con 38.50% (Tabla XIII).

El porcentaje total de los componentes son sesquiterpenos alifáticos con 41.17% (Tabla XIII).

**Tabla XIII. Constituyentes de la fracción incolora del aceite de fruto de *Schinus molle* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min.)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.85	$\alpha$ -pineno	2.64	932	929	932	Monoterpeno alifático
22.66	mircenoleno	5.07	991.1	989	988	Monoterpeno alifático
23.38	$\alpha$ -felandreno	41.28	1001.7	1001	1002	Monoterpeno alifático
24.49	o-cimeno	8.52	1023.5	1022	1022	Monoterpeno alifático
24.77	silvestreno	38.50	1028.7	1026	1025	Monoterpeno alifático
30.07	octanoato de metilo	1.50	1125.1	1123	1123	Éster
42.63	$\beta$ -elemeno	0.15	1390.9	1390	1389	Sesquiterpeno alifático
43.39	$\alpha$ -gurjueno	0.20	1408.7	1408	1409	Sesquiterpeno alifático
43.80	-4,8, $\beta$ ,epoxy-cariofileno	0.56	1419	1418	1423	Sesquiterpeno alifático
45.24	$\alpha$ -humuleno	0.15	1454	1453	1452	Sesquiterpeno alifático
45.55	-allo-aromadendreno	0.08	1461	1460	1458	Sesquiterpeno alifático
46.38	No se identifica	0.39	1481	1480	-	-
47.15	$\alpha$ -muuroleno	0.15	1499	1499	1500	Sesquiterpeno oxigenado
47.71	$\gamma$ -cadineno	0.10	1511	1511	1511	Sesquiterpeno alifático
48.10	$\delta$ -cadineno	0.69	1520	1519	1522	Sesquiterpeno alifático
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		29.41				
Sesquiterpenos alifáticos		41.17				
Sesquiterpenos oxigenados		5.88				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams R., 2002.

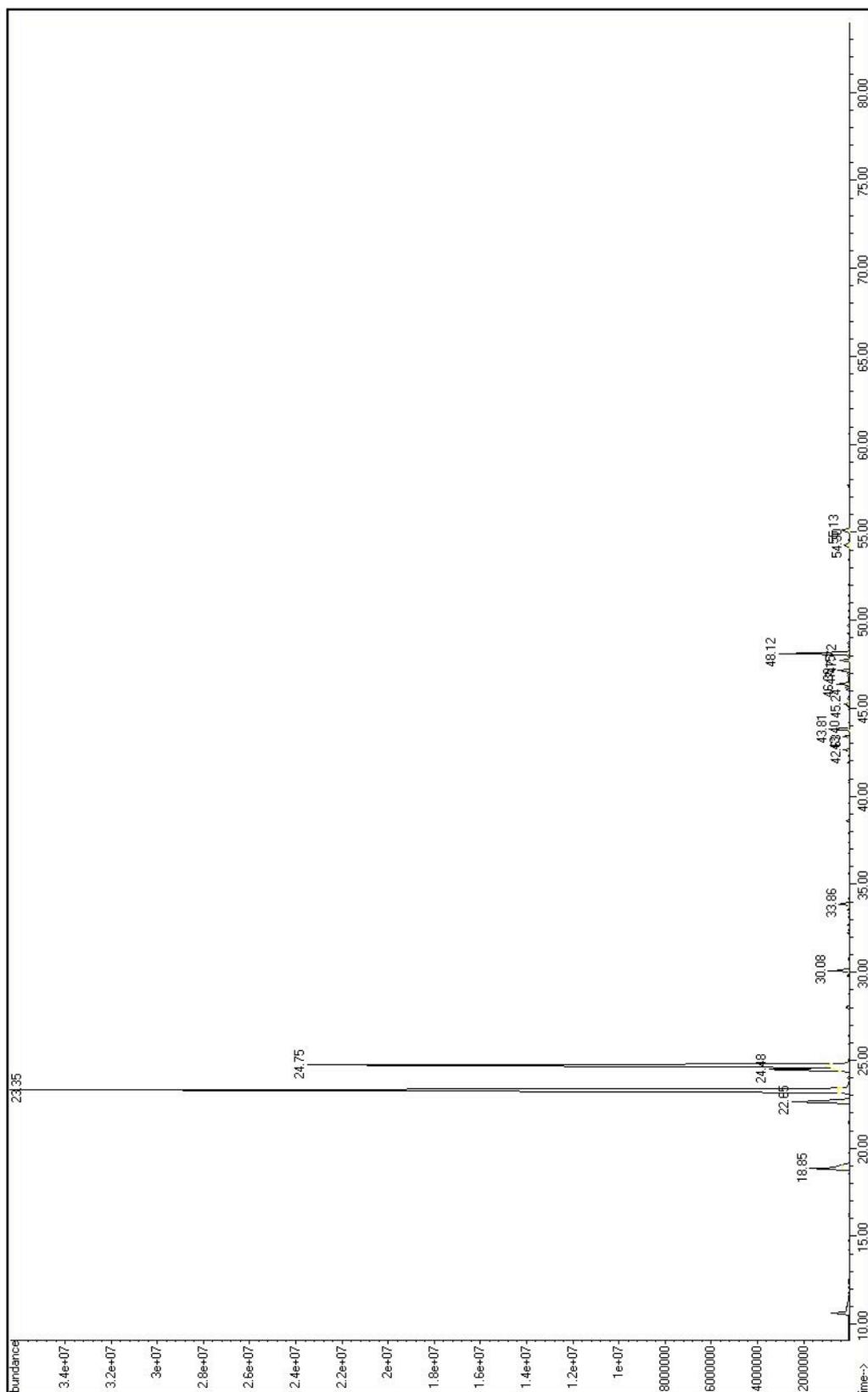


Figura 13. Cromatografía CG-EM de la fracción incolora del aceite de fruto de *Schinus molle*.

El cromatograma de gases que corresponde a la fracción amarilla del fruto de *Schinus molle* (figura 14) presenta 17 señales, de las cuales 16 fueron identificadas. Los compuestos de mayoritarios son  $\alpha$ -felandreno con 39.05% y el silvestreno con 36.43% (Tabla XIV).

El porcentaje total de componentes mayoritarios son sesquiterpenos alifáticos con 41.17% (Tabla XIV).

**Tabla XIV. Constituyentes de la fracción amarilla del aceite de fruto de *Schinus molle* obtenido por CG/EM.**

T.R. (min.)	Componente	% área	IK	IA <sup>A</sup>	IA <sup>B</sup>	Tipo de componente
18.84	$\alpha$ -pineno	2.50	932	929	932	Monoterpeno alifático
22.65	mircenol	4.79	991	989	988	Monoterpeno alifático
23.34	$\alpha$ -felandreno	39.05	1001	1000	1002	Monoterpeno alifático
24.48	p- cimeno	8.06	1022	1020	1022	Monoterpeno alifático
24.75	silvestreno	36.43	1028	1026	1025	Monoterpeno alifático
30.08	octanoato de metilo	1.42	1125	1123	1123	Éster
33.86	No se identifica	0.29	1198	1198	-	-
42.62	$\beta$ -elemeno	0.32	1390	1390	1389	Sesquiterpeno alifático
43.39	$\alpha$ -gurjueno	0.43	1409	1408	1409	Sesquiterpeno alifático
43.81	-4,8, $\beta$ ,epoxi- cariofileno	1.12	1419	1418	1423	Sesquiterpeno alifático
45.24	$\alpha$ -humuleno	0.33	1454	1452	1452	Sesquiterpeno alifático
46.38	epi-bi- ciclosesquifelandreno	0.67	1481	1481	-	Sesquiterpeno alifático
47.15	$\alpha$ -muuroleno	0.51	1499	1499	1500	Sesquiterpeno oxigenado
47.72	$\gamma$ -cadineno	0.48	1511	1511	1511	Sesquiterpeno alifático
48.12	$\delta$ -cadineno	3.43	1520	1520	1522	Sesquiterpeno alifático
54.29	$\alpha$ -muurolol	0.06	1648	1650	1644	Sesquiterpeno oxigenado
55.12	$\alpha$ -cadinol	0.11	1762	1767	-	Sesquiterpeno oxigenado
TOTAL		100				
Monoterpenos alifáticos		23.52				
Sesquiterpenos alifáticos		41.17				
Sesquiterpenos oxigenados		17.64				

TR Tiempo de retención

IK Índice de Kovats calculado

IA<sup>A</sup> Índice aritmético calculado

IA<sup>B</sup> Índice aritmético reportado por Adams R., 2002.

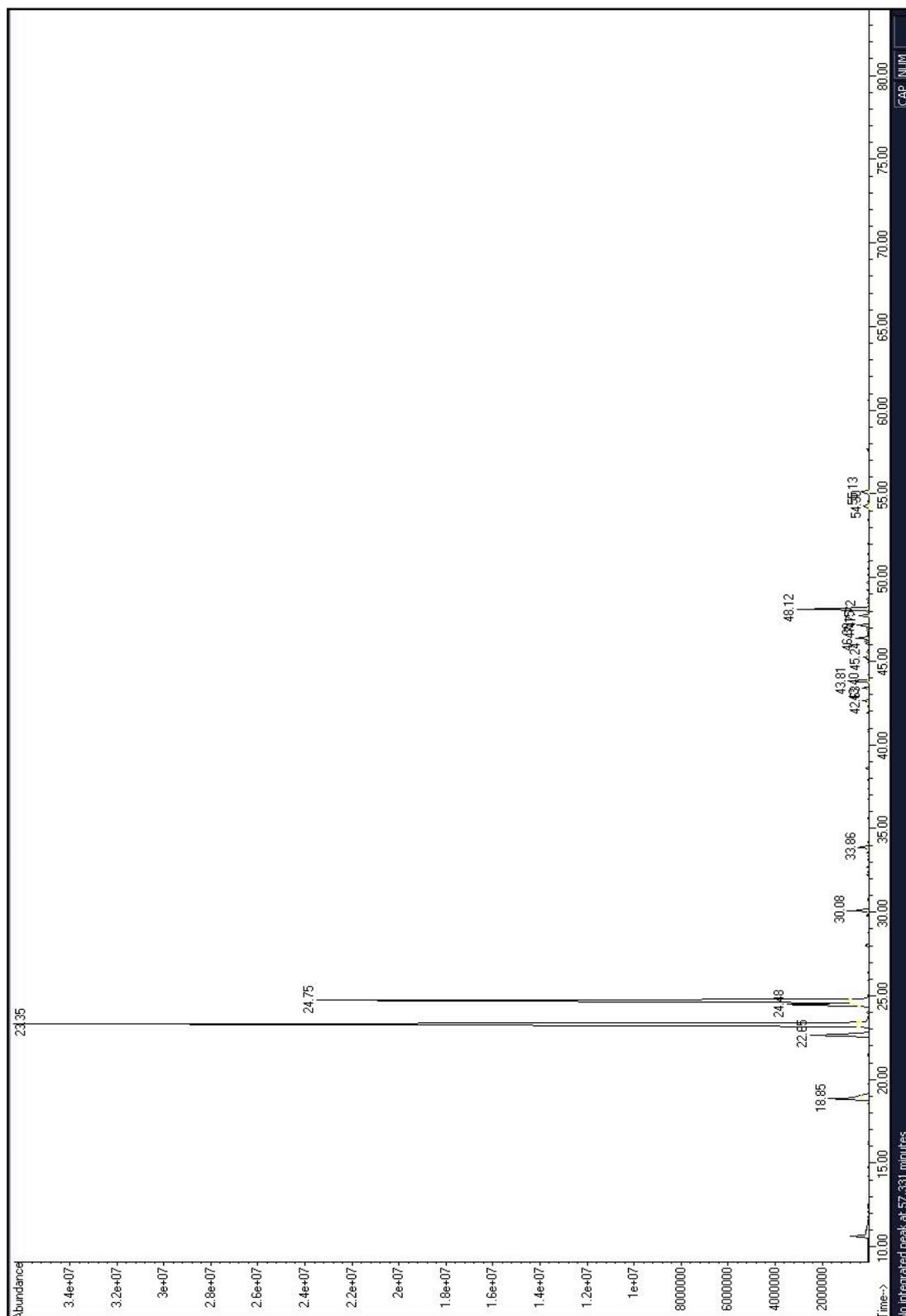


Figura 14. Cromatografía CG-EM de la fracción amarilla del aceite de fruto de *Schinnus molle*.

## 3.4 Evaluación de la actividad antioxidante.

Se calcularon los porcentajes de reducción de DPPH en un rango de concentraciones donde la concentración máxima fue de 250  $\mu\text{g/mL}$ . El aceite esencial con mayor porcentaje de reducción de DPPH a concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$ , fue el de *Thymus vulgaris* con 20% (Tabla XV).

**Tabla XV. Porcentaje de reducción de DPPH (%) de aceites esenciales a una concentración máxima de 250  $\mu\text{g/mL}$ .**

Aceite esencial	Fracción	Reducción DPPH (%)
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	4
<i>Chrysactinia mexicana</i>	incolora	0
	amarilla	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	incolora	0
	amarilla	6
<i>Thymus vulgaris</i>	única	20
<i>Oreganum majorana</i>	incolora	12
	amarilla	10
Hoja de <i>Schinus molle</i>	incolora	0
	amarilla	0
Fruto de <i>Schinus molle</i>	incolora	0
	amarilla	0
Quercetina	control	90
Pirocatecol	control	88
Rutina	control	89
Timol	control	46
Carvacrol	control	40

Después se calculó la  $\text{CE}_{50}$  de cada aceite, los resultados se muestran en la Tabla XVI.

**Tabla XVI.  $\text{CE}_{50}$  de aceites esenciales.**

Aceite esencial	Fracción	Concentración efectiva $\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	>250
<i>Chrysactinia mexicana</i>	incolora	>250
	amarilla	>250
<i>Rosmarinus officinalis</i>	incolora	>250
	amarilla	>250
<i>Thymus vulgaris</i>	única	>250
<i>Oreganum majorana</i>	incolora	>250
	amarilla	>250
Hoja de <i>Schinus molle</i>	incolora	>250
	amarilla	>250
Fruto de <i>Schinus molle</i>	incolora	>250
	amarilla	>250
Quercetina	control	1.58
Pirocatecol	control	1.20
Rutina	control	3.82
Timol	control	>250
Carvacrol	control	>250

## 3.5 Evaluación de la actividad antibacteriana.

La actividad antimicrobiana de cada uno de los 12 aceites esenciales fue evaluada mediante el bioensayo de microdilución en placa de 96 pozos. En la tabla XVII, se presenta los valores de CMI de cada aceite esencial contra las cepas de *Staphylococcus aureus* ATTC 12598, *Staphylococcus aureus* IMSS/HE 25:01 resistente a oxacilina y *Streptococcus pyogenes* (Tabla XVII).

**Tabla XVII. Valores de CMI de cada aceite esencial contra 2 cepas de *Staphylococcus aureus* y 1 cepa *Streptococcus pyogenes*.**

Aceite esencial	Fracción	<i>S. aureus</i> ATTC 12598 ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>S. aureus</i> IMSS/HE 25:01 ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>S. pyogenes</i> aislado clínico ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	500	NA*	125
<i>Chrysactinia mexicana</i>	incolora	NA*	NA*	NA*
	amarilla	NA*	NA*	NA*
<i>Rosmarinus officinalis</i>	incolora	NA*	NA*	NA*
	amarilla	NA*	NA*	NA*
<i>Thymus vulgaris</i>	única	250	NA*	62.50
<i>Oreganum majorana</i>	incolora	250	NA*	125
	amarilla	500	NA*	125
Hoja <i>Schinus molle</i>	incolora	250	NA*	125
	amarilla	NA*	NA*	250
Fruto <i>Schinus molle</i>	incolora	NA*	NA*	NA*
	amarilla	NA*	NA*	NA*
Oxacilina	control	4	64	1
Vancomicina	control	0.125	2	0.015
Timol	control	125	250	125
Carvacrol	control	250	125	125

\*NA= No activo a 500  $\mu\text{g/mL}$ .

## 3.6 Evaluación de la actividad antifúngica.

- Prueba Preliminar: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con microcultivo.

La actividad antifúngica de cada uno de los 12 aceites esenciales fue evaluada mediante una prueba preliminar de susceptibilidad, en el cual descartó aquellos aceites sin actividad. Posteriormente, se realizaron 4 pruebas de susceptibilidad para determinar el comportamiento de los aceites esenciales contra las 6 cepas de dermatofitos como *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum*, obtenidos de aislados clínicos. En la Tabla XVIII, se muestran los aceites esenciales que con actividad antifúngica contra las 6 cepas de dermatofitos.

**Tabla XVIII. Prueba de susceptibilidad preliminar para cada aceite esencial contra 6 cepas de dermatofitos. Porcentaje de inhibición (%)**

Aceite esencial		<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. mentagrophyte</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. floccosum</i>
Planta	Fracción						
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	24	36	74	66	48	100
<i>Chrysactinia mexicana</i>	incolora	0	0	0	0	0	0
	amarilla	0	0	0	0	0	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	incolora	0	0	0	0	0	0
	amarilla	0	0	0	0	0	0
<i>Thymus vulgaris</i>	única	100	100	100	100	100	100
<i>Origanum majorana</i>	incolora	100	100	100	100	100	100
	amarilla	100	100	100	100	100	100
Hoja <i>Schinus molle</i>	incolora	0	0	0	0	0	0
	amarilla	0	0	0	0	0	0
Fruto <i>Schinus molle</i>	incolora	0	0	0	0	0	0
	amarilla	0	0	0	0	0	0

- Experimento 1: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con disco.

La Tabla XIX se muestran los diámetros de inhibición del experimento 1.

**Tabla XIX. Experimento 1: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con disco. Diámetro de inhibición (mm).**

Aceite esencial		<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. mentagrophyte</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. floccosum</i>
Planta	Fracción						
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	27	25	20	20	Crecimiento completo	Sin crecimiento
<i>Thymus vulgaris</i>	única	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
<i>Origanum majorana</i>	incolora	Sin crecimiento	40	Sin crecimiento	27	Crecimiento completo	Sin crecimiento
	amarilla	36	Sin crecimiento	Sin crecimiento	42	47	Sin crecimiento

Sin crecimiento= No crecimiento en caja de 150 mm de diámetro.

Crecimiento completo= Crecimiento completo en caja de 150 mm de diámetro.

- Experimento 2: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con crecimiento previo de 24 h.

La Tabla XX se muestran los diámetros de inhibición del experimento 2.

- **Tabla XX. Experimento 2: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con crecimiento previo de 24 h. Diámetro de inhibición (mm).**

Aceite esencial		<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. mentagrophyte</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. floccosum</i>
Planta	Fracción						
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	12	10	12	15	Crecimiento completo	60
<i>Thymus vulgaris</i>	única	30	57	40	30	Sin crecimiento	60
<i>Origanum majorana</i>	incolora	28	29	30	25	18	27
	amarilla	42	38	Crecimiento completo	26	70	37

Sin crecimiento= No crecimiento en caja de 150 mm de diámetro.

Crecimiento completo= Crecimiento completo en caja de 150 mm de diámetro.

- Experimento 3: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con pozo.

En la Tabla XXI se muestran los diámetros de inhibición del experimento 3.

**Tabla XXI. Experimento 3: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante difusión en placa con pozo. Diámetro de inhibición (mm).**

Aceite esencial		<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. mentagrophyte</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. floccosum</i>
Planta	Fracción						
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	19	25	12	33	Crecimiento completo	18
<i>Thymus vulgaris</i>	única	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
<i>Origanum majorana</i>	incolora	30	33	21	32	Crecimiento completo	21
	amarilla	Sin crecimiento	55	35	Sin crecimiento	Crecimiento completo	31

Sin crecimiento= No crecimiento en caja de 150 mm de diámetro.

Crecimiento completo= Crecimiento completo en caja de 150 mm de diámetro.

- Experimento 4: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante inhibición de crecimiento por volatilidad. Diámetro de inhibición (mm).

En la Tabla XXII se muestran los diámetros de inhibición del experimento 4.

**Tabla XXII. Experimento 4: Prueba de susceptibilidad antifúngica mediante inhibición de crecimiento por compuestos volátiles. Diámetro de inhibición (mm).**

Aceite esencial		<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. mentagrophyte</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. floccosum</i>
Planta	Fracción						
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	Crecimiento completo	Crecimiento completo	Crecimiento completo	Crecimiento completo	Crecimiento completo	50
<i>Thymus vulgaris</i>	única	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
<i>Origanum majorana</i>	incolora	70	34	Crecimiento completo	Sin crecimiento	Crecimiento completo	Sin crecimiento
	amarilla	Sin crecimiento	60	Sin crecimiento	Sin crecimiento	35	86

Sin crecimiento= No crecimiento en caja de 150 mm de diámetro.

Crecimiento completo= Crecimiento completo en caja de 150 mm de diámetro.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las enfermedades infecciosas forman parte de las estadísticas de morbilidad y mortalidad de nosocomios alrededor del mundo (*Rice, 2006*). Los antimicrobianos han sido utilizados desde hace más de 6 décadas en el régimen de tratamiento para contrarrestar las enfermedades infecciosas; hasta la fecha cerca de 30 nuevos agentes antimicrobianos han sido desarrollados y continúa la búsqueda de nuevos principios activos que ataquen las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso desmedido de los antimicrobianos en décadas pasadas ha tenido como consecuencia una creciente resistencia de los microorganismos a diversos antimicrobianos, complicando la manera de combatir este tipo de enfermedades (*Swartz, 2000*). Datos epidemiológicos sugieren que los niveles de resistencia antimicrobiana han aumentado en proporciones inaceptables y sus tendencias a futuro indican que estas proporciones continúan creciendo (*Okeke, et al., 2005*).

La resistencia a antimicrobianos ha propiciado la búsqueda de nuevos y potentes agentes antimicrobianos de origen natural. Productos naturales como los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas (*Nakatsu et al., 2000*), éstas propiedades tienen una aplicación importante, específicamente en el área de dermatología (*Neuwinger, 2000*). Las infecciones dermatológicas causadas por diversos agentes patógenos, dañan la piel alterando el estrato córneo y causando irritabilidad en la piel (*Bensouliah J. y Buck P., 2006*). En dermatología, los problemas de resistencia más importantes, los presentan microorganismos como *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp* (*Sáenz-Anduaga E. y Sánchez-Saldaña L., 2005*).

En la actualidad, existe un interés en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que ataquen las principales infecciones en piel y sean capaces de regenerar las heridas ocasionadas por estas afecciones. Razón por la cual, en el presente proyecto se decidió investigar las propiedades antibacterianas, antioxidantes y antifúngicas de aceites esenciales de 6 diferentes plantas de la región del noreste de México.

#### 4.1 Obtención de aceites esenciales de plantas por hidrodestilación.

Inicialmente se colectaron 6 plantas aromáticas, las cuales fueron hidrodestiladas y resultaron 12 aceites esenciales. De las plantas *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Chrysactinia mexicana gray*, hoja y fruto de *Schinus molle* se obtuvieron 2 fracciones de aceite: una incolora y otra amarilla conforme destilaron. De las plantas *Magnolia grandiflora* y *Thymus vulgaris* se obtuvo sólo una fracción de aceite. Cabe destacar que en la mayoría de las investigaciones se reporta el análisis de una sola fracción, en la presente investigación se incluyó el análisis de aceites esenciales obtenidos en 2 fracciones con el objetivo de analizar si existían diferencias tanto en composición química como en actividad, en las fracciones que eran recolectadas durante las primeras horas (fracción incolora) y las últimas horas (fracción amarilla) de la hidrodestilación.

El porcentaje de rendimiento de los 12 aceites esenciales, fluctuaron entre 0.06% y 1.93% (Tabla II). De la fracción incolora del aceite de hoja de *Schinus molle* se obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento con 1.93%. Aquellos aceites con los porcentajes de rendimiento más bajos fueron la fracción amarilla del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana gray* con 0.06% y la fracción incolora del aceite esencial de *Origanum majorana* con 0.07%. En las dos fracciones mencionadas anteriormente se pudieron identificar monoterpenos oxigenados, monoterpenos alifáticos, sesquiterpenos oxigenados y sesquiterpenos alifáticos, todos volátiles; se necesitaría realizar una extracción por un método diferente a la hidrodestilación para comprobar que la planta posee una mayor cantidad de porcentaje de sesquiterpenos no volátiles.

Cerpa M, en 2007, reporta bajos porcentajes de rendimiento, en un rango entre 0.02 a 2.37%, cuando se utilizó la hidrodestilación de diversas plantas para la obtención de aceites esenciales (Cerpa M., 2007).

En la presente investigación, los resultados obtenidos se encuentran en el bajo rango de porcentaje de rendimiento propuesto por Cerpa en 2007. Este investigador propone que los aceites que resultaron con bajos porcentajes de rendimientos es debido a la ausencia de terpenos oxigenados y la abundancia de sesquiterpenos, pues la plantas es rica en compuestos químicos complejos no volátiles, los cuales la hidrodestilación no logra obtener (Cerpa M., 2007).

4.2 Caracterización química de los componentes principales de los aceites esenciales mediante Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas y Cromatografía de gases con detector de ionización a la flama.

Los aceites esenciales fueron caracterizados mediante la técnica de CG/EM para la identificación de sus componentes; mientras que el porcentaje de área de cada componente fue determinado por CG/FID.

El aceite de *Thymus vulgaris*, se obtuvo como fracción única y fue analizado mediante CG/FID y CG/EM. Se encontró que el o-cimeno con 37.10%,  $\gamma$ -terpineno con 19.98% y timol con 17.03% son sus componentes mayoritarios. Del porcentaje total se indica que los monoterpenos alifáticos son los de mayor porcentaje con 47.05% (Tabla III). Estos resultados concuerdan en parte con lo reportado por Pinto y colaboradores, quienes encontraron que el timol con 26%, el carvacrol con 21% y el  $\gamma$ -terpineno con 8.8% son componentes mayoritarios del *Thymus vulgaris* originario de Portugal (Pinto E., et al., 2006).

Sin embargo, difiere de lo reportado por Sartoratto y colaboradores, quienes encontraron al geranial con 21.83% como componente mayoritario en el *Thymus vulgaris* originario de Brasil, aunque también reportan al  $\gamma$ -terpineno y al timol, en menor proporción, con 2.57% y 17.45% respectivamente (Sartoratto A., et al., 2004). Por lo que se podría suponer que la localización de *Thymus spp*, afecta en la proporción de sus componentes.

El aceite de *Magnolia grandiflora* fue obtenido apartir de hojas de la planta cultivada en la región del noreste de México. En el análisis de sus componentes, se identificaron dos compuestos como mayoritarios: el bornil acetato en un 20.92% de abundancia y el E-cariofileno en 15.10%. Además se identificaron otros componentes como el  $\beta$ -pineno y el 1, 8-cineol (Tabla IV). Los componentes en su mayoría son sesquiterpenos alifáticos. Estos resultados difieren de los reportado por Jiménez-Medina y colaboradores en 2007, quien describió que el aceite esencial de *Magnolia grandiflora* endémica de Mérida Venezuela, tuvo como componentes mayoritarios el germacreno-D, el  $\beta$ -pineno y el 1, 8-cineol (Jiménez-Medina D., et al., 2007). En la presente investigación, el germacreno D se encuentra en un 8.40%, el  $\beta$ -pineno y 1-8, cineol (eucaliptol) en un 4.53% y 2.18% respectivamente. En otra investigación, el aceite esencial de *Magnolia liliflora* colectada en diferente época y región (originaria de China) se identifica el  $\beta$ -pineno y el 1, 8-cineol como componentes mayoritarios (Zhenhong L., 2011). La diferencia de abundancia de componentes con respecto a otros investigadores, pudiera ser debido a varias causas como la región y época donde se colectó la planta.

En lo que respecta al estudio de *Rosmarinus officinalis*, las fracciones incolora y amarilla fueron analizadas mediante CG/FID y CG/EM. Los componentes mayoritarios para la fracción incolora fueron 1, 8-cineol con un 23.77% y el borneol con un 45.89% de área, mientras que para la fracción amarilla fue el borneol con 87.59%. En ambos casos, la mayoría de los componentes reportados fueron monoterpenos; la fracción incolora del aceite mostró 46% de monoterpenos oxigenados y la fracción amarilla mostró 50% de monoterpenos alifáticos (Tabla V y VI).

Los componentes del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* descritos por diferentes investigadores, también están identificados en este análisis pero en diferente proporción, como se puede observar en la Tabla V y VI. Por ejemplo, Genena y colaboradores reportaron el isocarnosol como componente mayoritario, seguidos por el borneol y camfor (Genena A., et al., 2008). Por su parte, Hussein y colaboradores, reportaron al 1, 8-cineol como componente mayoritario seguido en proporción el limoneno, linalol y borneol (Hussain A., et al., 2010) ambas muestras de *Rosmarinus officinalis* son originarias de Brasil. Esto coincide en parte con el porcentaje de área obtenido en el presente análisis del aceite esencial, ya que se encontró el borneol y el 1, 8-cineol entre los componentes mayoritarios.

El aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray fue analizado mediante CG/FID y CG/EM en dos fracciones, una incolora y otra amarilla. El componente principal de la fracción incolora resultó ser el silvestreno con un 36.77% de abundancia (Tabla VII) y para la fracción amarilla del aceite fueron el silvestreno con un 41.08% y el limoneno con un 26.08% de área (Tabla VIII). Los componentes de ambas fracciones, en su mayoría son monoterpenos alifáticos (Tabla VI y VIII). Estos resultados no coinciden con lo reportado por Cárdenas-Ortega y colaboradores, en 2005; quienes determinaron la composición del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray originario de San Luís Potosí y encontraron al eucaliptol o 1, 8-cineol y la piperitona como sus componentes mayoritarios de un total de 30 compuestos identificados (Cárdenas-Ortega N.C., et al., 2005). Esto puede deberse a la diferente localización de la planta y a la época de colecta.

Las fracciones incolora y amarilla del aceite esencial de *Origanum majorana* fueron analizados por CG/EM y CG/FID. Los constituyentes de mayor porcentaje de área de la fracción incolora fueron el terpinen-4-ol con un 23.11% y el timol con un 16.32% de abundancia (Tabla IX) , mientras que en la fracción amarilla sus componentes principales fueron el terpinen-4-ol con 27.72% y el timol con un 24.64% de área (Tabla X). La mayoría de los componentes de la fracción incolora son monoterpenos alifáticos a diferencia de los componentes de la fracción

amarilla donde en su mayoría fueron monoterpenos oxigenados (IX y X). Bussata y colaboradores en 2008, demostraron que el terpinen-4-ol es el componente mayoritario del aceite de *Origanum majorana* (Busatta C., et al., 2008). Recientemente en 2011, Sellami y colaboradores, demostraron que efectivamente el terpinen-4-ol es el compuesto mayoritario de este aceite esencial, seguido en proporción por el cis-hidrato sabineno, trans-hidrato sabineno,  $\gamma$ -terpineno, bornil acetato y linalol, siendo en su mayoría monoterpenos oxigenados (Sellami I.H., et al., 2009). Ambas investigaciones, coinciden aunque en diferente proporción, con los componentes encontrados en ambas fracciones del aceite esencial de *Origanum majorana* cultivada en la región del noreste de México analizado en este trabajo.

Las 2 fracciones: incolora y amarilla, de la hoja de *Schinus molle* fueron analizadas mediante CG/EM y CG/FID. Se identificaron el  $\alpha$ -felandreno con 32.78% y 45.05% para la fracción incolora y amarilla respectivamente, mientras que el silvestreno con 22.32% y 34.33% respectivamente. Los 2 componentes son componentes mayoritarios en ambas fracciones (Tabla XI y XII). Estos resultados, difieren con lo reportado por Deveci y colaboradores en 2010, pues identifican el  $\alpha$ -cadinol y  $\delta$ -cadineno como compuestos mayoritarios, en el aceite esencial de la hoja de *Schinus molle* de Turquía. Los diferentes compuestos mayoritarios reportados por Deveci y colaboradores, fueron identificados en éste análisis pero en menor porcentaje, sin embargo, los componentes mayoritarios fueron diferentes, esto pudiera deberse a múltiples factores ambientales como altura, localización, clima y medio ambiente e inclusive la época de cultivo.

Se realizó el análisis mediante CG/EM y CG/FID para la caracterización química de las fracciones, incolora y amarilla, del fruto de *Schinus molle*. Los componentes mayoritarios fueron el  $\alpha$ -felandreno con 41.28% en la fracción incolora y 39.05% en la fracción amarilla, mientras que el silvestreno presentó 38.50% en la fracción incolora y 36.43% en la fracción amarilla (Tabla XIII y Tabla XIV).

Zahed y colaboradores, en 2011 realizaron una investigación donde se analizaron el aceite esencial del fruto de *Schinus molle* de localización en Europa, América y África. Se determinó que los monoterpenos hidrocarbonados, fueron los componentes mayoritarios; específicamente el  $\alpha$ -felandreno y el mirceno en los aceites de las 3 regiones (Zahed N., et al 2011). En la presente investigación, se obtuvo el  $\alpha$ -felandreno como componente mayoritario y algunos otros componentes, los cuales también son descritos por Zahed y colaboradores pero en diferente proporción, para el aceite esencial del fruto de *Schinus molle* de California (Zahed N., et al 2011). La similitud puede deberse, a que la planta de estudio y la planta californiana, comparten un medio ambiente, clima y localización algo parecidos, en comparación con los aceites esenciales de plantas de *Schinus molle* originarias de Túnez o Italia.

En la presente investigación, un análisis general de todos los constituyentes de los aceites esenciales indica que estos poseen en su mayoría compuestos monoterpenos alifáticos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos alifáticos y sesquiterpenos oxigenados (Tabla XXIII).

**Tabla XXIII. Porcentaje de área total de compuestos terpénicos en los aceites esenciales.**

Aceite esencial		Monoterpenos alifáticos	Monoterpenos oxigenados	Sesquiterpenos alifáticos	Sesquiterpenos oxigenados
planta	fracción				
<i>Magnolia grandiflora</i>	única	9.47 %	32.47 %	43.58 %	6.71 %
<i>Thymus vulgaris</i>	única	62.49 %	37.38 %	-	-
<i>Rosmarinus officinalis</i>	incolora	21.31 %	75.06 %	-	-
	amarilla	7.25 %	91.5 %	-	-
<i>Chrysactinia mexicana</i>	incolora	15.38%	3.84%	26.92%	23.07%
	amarilla	47.57 %	42.52 %	4.54 %	5.32 %
<i>Origanum majorana</i>	incolora	46.63 %	50.99 %	-	-
	amarilla	9.80 %	77.93 %	7.64 %	1.66 %
Hoja <i>Schinus molle</i>	incolora	62.81 %	-	21.44 %	14.04 %
	amarilla	89.35 %	-	9.82 %	-
Fruto <i>Schinus molle</i>	incolora	95.99 %	-	1.90 %	0.15 %
	amarilla	90.81 %	-	6.75 %	0.66 %

Es importante destacar que los cuatro aceites esenciales que obtuvieron un mayor porcentaje de monoterpenos oxigenados y alifáticos son: la *Magnolia grandiflora*, *Thymus vulgaris* y ambas fracciones de *Origanum majorana*. Estos cuatro aceites esenciales coinciden con los mismos cuatro aceites con mejor actividad antimicrobiana, los cuales se analizan más adelante.

#### 4.3 Determinación la actividad antioxidante e los aceites esenciales mediante la técnica DPPH.

Los agentes antioxidantes son sustancias que poseen la capacidad de proteger el cuerpo contra el daño causado por radicales libres que son producto del estrés oxidativo. Hoy en día existe un interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural (Bajpai V., et al., 2009)<sup>b</sup>. La actividad antioxidante se determinó mediante la técnica de DPPH, para los extractos alcohólicos de la mayoría de las plantas que fueron analizadas en esta investigación, ya han sido reportadas con anterioridad; sin embargo, no existe un reporte de la actividad antioxidante para todos los aceites esenciales. Por lo que se decidió analizarlos para corroborar si existía algún tipo de actividad.

Los extractos alcohólicos y aceites de especies de *Magnolia*, como el de *Magnolia liliflora*, ya se ha reportado con anterioridad por Bajpai y colaboradores en el 2009, presentando una  $CE_{50}$  10.11  $\mu\text{g/mL}$  (Bajpai V., et al., 2009). Debido a estos reportes, se consideró la posibilidad de que el aceite de *Magnolia grandiflora* de esta región, tuviera igual o mayor actividad antioxidante. Sin embargo, al evaluar su actividad antioxidante mediante la técnica DPPH, se encontró una  $CE_{50}$  >250  $\mu\text{g/mL}$  (el porcentaje de reducción del aceite esencial fue de 4 %) (Tabla XV y XVI), lo que indica una baja actividad antioxidante.

En lo que respecta a la actividad antioxidante, del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, éste presentó un porcentaje de reducción de DPPH de 40%, por lo que su  $CE_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$  (Tabla XV y XVI). El aceite de *Thymus vulgaris* mostró un porcentaje de reducción de DPPH, similar al que mostraron el timol y carvacrol a una concentración de  $250 \mu\text{g/mL}$  (Tabla XVI). Se podría inferir que la poca actividad antioxidante que presenta el aceite, es debida a la presencia de éstas moléculas (timol y carvacrol). Otros autores reportan también baja actividad antioxidante, como Grigore y colaboradores en 2010, quienes reportan valores de  $CE_{50}$  mayor a  $3 \text{ mg/mL}$  para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* originario de Rumania. Sin embargo, presenta una baja actividad antioxidante, al comparar con diferentes extractos de la especie *Thymus* (Grigore A., et al., 2010).

Durante la presente investigación, se evaluó la actividad antioxidante de las fracciones incolora y amarilla del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*. Únicamente la fracción amarilla presentó un porcentaje de reducción de DPPH de 4% a una concentración de  $250 \mu\text{g/mL}$  (Tabla XV), lo que significa una baja actividad antioxidante ( $CE_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ).

Genena y colaboradores en 2008, analizaron 7 extractos de esta planta, obteniendo  $CE_{50}$  en un rango de  $9.23$  a  $25.84 \mu\text{g/mL}$ . Se esperaba que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* de la presente investigación mostrará una actividad parecida a la reportada por los extractos de *Rosmarinus officinalis*, sin embargo, este resultado indica que la  $CE_{50}$  es mayor a  $250 \mu\text{g/mL}$ , la cual no es una buena actividad antioxidante en comparación con lo que reporta Genena y colaboradores en 2008. Esta diferencia puede ser debido a que la actividad antioxidante de un aceite esencial pudiera involucrar la sinergia de un mayor número de componentes, mientras que en un extracto puro sólo un componente específico define la actividad (Genena A., et al., 2008).

En la actualidad, no hay reportes que muestran la actividad antioxidante del aceite esencial de *Origanum majorana*, sin embargo existen reportes científicos que muestran esta actividad antioxidante de otras especies del género *Origanum*. La actividad antioxidante de las fracciones incolora y amarilla del aceite esencial de *Origanum majorana* analizada en este trabajo mostraron porcentajes de reducción de 10 % y 12 % respectivamente, a una concentración de 250 µg/mL (Tabla XV y XVI). La baja actividad antioxidante obtenida, concuerda con lo reportado por Faleiro y colaboradores, quienes analizaron el aceite esencial de *Origanum vulgare* por la técnica ABTS•<sup>+</sup> y encontraron una inhibición del radical a concentraciones mayores de 800 mg/L (Faleiro L., et al., 2005). Sin embargo, Woo y colaboradores en 2001, se analizaron la actividad antioxidante de extractos alcohólicos de *Origanum majorana*, mediante la técnica del radical anión superóxido, mostrando una CE<sub>50</sub> de 1.44 µg/mL (Woo J.J., et al., 2001). Esta diferencia, pudiera deberse a diversos factores ambientales e inclusive la época de colecta. También cabe la posibilidad de que el método de extracción utilizado afecte la composición química del aceite esencial y provoque una disminución de la actividad antioxidante de este. Por otra parte, el hecho de utilizar diferentes técnicas antioxidantes, dificulta la comparación de las CE<sub>50</sub> de la actividad antioxidante del aceite esencial.

El aceite esencial de la hoja de *Schinus molle*, no presentó reducción del radical DPPH a una concentración máxima de 250 µg/mL (Tabla XV y XVI), por lo que su CE<sub>50</sub> resultó mayor a este valor. Sin embargo, en otros trabajo se reporta la actividad antioxidante mediante la técnica de xantina oxidasa, de diferentes compuestos aislados del extracto metanólico de *Schinus molle*. Ellos reportaron buena actividad antioxidante en un rango de concentración de 170 a 260 µM para cada uno de los flavonoides aislados (Marzouk M., et al., 2006).

La técnica xantina oxidasa, es una técnica utilizada para determinar la actividad antioxidante en sistemas biológicos, los agentes antioxidantes inhiben este enzima, evitando la formación de el anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Isaza J.H., et al., 2007), mientras que la técnica de DPPH, como ya se

explicó anteriormente, es una técnica utilizada de manera preliminar para detectar sustancias que pueden tener actividad antioxidante.

En lo que respecta a la actividad antioxidante del fruto de *Schinus molle*, no se obtuvieron concentraciones efectivas capaces de reducir el 50 % del radical libre DPPH hasta la máxima concentración probada. (Tabla XV y Tabla XVI). Hosni y colaboradores en 2011, realizaron una investigación donde reportan la actividad antioxidante del aceite del fruto de *Schinus molle* en diferentes etapas de maduración del fruto: inmadura, intermedia y madura.

Los resultados mostraron que el aceite de *Schinus molle* en las 3 etapas de maduración, tienen una baja actividad antioxidante. Sin embargo, en una de las 3 etapas, la de maduración intermedia, mostró una reducción del radical libre DPPH en un 20 % a una concentración de 200 µg/mL. Hosni y colaboradores, proponen que los monoterpenos oxigenados como el timol, carvacrol y borneol poseen buena actividad antioxidante debido sus grupos funcionales fenólicos. Estos investigadores correlacionan la baja actividad antioxidante con la baja concentración de estos monoterpenos oxigenados en el aceite del fruto de *Schinus molle* (Hosni K., et al., 2011).

En el presente trabajo, se identificaron los componentes de ambas fracciones del aceite de fruto de *Schinus molle* y no se encontraron monoterpenos oxigenados; por lo que se sugiere que la ausencia de actividad antioxidante de este aceite, pudiera ser por el bajo porcentaje de monoterpenos oxigenados con grupos funcionales fenólicos.

Ninguno de los aceites esenciales alcanzó el 50% de inhibición o reducción del radical libre DPPH, por lo que su  $CE_{50} > 250$  µg/mL. Esto significa que no es una buena actividad antioxidante.

#### 4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales: Actividad antibacteriana.

En esta investigación se determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Magnolia grandiflora* de la región noreste de México, fue analizado como fracción única contra las cepas bacterianas responsables de infecciones dermatológicas como *Staphylococcus aureus* ATTC 12598, *Staphylococcus aureus* cepa resistente a oxacilina IMSS/HE 25:01 y *Streptococcus pyogenes* aislado clínico, obteniendo valores bajos de CMI entre 500 y 125 µg/mL (Tabla XVII).

En diversas investigaciones se ha probado la actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de diferentes especies de *Magnolia* (Chan L.W., et al., 2008; Bajpai V., et al., 2009)<sup>b</sup>; sin embargo, son pocos los reportes existentes de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales de *Magnolia spp.* Jiménez y colaboradores, atribuyen las propiedades antimicrobianas al germacreno D, uno de sus componentes mayoritarios identificado en el aceite esencial de *Magnolia grandiflora* originario de Venezuela; sin embargo, ellos no reportan la actividad antimicrobiana del aceite esencial. En la presente investigación, el porcentaje de área de este componente es pequeño, (Tabla IV) por lo que no se puede atribuir la actividad antibacteriana de esta planta, específicamente al germacreno D. Los diferentes componentes que hay en un aceite esencial puede ser la causa de que la capacidad antimicrobiana varíe según el origen del espécimen.

En la presente investigación, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* dió actividad antibacteriana contra 1 cepa de *Staphylococcus aureus* ATTC 12598 y 1 cepa de *Streptococcus pyogenes*, causantes de enfermedades infecciosas en piel. Los valores de CMI obtenidos fueron de 250 µg/mL y 62.5 µg/mL (Tabla XVII). Existen diversos reportes de la actividad antibacteriana de aceites y extractos de *Thymus vulgaris*. Soković y colaboradores en 2007, evaluaron la actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Thymus vulgaris* originario de Belgrado en Serbia y mostraron CMI de entre 0.25 y 1 µg/mL contra cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Soković M., et al., 2007).

Por otro lado, en 2010, Roldán y colaboradores evaluaron el aceite esencial de *Thymus vulgaris* originario de Colombia, estos investigadores reportaron CMI para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* en un rango de concentraciones de 0.625 y 5 mg/mL (Roldán L.P., et al, 2010).

Durante el desarrollo de ésta investigación, se probó la actividad antimicrobiana de el timol y el carvacrol, que son compuestos identificados previamente en el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (figura 3). Estos componentes fueron evaluados contra las dos cepas de *Staphylococcus aureus* y una cepa de *Streptococcus pyogenes*, todas las cepas fueron sensibles con CMI de entre 125 y 250 µg/mL (Tabla XVII). Por lo que se podría considerar, que estas moléculas podrían ser, en parte, las responsables de la inhibición el crecimiento bacteriano.

La actividad antimicrobiana de las 2 fracciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* fue evaluada contra cepas Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, causantes de infecciones en piel. Estas cepas no presentaron actividad a 500 µg/mL (Tabla XVII).

Hussain y colaboradores, muestran que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* originario de Brasil, posee actividad contra diferentes cepas bacterianas. Ellos adjudican la inhibición bacteriana de esta planta, a la presencia del compuesto 1, 8-cineol (eucaliptol) identificado como componente mayoritario en ese aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

Por lo que podría sugerirse, que ambas fracciones del aceite esencial *Rosmarinus officinalis* analizado en el presente trabajo, no muestra actividad antibacteriana a la más alta concentración usada, debido a que presentan una baja proporción del compuesto 1, 8-cineol, también conocido como eucaliptol (Tabla V y VI).

La fracción incolora y la fracción amarilla del aceite esencial de *Origanum majorana* mostraron una CMI de 125 y 250 µg/mL (Tabla XVII), contra las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATTC 12598 y *Streptococcus pyogenes* respectivamente, la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina IMSS/HE 25:01 no presentó actividad a 500 µg/mL (Tabla XVII).

Bussatta y colaboradores, reportan que bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son susceptibles al aceite esencial de *Origanum majorana*, con valores de CMI en un rango de 0.92 mg/mL a 2.6 mg/mL, siendo la cepa de *Bacillus subtilis* la más susceptible. En el reporte de estos investigadores, se identifica al terpinen-4-ol como compuesto mayoritario del aceite esencial al igual que en el presente trabajo (Tabla IX y X) (Busatta C., et al., 2008). Por lo que podría pensarse que el terpinen-4-ol, es uno de los causantes de la actividad antimicrobiana de ambas fracciones de este aceite esencial, a pesar de ser especies del género *Origanum majorana* de diferentes localidades. En otros reportes, plantas de diferentes especies del género *Origanum*, muestran actividad antibacteriana de amplio espectro. El aceite de *Origanum vulgare*, por ejemplo, presentó actividad contra diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* (Failero L., et al., 2005), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus equi* y *Micrococcus luteus* (Sartoratto A., et al., 2004).

Respecto al aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray, en la presente investigación no se encontró actividad antibacteriana a 500 µg/mL contra las 3 cepas causantes de las infecciones dermatológicas sujetas a estudio (Tabla XVII). Sin embargo, la actividad antibacteriana de un extracto de esta planta contra diferentes cepas bacteriana como *Mycobacterium tuberculosis* y una cepa de *Haemophilus influenzae* resistente a penicilina, fue reportada por Molina y colaboradores, mostrando una CMI de 62.5 y 500 µg/mL respectivamente (Molina-Salinas G.M., et al., 2007). La diferencia encontrada en ambos estudios, puede radicar en que Molina y colaboradores analizaron extractos alcohólicos, mientras que en la presente investigación se realizó el análisis antibacteriano con aceite esenciales.

Las 2 fracciones del aceite esencial de hoja de *Schinus molle* mostraron actividad antibacteriana contra las cepas que causan las enfermedades infecciosas en piel como *Staphylococcus aureus* ATTC 12598, *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina IMSS/HE 25:01 y *Streptococcus pyogenes*. Las CMI obtenidas en esta investigación, para la fracción incolora del aceite esencial del *Schinus molle*, son de 125 y 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATTC 12598 y *Streptococcus pyogenes*, respectivamente. Mientras que la fracción amarilla del aceite esencial del *Schinus molle*, sólo tuvo actividad contra la cepa de *Streptococcus pyogenes* a una CMI de 250 µg/mL (Tabla XVII). Las CMI que se obtuvieron en la presente investigación corroboran la actividad antibacteriana de este aceite que ya había sido reportada contra diferentes cepas, obteniendo bajas CMI contra las cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina y *Micrococcus luteus* (Devici O., et al., 2010).

Las CMI de ambas fracciones, del aceite del fruto de *Schinus molle*, fueron mayores a 500 µg/mL (Tabla XVII), contra cepas *Staphylococcus aureus* ATTC 12598 y la cepa de *Streptococcus pyogenes*. Estos resultados podrían concordar con lo que se describe en otros reportes científicos, donde se muestra que el aceite del fruto de *Schinus molle* tiene actividad con CMI en un rango entre 600 y 900 µg/mL contra cepas de *Paenibacillus larvae larvae* (Fuselli S., et al., 2006). Sin embargo, en 2007, Molina-Salinas y colaboradores evaluaron la actividad antibacteriana del extracto del fruto de *Schinus molle* de esta región y encontraron actividad contra una cepa sensible de *Mycobacterium tuberculosis*, una cepa de *Haemophilus influenzae* y una cepa de *Streptococcus pneumoniae* con CMI de 125, 500 y 62.5 µg/mL respectivamente (Molina-Salinas G.M., et al., 2007). Por lo que podría aseverarse que los extractos poseen CMI bajas en comparación con los aceites esenciales de *Schinus molle*.

#### 4.5 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales: Actividad antifúngica.

La incidencia de las dermatofitosis y la creciente resistencia a antifúngicos que existe en la actualidad, ha propiciado la necesidad de buscar alternativas terapéuticas de origen natural. Existen reportes que demuestran la actividad antifúngica de los extractos alcohólicos y aceites esenciales de plantas aromáticas que fueron analizadas en la presente investigación. Para iniciar la revisión de actividad antifúngica de los aceites esenciales, se decidió realizar una prueba preliminar de susceptibilidad por difusión en placa con microcultivo para descartar aquellos que no presentaran actividad. El bioensayo preliminar antimicótico leído después de 48 h mostró que el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, presentó 100% de inhibición de crecimiento contra todas las cepas de dermatofitos analizadas. El aceite esencial de *Magnolia grandiflora* presentó entre 24% y 100%, de inhibición de crecimiento, las 2 fracciones de *Origanum majorana* también presentaron 100% de inhibición de crecimiento contra todas las cepas de dermatofitos analizadas. Se descartan los aceites esencial de *Chrysactinia mexicana gray*, de hoja y fruto de *Schinus molle* y *Rosmarinus officinalis* por que no presentaron actividad antifúngica (Tabla XVIII).

Posteriormente, una vez conocidos cuales eran los aceites con actividad antifúngica se realizó una prueba de susceptibilidad por difusión en placa con disco para determinar los mm de inhibición de crecimiento (Experimento 1; Tabla XIX). Debido a que algunos aceites esenciales inhibieron completamente el crecimiento dermatofítico, se corroboró la viabilidad de las cepas de dermatofitos al momento de inocular en la placa de agar, con la evaluación de la inhibición de dermatofitos en placa con crecimiento previo de 24 h (Experimento 2; Tabla XX).

El aceite esencial de *Thymus vulgaris*, no presentó crecimiento microbiano después de las 48 h de lectura, para ninguna de las 6 cepas de dermatofitos, por lo que se considera que la inhibición fue completa (Experimento 1; Tabla XIX). En la prueba de inhibición de dermatofitos en placa, con crecimiento previo de 24 h, se encontraron halos de inhibición de entre 30 y 60 mm para 5 cepas de dermatofitos e inhibición completa para *Microsporum canis* (Tabla XXI). Lo que representa una buena actividad antifúngica. Los resultados obtenidos experimentalmente pueden ser comparados con lo reportado por Pinto y colaboradores en 2006, aún y cuando estos investigadores utilizaron métodos de análisis diferentes, como la macrodilución; ellos reportan una buena actividad antidermatofítica, con CMI de entre 0.16 y 0.32 µg/mL (Pinto E., et al., 2006).

Los resultados obtenidos para la actividad antifúngica del aceite esencial de *Magnolia grandiflora*, mediante la técnica de difusión en disco, fueron desde 20 mm para *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophyte*, 25 mm de inhibición para *Trichophyton tonsurans* y 27 mm de inhibición para *Trichophyton rubrum*; se debe destacar la inhibición completa para *Epydermophyton floccosum*, lo que representa una buena actividad antifúngica. Por el contrario no se observó la inhibición de *Microsporum canis* (Tabla XIX). En el experimento con crecimiento previo de 24 h, hubo inhibición en todos los hongos excepto en *Microsporum canis*, el cual creció completamente (Tabla XX). Bajpai y colaboradores en 2009, reportan halos de inhibición para el aceite esencial de *Magnolia liliflora*, de 17.12 mm hasta 26.47 mm contra 3 cepas de dermatofitos como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis* (Bajpai V., et al., 2009)<sup>b</sup>. A diferencia de lo reportado por Bajpai, el análisis realizado en la presente investigación, muestra una buena actividad antidermatofítica al mostrar halos de inhibición más grandes.

La actividad antifúngica del aceite esencial de especies de *Origanum*, ha sido evaluada contra *Candida albicans* y otros hongos como *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Penicillium cyclopium* (Vági E., et al., 2005; Manohar V., et al., 2001). Por esta razón, se consideró la posibilidad de que el aceite esencial de *Origanum majorana* pudiera tener acción contra los diferentes hongos dermatofitos; pues son escasos los reportes, donde se evalúa la actividad antidermatofítica del aceite esencial *Origanum majorana*.

Los resultados obtenidos para ambas fracciones del aceite en el experimentos mediante la técnica de difusión en disco, se mostraron zonas de inhibición desde 27 mm hasta la inhibición completa del dermatofito, lo que representa una buena actividad antifúngica; sin embargo, el aceite esencial de esta planta no muestra inhibición para la cepa de *Microsporum canis* (Tabla XIX). En el experimento 2 donde se evaluó la inhibición de dermatofitos en placa, con crecimiento previo de 24 h, se encontraron halos de inhibición de 18 mm contra algunas cepas de dermatofitos para las dos fracciones de aceites (Tabla XX).

La inhibición contra las diferentes cepas de dermatofitos, por parte del aceite esencial de *Origanum majorana*, fue buena al mostrar grandes diámetros de inhibición. Este resultado es importante por que no existía ningún reporte de actividad antidermatofítica. Para corroborar la buena difusión de cada aceite esencial en el agar, se realizó un experimento donde se evaluó la inhibición del crecimiento microbiano por difusión en pozo de 6 mm de diametro (Experimento 3; Tabla XXI). En este experimento se encontraron resultados parecidos a los experimentos previos; sin embargo, como se siguieron obteniendo resultados donde la inhibición era completa, se realizó un último experimento donde se corroborara y analizara el efecto y/o actividad de los componentes volátiles de los aceites esenciales. En este último experimento, un papel filtro de 6 mm de diámetro, se impregnó 5 µL de los aceites esenciales que tuvieron actividad en la prueba preliminar y se dispuso en la tapa de la caja de agar APD, es decir, sin tener contacto directo con el agar (Experimento 4; Tabla XXII).

Se observaron halos de inhibición desde 33 hasta 70 mm, e inclusive la inhibición completa del hongo como fue el caso de *Microsporium gypseum*, *Trichopyton rubrum* y *Epydermophyton floccosum*, corroborando que existe una buena actividad antifúngica posiblemente debido a los componentes volátiles de los aceites esenciales.

Es importante mencionar que los aceites que no mostraron actividad antifúngica contras las 6 cepas de dermatofitos en estos experimentos y fueron descartados desde el experimento preliminar, fueron las 2 fracciones de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*, *Chrysactinia mexicana gray*, y los aceites de hoja y fruto de *Schinus molle* (Tabla XVIII). Algunos de estos aceites están reportados con actividad antifúngica contra otros hongos. Tal es el caso de la planta de *Rosmarinus officinalis*, la cual fue evaluada por Centeno y colaboradores en 2010, mediante la técnica de difusión en disco. En esa investigación, el extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* reportó mm de inhibición entre 11.6 y 16 mm contra cepas de hongos filamentosos como *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus flavus* (Centeno S., et al., 2010). Los resultados obtenidos no mostraron actividad antifúngica de ninguna de las 2 fracciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, por lo que se podría sugerir que en el extracto alcohólico existen componentes en diferente proporción a los componetes del aceite esencial, los cuales le confieren actividad antifúngica al extracto alcohólico.

En esta investigación, ninguna de las 2 fracciones (incolora y amarilla) de aceite esencial de *Chysactinia mexicana gray* presentaron actividad antifúngica contra las 6 cepas de dermatofitos. Sin embargo, Cárdenas-Ortega y colaboradores, reportan la actividad antifúngica del aceite esencial de *C. mexicana Gray* contra una cepa de hongo filamentoso como *Aspergillus flavus* a CMI de 1 a 1.25 µg/mL. En su investigación, describen que las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Chysactinia mexicana Gray*, son debido a los componentes mayoritarios como el eucaliptol y la piperitona. Puesto que en ninguna las fracciones del aceite esencial de *Chysactinia mexicana gray* en la presente investigación, se

identificaron estos componentes, podría ser ese el motivo por el cual no existe actividad antifúngica (Cárdenas-Ortega N.C., et al., 2005).

Según lo reportado por Bedi y Shenefelt en 2002, los monoterpenos que se encuentran en el aceite esencial de *Malealuca alternifolia*, actúan como antimicrobianos y son agentes sensibilizantes en la piel. Por lo que son considerados más seguros y efectivos para el tratamiento del acné (Bedi M.K. y Shenefelt P., 2002). Este análisis coincide con lo que se reporta en la presente investigación, ya que los aceites esenciales con mayor porcentaje de compuestos monoterpenos resultaron ser los de mejor actividad y puede sugerirse que serían efectivos para el tratamiento de infecciones dermatológicas.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIÓN

- La técnica de hidrodestilación permitió extraer en total 12 aceites esenciales de las 6 plantas evaluadas del noreste de México con un porcentaje de rendimiento de 0.06 y 1.93 %.
- Se identificó entre el 85 – 90 % de los componentes de los 12 aceites esenciales por cromatografía de gases y espectrometría de masas y cromatografía de gases con detector de ionización a la flama, desarrollando su índice de Kovats e índice aritmético.
- Los componentes identificados de los 12 aceites fueron en su mayoría (cerca del 90%) monoterpenos y sesquiterpenos. Esta composición podría ser un factor importante en la actividad antimicrobiana de los aceites.
- Los 12 aceites esenciales mostraron una baja reducción del radical libre DPPH (del 10 al 40 %) a una concentración máxima de 250 µg/mL por la técnica de DPPH.
- En relación a la actividad antibacteriana contra las cepas de *Staphylococcus aureus* ATTC 12598, *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina IMSS/HE 25:01 y *Streptococcus pyogenes*, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (fracción única), *Origanum majorana* (fracción incolora y amarilla) y el aceite esencial de hoja de *Schinus molle* (fracción incolora) fue baja con respecto a la oxacilina y vancomicina.

- Se demostró que los aceites esenciales de *Magnolia grandiflora*, *Thymus vulgaris* y *Origanum majorana* (fracción incolora y amarilla), inhibieron el crecimiento de los dermatofitos *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum*. Sin embargo, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* resultó ser el mejor inhibiendo el crecimiento de las 6 diferentes cepas de hongos.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris*, originario del noreste de México, presentó la mejor actividad antimicrobiana contra las 3 cepas bacterianas y las 6 cepas de dermatofitos.

## PERSPECTIVAS

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales que resultaron activos contra las diferentes cepas de dermatofitos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de otros componentes presentes en los aceites esenciales.
- Determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales utilizando otros métodos con diferente mecanismo de acción que el DPPH como la técnica Xantina Oxidasa.
- Formular mediante sistemas coloidales, el aceite esencial que resultó mejor actividad antimicrobiana.

## Bibliografía

Abad M.J., Ansuategui M., Bermejo, P. Active antifungal substances from natural sources. Issue in Honor of Prof. Atta-ur-Rahman. ARKIVOC. vii : 116-145 (2007).

Adams R.P. Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured Pub Corp. Cuarta edición (2007).

Arenas R. Dermatofitosis en México. Revista Iberoamericana de Micología.19: 63-67 (2002).

Bajpai V., Yoon J., Kang S.C. Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. Food and Chemical Toxicology. 47: 1355-1361 (2009)<sup>a</sup>.

Bajpai V., Yoon J., Kang S.C. Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. Food and Chemical Toxicology. 47: 2606-2612 (2009)<sup>b</sup>.

Bakkalia F., Averbecka S., Averbecka D., Idaomarb M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 46(2): 446-475 (2008).

Bedi M.K., Shenefelt P. Herbal therapy in Dermatology. Archival Dermatology. 138: 232-242 (2002).

Bensouilah J., Buck P. Aromadermatology: Aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions. Radcliffe Publishing Ltd. Primera edición (2006).

Bonifaz A. Micología Médica. McGraw Hill editores. Tercera edición pp: 59-99 (2009).

Brown D.J. and Dattner A.M. Phytotherapeutic approaches to common dermatologic conditions. *Archival Dermatology*. 134: 1401-1403 (1998).

Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C., Rodrigues M.R., Corazza F.C., Oliveira V., Cansian R.L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*. 25: 207-211(2008).

Cárdenas-Ortega N.C., Zavala-Sánchez M.A., Aguirre-Rivera R., Pérez-González C., Pérez-Gutiérrez S. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4347-4349 (2005).

Centeno S., Calvo M.A., Adelantado C., Figueroa S. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 13 (9): 425-455 (2010).

Cerpa M. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, España (2007).

Chan L.W., Cheah E.L.C., Saw C.L., Weng W., Heng P. Antimicrobial and antioxidant activities of Cortex *Magnoliae officinalis* and some other medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Chinese Medicine BioMed Central*. 3 (15): 1-10 (2008).

CLSI Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast: Approved guideline- Second edition. CLSI document M-44-A2.vO. 29 (17), (2009).

Cordell G.A. Biodiversity and drug discovery a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 55: 463-480 (2000).

Dattner A.M. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. *Dermatologic Therapy*. 16: 106-113 (2003).

De Lisi A., Tedone L., Montesano V., Sarli G., Negro D. Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. *Food Chemistry*. 125: 1284-1286 (2011).

Devici O., Sukan A., Tuzun N., Kocabas E.H. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (21): 2211-2216 (2010).

Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de egresos hospitalarios por morbilidad en Instituciones Públicas, 2004- 2007. [en línea]: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud. <<http://www.sinais.salud.gob.mx>> [Consulta: 03 sept 2010].

Edris A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research* in press. DOI:10.1002/ptr.2072 (2007).

Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005, OMS.Ginebra.

Failero L., Miguel G., Gómes S., Costa L., Venâncio F., Figueiredo C., Barroso J.G., Pedro L.G. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8162-8168 (2005).

Fuselli S., García de la Rosa S., Gende L., Eguaras M., Fritz R. Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils, against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood. *Journal of Apucultural Research and Bee World*. 45(1): 2-7 (2006).

Genena A., Hense H., Smania A. Machado de Souza S. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28 (2): 463-469 (2008).

Gerbino P. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 21st. edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Philadelphia, U.S.A. pp 1277-1280 (2006).

González L.C. Introducción a la Fitopatología. 1ra. edición. ICA editores. San José, Costa Rica pp 132-154 (1981).

Grigore A., Paraschiv I., Colceru-Mihul S., Bubueanu C., Draghici E., Ichim M. Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatile oil obtained by two different methods (2010).

Guevara B., Torres A., Rivas V., Salazar R., Waksman N., Pérez-López L.A., Salazar R. Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the essential oil and 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithienyl isolated from *Chrysactinia mexicana* Gray roots. *Natural product communications*. 6: 1-3 (2011).

Habif T., Campbell J.L, Chapman M.S., Dinulos J., Zug K. Enfermedades de la piel: Diagnóstico y tratamiento. 2da.Edición. Elsevier Mosby. Madrid, España. pp 2-10 (2006).

Hákan-Gustafsson K., Fahlgren C.H. The volatile constituents of *Schinus molle* L. *Journal of Agriculture and food chemistry*. 31: 463-466 (1983).

Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 195-199 (2002).

Hosni K., Jemli M., Dziri S., M´rabet Y., Ennigrou A., Sghaier A., Casablanca H., Vulliet E., Ben Brahim N., Sebei H. Changes in phytochemical, antimicrobial and free radical scavenging activities of the Peruvian pepper tree (*Schinus molle*) as influenced by fruit maturation. 34: 1622-1628 (2011).

Hu C., Kitts D., Studies on the antioxidant activity of *Echinaceae* root extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (5):1466–1472 (2000).

Huang D., Ou R., Prior R. The Chemical behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 1841-1856 (2005).

Husnu Can Baser K., Demirci B., Iscan G., Hashimoto T., Demirci F., Noma Y., Asakawa Y. The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* Boiss. Chemical Pharmarmacy Bulletin. 53 (6): 222-225 (2006).

Isaza J.H. Determinación espectrofotométrica de la actividad inhibitoria de la xantina oxidasa en extractos de algunas plantas melastomataceas. Scientia Et Technica. 13 (33): 307-310 (2007).

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.

Jiménez Medina D., Cordero-Gallardo A., Rojas L., Rodríguez M. Estudio de los componentes volátiles de las hojas y flores de *Magnolia grandiflora*, que crece en el Estado de Mérida, Venezuela. Revista de la Facultad de Farmacia. 49 (1): 2-4 (2007).

Johnson L. Dermatophytes- the skyn eaters. *Mycologist*, Part 4. 17: 1-4 (2003).

Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S., Aromdee C., Khunkitti W. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *The International Journal of Aromatherapy*. 16: 43-49 (2006).

Luqman S., Dwivedi G.R., Darokar M.P., Kalra A., Khanuja S.P. Potencial of Rosmary oil to be used in drug-resistant infections. *Alternative therapies*. 13 (5): 54-58 (2007).

Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. *Enfermedades infecciosas: Principios y práctica*. 6ta. edición. Primer volumen. Editorial Elsevier. Madrid, España pp: 198-210 (2006)

Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N., Echard B., Bagchi D., Preuss H. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Celular Biochemistry*. 228: 111-117 (2001).

Marzouk M., Moharram F., Haggag E., Ibrahim M., Badary O. Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*. *Phytotherapy research*. 20: 200-205 (2006).

Moelin M.R., Ghasemi Y., Mocin S., Nejab M. Analysis of antimicrobial, antifungal and antioxidant activites of *Juniperus excelsa* M.B. subs. *Polycarpos* (k.Koch) *Takhtajan* essential oil. *Pharmacognosy and Pharmaceutical Research*. 2(3) : 128-131 (2010).

NCCLS. Performance standars for antimicrobial susceptibilty testing; twelve informational supplement. NCCLS document M-100-S12 (2002).

Molina-Salinas G.M., Pérez-López A., Becerril-Montes P., Salazar-Aranda R., Said-Fernández S., Waksman-Torres N., Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 109:435-441 (2007).

Mosquera O., Niño J., Correa Y., Buitrago D. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica*. Año XI. 27: 231-235 (2005).

Nakatsu T., Lupo A.T., Chinn J.W., Kang R.K.L. Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Product Chemistry: Atta-ur-Rahman*. 21: 577-631 (2005).

Nelson K., Williams C., Graham Neil. *Epidemiología de las enfermedades infecciosas: Teoría y práctica*. 1ra. edición. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, EUA pp: 25-30 (2000).

Okeke I.N., Laxminarayan R., Bhutta Z.A., Duse A.G., Jenkins P., O'Brien T.F., Pablos-Méndez A., Klugmon K.P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *The Lancet* 5 (8): 481-493 (2005).

Olshansky, J., Carnes B., Rogers R. and Smith L. Infectious Diseases-New and Ancient Threats to World Health. *Population Bulletin*. 52 No. 2 (1997).

Osorio Durango J. Aspectos básicos de farmacognosia. 1ra.edición. Editorial de la Universidad de Antioquia pp: 22-24 (2009).

Sáenz-Anduaga E., Sánchez-Saldaña L. Antibióticos tópicos. *Dermatología Peruana*. Educación médica continua. 15(1): 7-20 (2005).

Sartoratto A., Machado A.L., Delarmelina C., Figueira G.M., Duarte M.C., Rehder V.L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 275-280 (2004).

Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Goncalves M.J., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A., Martínez-de-Olivera J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. 55: 1367-1373 (2006).

Restrepo-Sánchez D. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*. 32(6):1517-1522 (2009).

Rice L.B. Unmet medical needs in antibacterial therapy. *Biochemical pharmacology*. 71: 991-995 (2006).

Roldán L.P., Díaz G.J., Durringer J.M. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 23 (4): 1-13 (2010).

Salazar-Aranda R., Pérez-López L.A., López-Arroyo J., Alanís-Garza B., Waksman N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast Mexico. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2011: 1-6 (2009).

Sarker S.D., Maruyama Y. *Magnolia: The genus magnolia*. 1ra. edición. Taylor y Francis Group. EUA. pp: 20-37 (2002).

Sartoratto A., Machado A.L., Delarmelina C., Figueira G.M., Duarte M.C., Rehder V.L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 275-280 (2004).

Sellami I.H., Maamouri E., Chahed T., Wannas W.A., Kchouk M.E., Marzouk B. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana L.*) Industrial Crops and Products. 30(3): 395-402 (2009).

Soković M., Marin P., Brkic D., Van Griensven L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. Food Global Science Books. 1(1): 1-4 (2007).

Swartz N.M. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 44(8): 2009-2016 (2000).

Tabanca N., Demirci B., Husnu Can Baser K., Aytac Z., Ekici M., Khan S., Jacob M., Wedge D. Chemical composition and antifungal activity of *Salvia macrochlamys* essential oils. Journal of Agriculture Food Chemistry. 54: 6593-6597 (2006).

Tortora G., Fumke R.B., Case L.C. Introducción a la anatomía. 9na edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina pp: 427-430 (2007).

Trillo F.I. Tratado de Farmacia Galénica. Luzán 5 Ediciones. Madrid, España. pp: 675-690 (1993).

Trommer H., Neubert R. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. Skin Pharmacology and Physiology. 19: 106-121 (2006).

Vági E., Simándi B., Suhajda A., Héthelyi E. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana L.* extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food research international. 38: 51-57 (2005).

Welsh O., Welsh E., Ocampo-Candiani J., Gómez M., Vera-Cabrera L., Mycoses. 49 (2): 119-123 (2006).

Welsh O., Welsh E., Vera-Cabrera L. Infecciones dermatológicas frecuentes. In: Infectología clínica. El Manual Moderno S.A. de C.V. Primera edición. pp: 125- 143 (2008).

Weerakkody N., Caffin N., Turner M., Dykes G.A. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control. 21: 1408-1414 (2010).

Woo J.J, Bok kyung H., Kwang W., Moo Sung K., Ih Seop C., Hee Yun K., Hong Yon C. Antioxidant effects of *Origanum majorana L.* on superoxide anion radicals. Food Chemistry. 71: 439-444 (2001).

Yadegarinia D., Gachkar L., Bagher R.M., Taghizadeh M., Asteneh S.A., Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita L.* and *Myrtus communis L.* essential oils. Phytochemistry. 67: 1249-1255 (2006).

Yang S., Sang-kyung L., Eun-Jung I., Nam-Kyung I., Kwang-Hwan J., Sam-Pin L., In-Seon L. Radical Scavenging activity of the essential oil of silver fir *Abies alba*. Journal of Clinical Biochemistry. 44: 253-259(2006).

Zahed N., Hosni K., Brahim N., Sebei H. Essential oil composition of *Schinus molle L.* fruits: an ornamental species used as condiment. Journal of Food Biochemistry. 35: 400-408 (2011).

Zhenhong L., Chemical analysis of *Magnolia liliflora* essential oil and its pharmacological function in nursing pregnant women suffering from decubitus ulcer. Journal of Medicinal Plants Research. 5(11): 2283-2288 (2011).