

COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* H.B.K

GENOVEVA HERNÁNDEZ ZAMUDIO

TESIS

**Presentada como requisito parcial para
obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
AGRARIA ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

Dirección de Posgrado

Torreón, Coahuila, México.

Octubre de 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIRECCIÓN DE POSGRADO

**COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens* H.B.K**

POR

GENOVEVA HERNÁNDEZ ZAMUDIO

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor principal _____


Dr. Raúl Villegas Vizcaíno

Asesor: _____


M.C. José Luis Corona Medina

Asesor: _____


M.C. Sara Elisa Alonzo Rojo


Dr. Jerónimo Landeros Flores

Director de Posgrado


M. C. Gerardo Arellano Rodríguez
Jefe del Departamento de Posgrado

Torreón, Coah. México

Octubre de 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIRECCIÓN DE POSGRADO

**COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Lippia graveolens H.B.K**

POR

GENOVEVA HERNÁNDEZ ZAMUDIO

Elaborado bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor

Dr. Raúl Villegas Vizcaíno

AGRADECIMIENTOS

Al establo San Gabriel, S.A. de C.V. por su apoyo económico.

Al Laboratorio de Microbiología del la clínica 71 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Torreón, Coahuila, por proporcionarme todas las facilidades para la realización de los experimentos.

A las autoridades de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el apoyo proporcionado para la continuación del programa.

Al Dr. Miguel Arenas Vargas, por ser una inspiración y sobre todo por la creación del grupo de Posgrado en Ciencias Agropecuarias, en la UAAAN-UL.

Al Dr. Raúl Villegas Vizcaíno, por la paciencia y tiempo invertidos en el proceso de mi formación académica.

Al Dr. Rafael Rodríguez Martínez, por la valiosa contribución en este trabajo, sobre todo en mi formación.

A mis colaboradores en los proyectos de investigación: M. C. Sara Elisa Alonzo Rojo, Q.F.B. Marisela del Rocío González Martínez, M. C. José Luís Corona Medina, M.C. Margarita Mendoza Ramos y a la pasante de Ingeniero en Agroecología Margarita Ramírez Guerrero, por ser parte importante en la realización de este trabajo.

A la M.S. Teresa Valdez Peresgasga por su ayuda en el proceso de traducción.

A mis compañeros del posgrado por la revisión de mis trabajos y por lo aprendido en cada uno de los de ellos.

A mis amigos por su apoyo y aliento constante en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi madre

Por su presencia constante en mi mente y en mi corazón.

Especialmente a mi hermano Salomón

Causa e inspiración de mis esfuerzos

PREFACIO

El manejo de los recursos naturales renovables de manera sustentable, es importante no sólo por la parte ambiental sino también por la parte social y económica que involucra el manejo de estos recursos. La actividad de la recolección del orégano representa ingresos importantes para muchos de los ejidatarios del municipio de Torreón, Coah., especialmente en los meses del año en que no hay actividades agrícolas.

El orégano es un recurso natural propio de las zonas áridas y semiáridas de la República Mexicana. Es recolectado de poblaciones nativas por los ejidatarios y generalmente vendido a bajo precio sin procesos de valoración, por lo que los pobladores del Barrial de Guadalupe, en el municipio de Torreón, Coah., instalaron una planta beneficiadora de aceite de orégano para darle mayor valor a su producto.

Lo anterior generó la necesidad de caracterizar el aceite de orégano e indagar sus alternativas de uso. Por ello se realizó la búsqueda de información científica reciente sobre las cualidades y actividades de los aceites esenciales, mediante dos plataformas tecnológicas para la gestión de información en bases electrónicas de datos¹.

Los artículos identificados se obtuvieron en bibliotecas, por solicitud a los autores y a través de paginas en Internet que proporcionan la información como High Wire Press[®] de la Universidad de Stanford.

¹ EndNote[®] y Procite[®] versión 5 para Windows.

Con los artículos recuperados se diseñó un protocolo para la evaluación de la actividad antibacteriana del orégano, que permitió la gestión exitosa de los apoyos del Establo San Gabriel, S.A. de C. V., el Laboratorio de Microbiología de la Unidad Médica de Altas Especialidades No. 71 del Instituto Mexicano del Seguro Social en Torreón, Coah., y el Cepario del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) que proporcionó las bacterias ATCC (American Type Culture Collection) usadas en los dos experimentos.

Los experimentos permitieron definir las concentraciones mínimas del aceite esencial de *Lippia graveolens*, necesarias para inhibir el crecimiento de bacterias causantes de mastitis en ganado bovino lechero y de bacterias obtenidas de pacientes del IMSS.

El trabajo está estructurado como tesis en la modalidad de artículos científicos, para lo cual se presentan dos artículos remitidos para su posible publicación a la Revista Agraria Nueva Época de esta Universidad y a la Revista Universidad y Ciencia de la Universidad Autónoma de Tabasco (Anexo 1).

COMPENDIO

**Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia graveolens*
H.B.K**

POR

GENOVEVA HERNÁNDEZ ZAMUDIO

**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Maestría en Ciencias Agropecuarias**

Torreón, Coah. 2007

Lippia graveolens H.B.K. (Verbenaceae), es una planta nativa del sur de los Estados Unidos de Norteamérica, México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá y Colombia. Es usada ampliamente en la medicina tradicional para el tratamiento de varias enfermedades, particularmente de desordenes gastrointestinales y respiratorios, además de utilizarse como sazónador de alimentos. Los componentes principales del aceite esencial son el carvacrol, el timol y sus precursores el *p*-cimeno y el γ -terpineno respectivamente. A estos compuestos se les han atribuido actividades antioxidantes, antiinflamatorias y biocidas (antibacteriana, antimicótico, antiviral, larvicida y acaricida). Los objetivos han sido la determinación de la composición química y la evaluación de la actividad antibacteriana de *L. graveolens* de Barrial de Guadalupe, Mpio. Torreón, Coahuila México. Al mismo tiempo la comparación con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. Los aceites se obtuvieron por el método de hidrodestilación. Los componentes se determinaron por medio de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y por Cromatografía de Gases. El principal constituyente de aceite esencial *L. graveolens* de fue el carvacrol, en

concentraciones de 72% a 95.86%, superiores a las reportadas en otros estudios para la misma especie. Los resultados de *Thymus vulgaris* el timol fue el mayor componente con 99.71%. Las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de *L. graveolens* han sido proporcionales a la concentración de carvacrol en el aceite, fluctuaron entre 10 µl/ml para *E. coli* como mayor y 0.0045 µl/ml para *S. aureus* y *S. tiphymurium*, menores a las reportadas para la misma especie. Las bacterias que no mostraron sensibilidad al aceite de *T. vulgaris* fue *E. coli* y *Ps. aeruginosa* con 3.05 µl/ml y la que mostraron mayor sensibilidad fue *S. aureus* con 0.024 µl/ml. De las bacterias probadas las Gram-positivas han mostrado mayor sensibilidad y entre ellas *S. aureus* ha sido la más sensible. Las Gram-negativas, presentaron menor sensibilidad y entre ellas la de mayor resistencia fue *Ps. aeruginosa*. Estos resultados confirman la alta actividad antibacteriana del aceite esencial de *L. graveolens* del Barrial de Guadalupe del municipio de Torreón, Coahuila. Además de la posibilidad de usar los aceites esenciales o algunos de sus componentes como antimicrobianos, apoyan la valoración médica de su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas. Asimismo apoya el uso de estas plantas en la medicina tradicional.

Palabras clave: Aceite esencial, actividad antibacteriana, carvacrol, *p*-cimeno, timol

ABSTRACT

Antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K

BY

GENOVEVA HERNÁNDEZ ZAMUDIO

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Maestría en Ciencias Agropecuarias

Torreón, Coah. 2007

Lippia graveolens H.B.K. (Verbenaceae), is a plant native to Southern U.S.A., Mexico, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panama and Colombia. It is widely used in traditional medicine for the treatment of several diseases, particularly gastrointestinal and respiratory disorders, as well as being used as food seasoning. The main components of the essential oil of this plant are carvacrol, thymol and their precursors p-cymene and γ -terpinene. These compounds have been attributed with antioxidant, antiinflammatory and biocide activities (antibacterial, antimycotic, antiviral, larvicidal and acaricidal). The objectives have been to determine the chemical composition and evaluate antibacterial activity of *L. graveolens* of Barrial de Guadalupe, Mpio. Torreón, Coah. Mex. and comparison with antibacterial activity with essential oil of *Thymus vulgaris* L. The essential oils have been obtained by hydrodistillation. The components were determined by means of Nuclear Magnetic Resonance of ^{13}C and Gas

Chromatography. The minimal inhibitory concentration was evaluated by macro dilution. The main constituent of the essential oil was carvacrol, in concentrations of 72% to 95.86%, superior to those reported in other studies for the same species. For *Thymus vulgaris*, its main component, timol accounted for 99.71%. The inhibitory minimum concentrations of the essential oil of *L. graveolens* were proportional to carvacrol concentration in the oil, fluctuating from 10 µl/ml for *E. coli* to 0.0045 µl/ml for *S. aureus* y *S. tiphymurium*, being smaller to those reported for the same species. Bacteria that were not sensitive to timol (3.05 µl/ml) were *E. coli* and *P. aeruginosa*, while *S. aureus* being most sensitive (0.024 µl/ml). Gram-positive bacteria showed higher sensitivity (*S. aureus* being most sensitive). Gram-negative bacteria, were less sensitive (*P. aeruginosa* beign most resistant). These results confirm antibacterial activity of the essential oil of *L. graveolens* of El Barrial de Guadalupe of the municipality of Torreón, Coahuila, and supports medical considerations for its use in treating bacterial infections.

Keywords: antibacterial activity; essential oil; Carvacrol; p-cymene; thymol.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
PREFACIO	VI
COMPENDIO	VIII
ABSTRACT	X
ÍNDICE DE CONTENIDO	XII
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	II
INTRODUCCIÓN	1
LOS ACEITES ESENCIALES	1
USOS DE LOS ACEITES ESENCIALES	2
LOS ACEITES ESENCIALES EN LA PLANTA	4
COMPONENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES	9
PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES	15
Antioxidante	16
Antiinflamatoria	17
Insecticida	18
Fungicida	18
Antiviral	20
Antibacteriana	21
MÉTODOS PARA LA VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES	24
Método de difusión en agar	26
El Método de Dilución	27
Métodos no-convencionales	29
MODO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES	29
Carvacrol y timol	33
Eugenol	34
El p-cimeno	34
DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA VERBENACEAE	35
ENCUADRE TAXONÓMICO DEL GENERO LIPPIA	35
DESCRIPCIÓN DEL GENERO LIPPIA	36
USOS TRADICIONALES DE LIPPIA SPP	41
<i>LIPPIA GRAVEOLENS</i> H.B.K.	43
LITERATURA CITADA	45
ARTÍCULOS EN REVISIÓN	55
Artículo 1. Enviado a <i>Agraria Nueva Epoca</i> 20 de Marzo de 2006	55
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (<i>LIPPIA GRAVEOLENS</i> H.B.K.)	55
Artículo 2. Enviado a la revista <i>Universidad y Ciencia</i> 22 de agosto 2006	63
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>LIPPIA GRAVEOLENS</i> H.B.K. Y <i>THYMUS VULGARIS</i> L.	63
DISCUSIÓN GENERAL	76
LITERATURA CITADA EN LA SECCIÓN DE DISCUSIÓN GENERAL	82
APÉNDICE 1	93

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de terpenos.	11
Cuadro 2. Componentes de los aceites esenciales con actividad antibacteriana.	22
Cuadro 3. Componentes de las especies del género <i>Lippia</i>	36
Cuadro 4. Contenido de carvacrol en aceites esenciales	87

Cuadros en los artículos

Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i>	67
Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales de <i>Lippia graveolens</i> y <i>Thymus vulgaris</i> , para diferentes cepas ATCC y nativas.	78

Figuras

Figura 1. Estructura básica de un nomófilo en corte transversal.	4
Figura 2. Diagrama esquemático de un tricoma glandular peltado, de una hoja de menta.	6
Figura 3. Cortes transversales de hoja de <i>Lippia graveolens</i>	8
Figura 4. Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides.	10
Figura 5. Estructura del isopreno.	12
Figura 6. Clasificación de sesquiterpenos	14
Figura 7. Mecanismos y sitios de acción antibacteriana de los aceites esenciales	30

Figuras en los artículos

Estructuras moleculares de los principales componentes de los aceites esenciales del orégano y el tomillo.	66
---	----

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas que se derivan de metabolitos secundarios de las plantas (Nelson, 2003; Ohno *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004) y que se caracterizan por su capacidad de generar sabor o aroma (Trombetta *et al.*, 2005).

Los aceites y extractos de plantas se han usado para una gran variedad de propósitos por miles de años (Hammer *et al.*, 1999; Bagamboula *et al.*, 2004). Existe evidencia que el hombre de Neardental que vivió hace 60,000 años en lo que hoy es Irak, usó la malvarrosa (Cowan, 1999).

De los aceites esenciales conocidos, sólo el aceite de trementina fue mencionado por los griegos y los historiadores romanos, éste se obtenía desde hace 2000 años por el método de destilación en Egipto, India y Persia. Los árabes mejoraron el método en el siglo IX. El primer informe escrito auténtico de destilación de aceite esencial se le atribuye al médico catalán Villanova (1235–1311). Para el siglo XIII los aceites esenciales eran obtenidos por farmacéuticos y sus efectos se describían en farmacopeas, pero su uso no se extendió hasta el siglo XVI en que se empezaron a comercializar en Londres, Inglaterra.

Dos médicos de Strassburgo, Brunschwig y Reiff publicaron por separado en el siglo XVI el proceso de destilación y los usos de diversos aceites esenciales entre los que destacan el de trementina, madera del junípero, romero, lavanda, clavo de olor, nuez moscada, anís y canela. Según el médico francés, Du Chesne (Quercetanus), en el siglo XVII la preparación de aceites esenciales era bien conocida y en las farmacias generalmente tenían de

15 a 20 aceites diferentes. Desde la colonización de Australia en el siglo XVIII, se ha usado el aceite del árbol de té con propósitos medicinales, aunque probablemente ya había sido usado por los nativos australianos. Se dice que la primera medición experimental de las propiedades bactericidas de los aceites esenciales fue llevada a cabo por De la Croix en 1881 (Burt, 2004).

Usos de los aceites esenciales

Estudios de los metabolitos secundarios de las plantas revelan su potencial aplicación en la industria alimenticia (como sazonadores y conservadores), en la de los cosméticos (como fragancia y cremas) y en la farmacéutica (en la aromaterapia y en la medicina alternativa) (Hammer *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000; Alma *et al.*, 2003; Lahlou, 2004). El uso principal de los aceites esenciales en la Unión Europea es como sazonador de alimentos, le sigue en importancia la aplicación en la industria de los cosméticos y finalmente como producto farmacéutico. El mercado de la aromaterapia utiliza el 2% del total de los aceites esenciales (Burt, 2004).

El uso de los aceites esenciales en la medicina es el principal tema de los artículos científicos que sobre ellos se publicaron en 1978 (Rios y Recio, 2005). Estos productos naturales extraídos de materiales vegetales tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria y biocida y propiedades anticancerígenas entre otras (Alma *et al.*, 2003; Szentandrassy *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales en lugar de los extractos de plantas han tenido un mayor uso en el tratamiento de patologías infecciosas, como las del sistema

respiratorio, tracto urinario, sistema gastrointestinal y biliar, así como de la piel. En el caso del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, por ejemplo, el uso del aceite esencial es una herramienta terapéutica común para tratar el acné y otros problemas infecciosos de la piel (Rios *et al.*, 2005; Tadeq *et al.*, 2005).

La inhalación de los vapores de los aceites esenciales tiene efecto en el aumento de los fluidos en el tracto respiratorio, manteniendo la ventilación y drenado de los senos paranasales, presentando actividad anti-inflamatoria en la tráquea y reduciendo el asma (Inouye *et al.*, 2001), esta manera de usarse sirve también para el tratamiento contra bronquitis agudas y crónicas , además de la sinusitis (Lahlou, 2004).

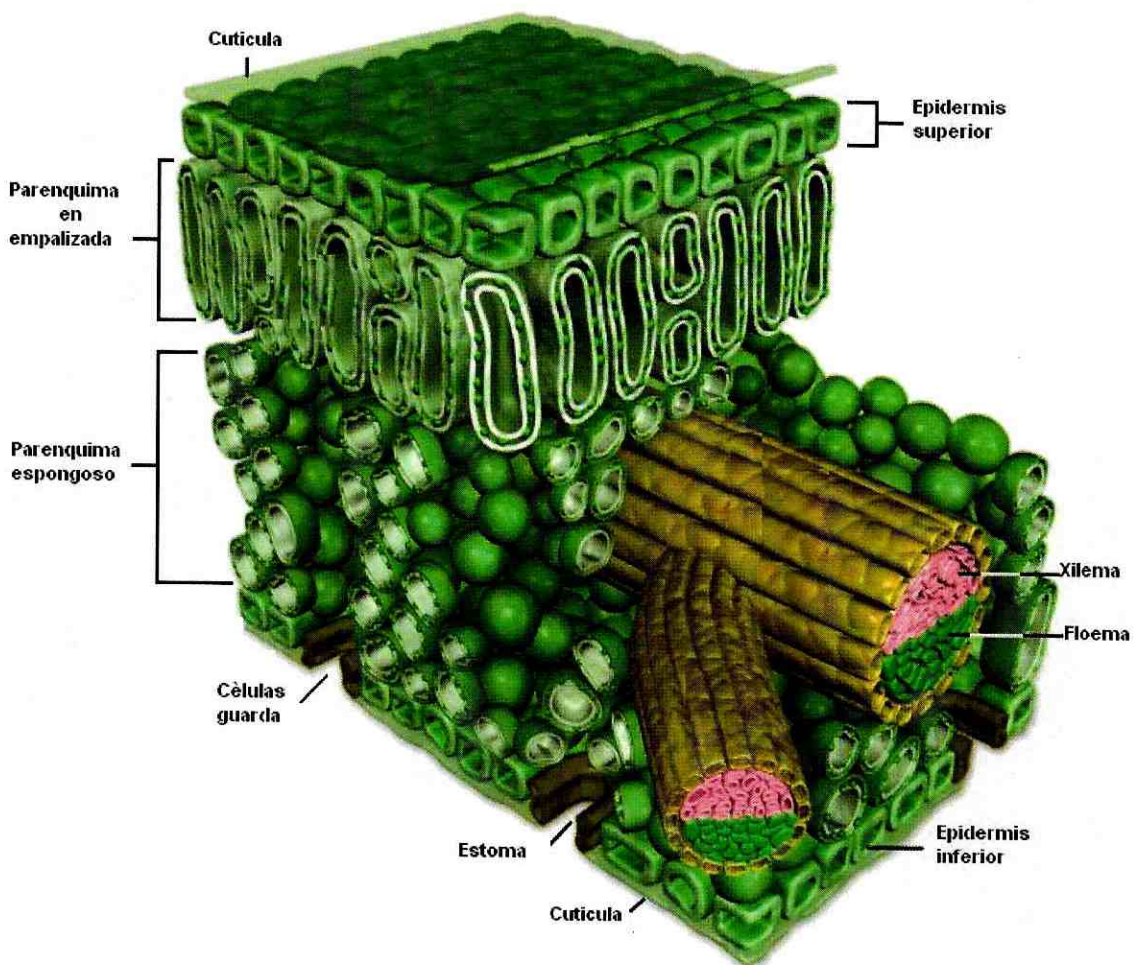
Los aceites esenciales se utilizan en la medicina alternativa para tratar infecciones producidas por bacterias y hongos, en forma de infusión para la gingivitis y la candidiasis vaginal (Hammer *et al.*, 1998), la malaria, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades del corazón, sarna, arteriosclerosis, diabetes, cáncer y caries (Hammer *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 1999; Inouye *et al.*, 2001; Katsura *et al.*, 2001; Girao *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004; Trombetta *et al.*, 2005).

Además, se usa contra larvas de mosquitos (Carvalho *et al.*, 2003; Dharmagadda *et al.*, 2005), piojos (Oladimeji *et al.*, 2000) y ácaros (Trombetta *et al.*, 2005).

Los aceites esenciales en la planta

En términos generales la hoja (nomófilo) esta compuesta por la cutícula, la epidermis superior, parénquima en empalizada, seguido por el tejido parénquima esponjoso que contiene los haces vasculares (xilema y el floema), nuevamente el parénquima en empalizada la epidermis y la cutícula inferior (Figura 1).

Figura 1. Estructura básica de un nomófilo en corte transversal.

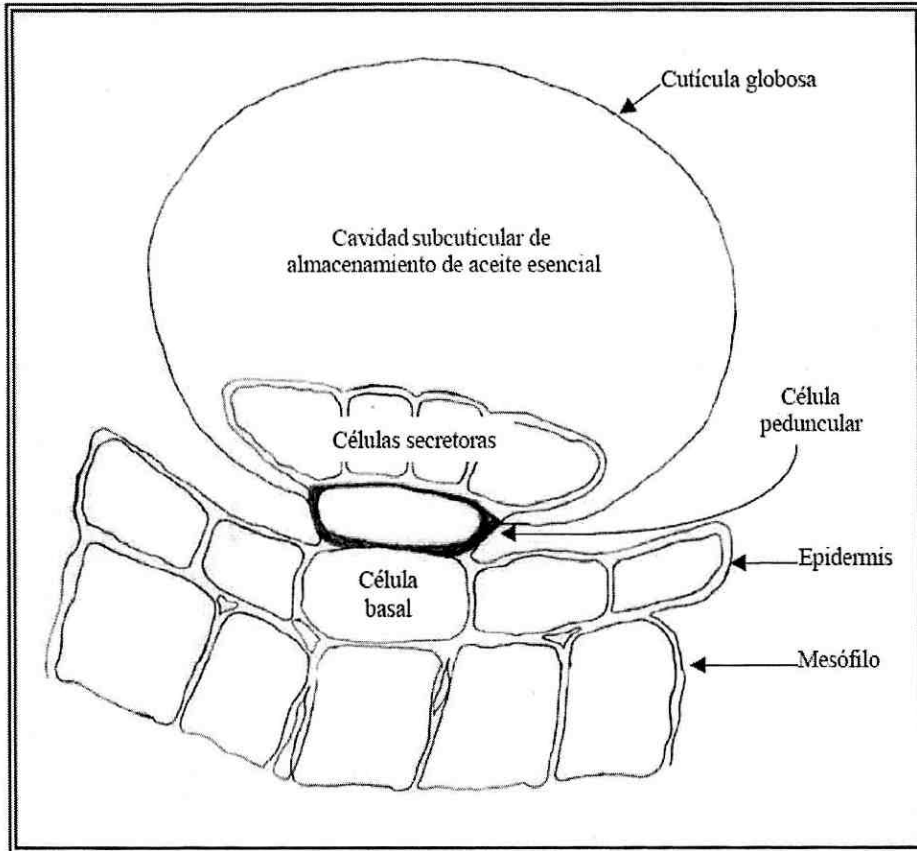


Fuente: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/leaftissue/leaftissuelarge.html>

En la epidermis de las hojas es donde se pueden encontrar unas estructuras llamadas tricomas, los cuales pueden ser unicelulares o multicelulares y se derivan de la capa celular epidérmica. Los tricomas multicelulares se presentan en muchas especies de plantas (Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000) y existen dos tipos: el simple o no glandular (probablemente no secretor) y los glandulares o secretores de aceites esenciales (Wagner *et al.*, 2004).

Los tricomas son las primeras células epidérmicas que empiezan a diferenciarse en la epidermis del desarrollo del primordio de la hoja. (Schwab *et al.*, 2000). Estos se encuentran en gran parte de la planta, en las hojas, en los tallos y en la raíz, pero no están presentes en los cotiledones. Su morfología y densidad difieren ampliamente dependiendo de la parte de la planta donde se encuentren (Lange *et al.*, 2000; Valkama *et al.*, 2003; Schellmann y Hulskamp, 2005). Su estructura básica consiste de una célula basal, una célula peduncular y una cavidad subcuticular (Figura 2). Las investigaciones sobre su morfología e histoquímica se han realizado preferentemente en las especies de las familias *Asteraceae* y *Lamiaceae* (Kolb y Muller, 2004).

Figura 2. Diagrama esquemático de un tricoma glandular peltado, de una hoja de menta.



Fuente: Turner et al., 2000

Las glándulas secretoras de los tricomas, tienen la capacidad de secretar fitoquímicos que podrían favorecer la resistencia de la planta a los insectos, microbios y herbívoros, por medio del contacto directo, lo cual proporciona una primera línea de defensa contra estos organismos durante el tiempo quizás necesario para la activación de defensas inducidas (Wagner *et al.*, 2004)

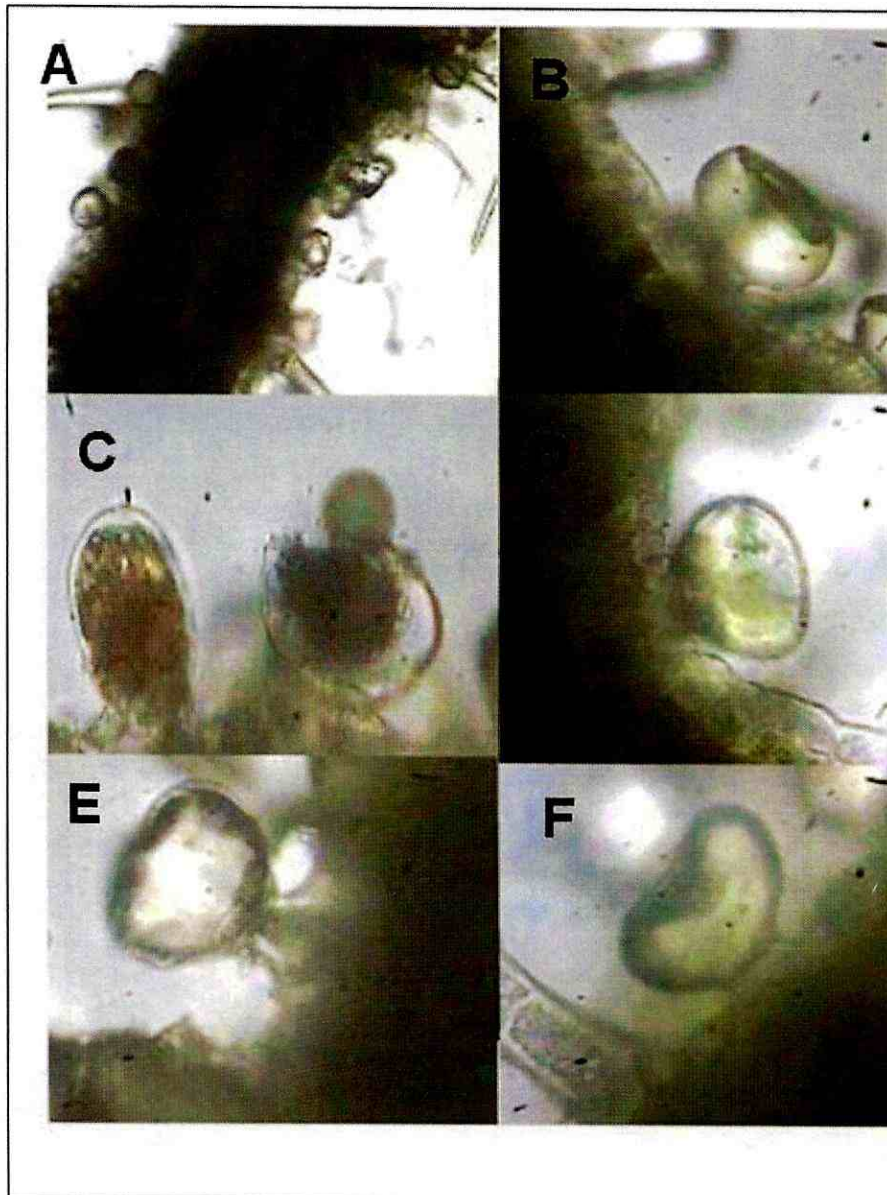
La presencia de tricomas es un elemento importante para la clasificación de las plantas. Actualmente representan sistemas útiles para el estudio de la diferenciación y desarrollo celular (Kolb *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2004). Dado

el valor comercial de los aceites esenciales, los procesos participantes en su biosíntesis y secreción son objetivos interesantes para la ingeniería genética (Lange *et al.*, 2000).

Los tricomas glandulares producen y secretan una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica, tales como los terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos), fenoles, alcaloides y ésteres de sacarosa (Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000; Valkama *et al.*, 2003; Kolb *et al.*, 2004; Ranger *et al.*, 2005). Son compuestos orgánicos producidos por vegetales, que no están involucrados en los procesos de asimilación, respiración, transporte y diferenciación, a los que se atribuyen funciones de protección frente al ataque de herbívoros y a las infecciones microbianas (Schiestl *et al.*, 2000; Dudareva *et al.*, 2004).

En cortes transversales de hojas de *L. graveolens* se pueden apreciar tricomas tanto en el haz como en el envés (Figura 3A), tricomas con la cavidad subcuticular vacía o rota (Figuras 3B y 3C), tricomas en los que destacan las células secretoras o las pedunculares (Figuras 3D y 3E) y tricomas no glandulares (Figura 3F).

Figura 3. Cortes transversales de hoja de *Lippia graveolens*.



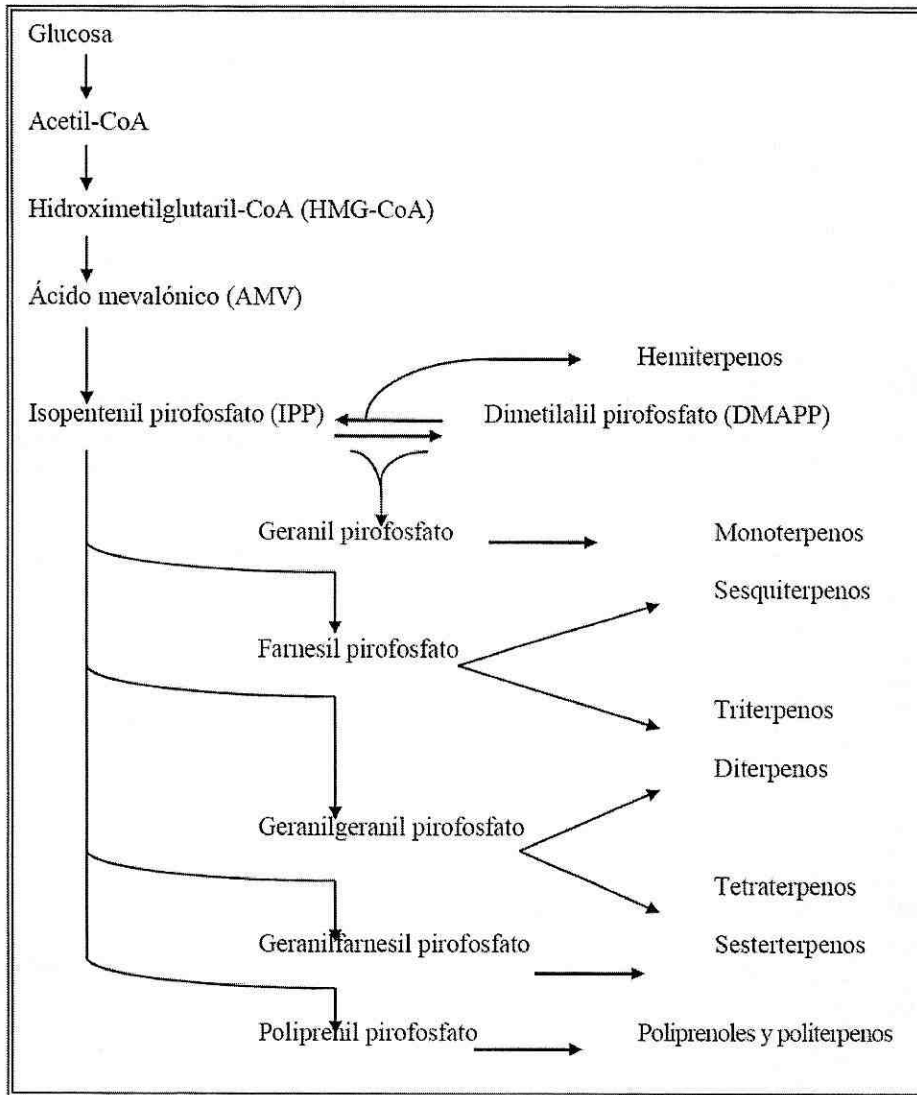
Fuente: Elaboración propia

Componentes de los aceites esenciales

Actualmente se identifican tres diferentes rutas metabólicas de origen de los componentes volátiles de los aceites esenciales: 1) La vía del ácido mevalónico que da origen a los terpenoides, 2) La vía del ácido siquímico que origina los fenil propanoides, y 3) La biosíntesis de ácidos grasos y compuestos alicíclicos (Rosa-Putra *et al.*, 2001).

Los isoprenoides, más conocidos como terpenoides o terpenos, son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico (AMV) y que origina el isopentenil pirofosfato (Figura 4). Wallach en 1887 propuso la clasificación aún aceptada de este grupo de compuestos atendiendo al número de átomos de carbono de los mismos (cuadro 1). Se cree que el nombre de terpenos deriva de la palabra equivalente a trementina y que se adoptó precisamente porque el aceite de trementina fue el primero del cual se tiene testimonio escrito (Bohlmann *et al.*, 1998; Cowan, 1999).

Figura 4. Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides.



Fuente: (Muhlbauer *et al.*, 2003)

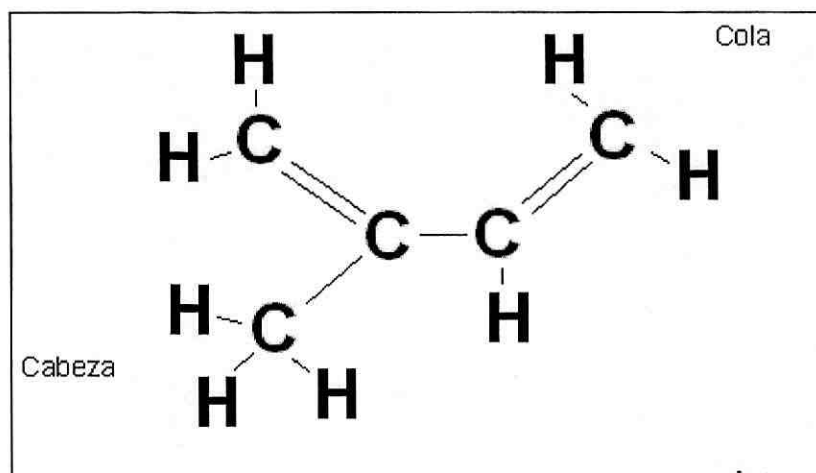
Cuadro 1. Clasificación de terpenos.

Grupo	N° de átomos de carbono	N° de unidades de isopreno
Hemiterpenos	5	1
Monoterpenos	10	2
Sesquiterpenos	15	3
Diterpenos	20	4
Sesterpenos	25	5
Triterpenos	30	6
Tetraterpenos	40	8
Politerpenos	5 n	N

Fuente: Wallach, 1987

La unidad estructural básica de los terpenoides es el isopreno (Figura 5), constituido por cinco átomos de carbono. Su polimerización da lugar a los distintos tipos de terpenos conocidos. Atendiendo al origen del enlace que se produce en la formación de compuestos de diez o más átomos de carbono, se habla de terpenos “regulares” y terpenos “irregulares”. Los primeros provienen de isoprenos unidos de forma regular “cabeza-cola”, los cuales pueden diferenciarse en el compuesto resultante, la mayoría de los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos son de este tipo. Los terpenos irregulares son menos comunes, aunque caracterizan un grupo de monoterpenos en los cuales no se pueden diferenciar las unidades de isopreno al originarse de uniones “cabeza-mitad”. Pueden encontrarse en algunas especies de los géneros *Santolina* L., y *Artemisia* L. (Rosa Putra *et al.*, 2001(Cowan, 1999; Dorman *et al.*, 2000; Tognolini *et al.*, 2006).

Figura 5. Estructura del isopreno



La mayoría de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos son compuestos cíclicos, con estructuras típicas de cada uno de estos grupos como β -pineno, α -cadineno, ácido dextropimárico o lanosterol. Los tetraterpenos difieren del resto de grupos de compuestos isoprenoides en que la estructura del esqueleto de carbono principal no es cíclica, salvo excepciones, como en el caso de β -caroteno (Steele *et al.*, 1998).

Los monoterpenos presentan gran variabilidad de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y otros compuestos oxigenados que, en conjunto, engloban gran cantidad de isómeros no sólo funcionales sino también de posición y geométrica. Están considerados como una de las familias más grandes de productos naturales (Bohlmann *et al.*, 1997; Aharoni *et al.*, 2003).

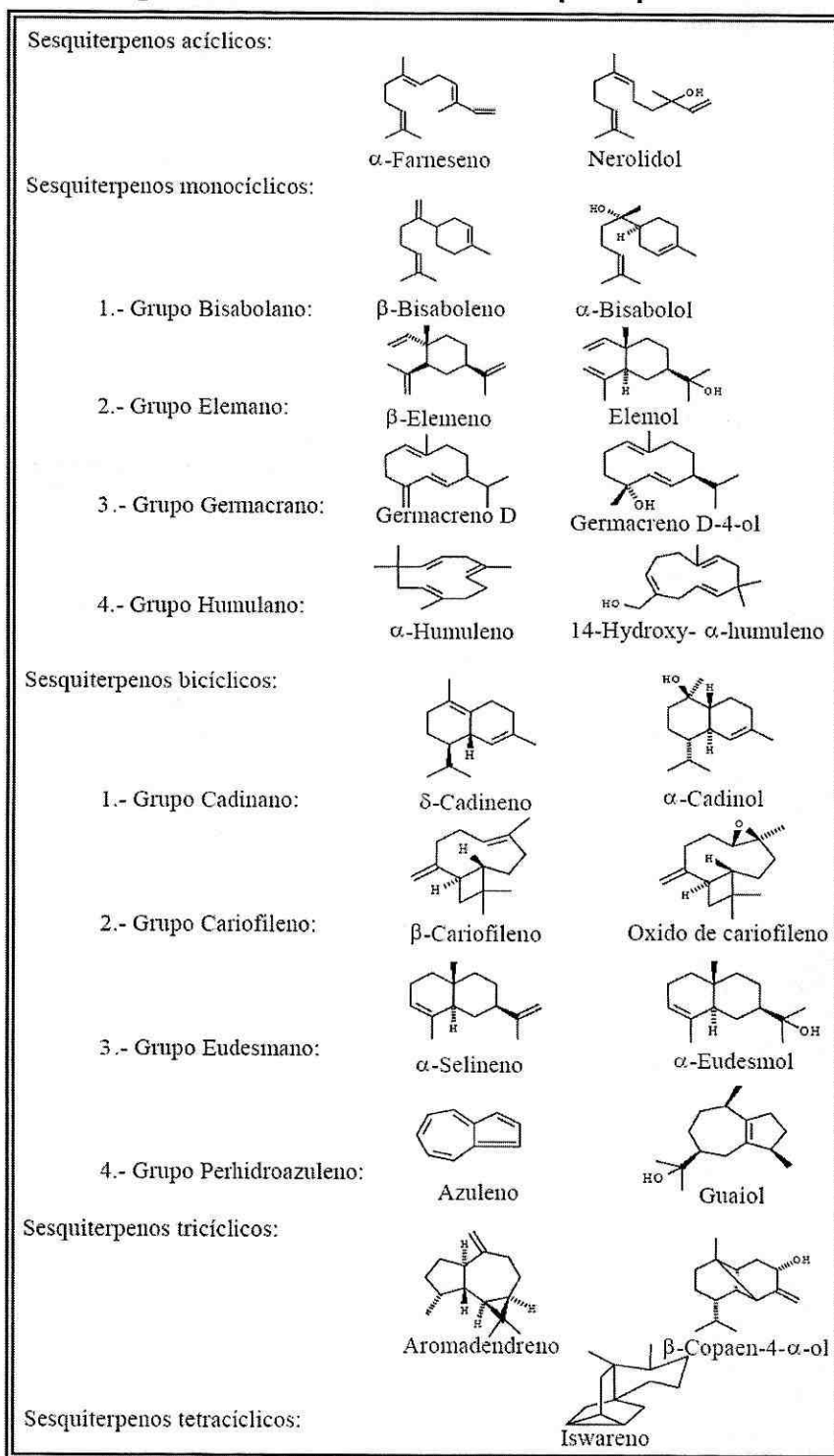
Aunque la mayoría de los sesquiterpenos presentan una unión regular "cabeza-cola", existen algunos que son el resultado de transposiciones en esta estructura. Su distribución es amplia en la naturaleza, se encuentran en los

aceites esenciales, al igual que los monoterpenos, pero con mayor frecuencia que estos en hongos, plantas no vasculares e incluso en algunas bacterias como *Streptomyces*. Este grupo presenta gran variabilidad natural pudiéndose encontrar hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres, glucósidos y alcaloides sesquiterpénicos (Bohlmann *et al.*, 1997; Rosa-Putra *et al.*, 2001).

Aunque se les han atribuido diversas funciones como hormonas vegetales (ácido abscísico o fitoalexinas) y como antibióticos de origen fúngico, al igual que los monoterpenos pueden actuar como alelopáticos. No son metabólicamente inertes, se sintetizan y catabolizan rápidamente, además de tener un papel dinámico en el metabolismo vegetal. La producción y acumulación de este tipo de compuestos, en cantidades considerables, suelen estar relacionados con la presencia de estructuras secretoras especializadas, como las glándulas de aceite (Steele *et al.*, 1998).

Los sesquiterpenos, al contar con una unidad de isopreno más que los monoterpenos, presentan una mayor plasticidad en su construcción que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional (Figura 6). Además, la presencia de isómeros geométricos de posición u ópticos es mucho mayor. Debido a esta plasticidad y según el número de anillos de la molécula, se pueden agrupar en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos (McGarvey y Croteau, 1995).

Figura 6. Clasificación de sesquiterpenos



Fuente: Muhlbauer *et al.*, 2003

Los diterpenos son otra gran familia de terpenoides que, según las circunstancias, pueden aparecer en los aceites esenciales junto con los monoterpenos (C-10) y sesquiterpenos (C-15). Se trata de compuestos con 20 átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno, C-20), por lo que su peso molecular es superior al de monoterpenos y sesquiterpenos, y su volatilidad menor. Sus características moleculares y estructurales dificultan la extracción de los mismos en corriente de vapor, método más usual para la extracción de aceites esenciales. Por este motivo no suelen considerarse componentes del aceite volátil, ya que no todos los diterpenos se extraen, y los extraídos no lo son al 100%. Sin embargo, los que suelen aparecer en las esencias son derivados del fitol y el esclareol (Sirisoma *et al.*, 2001).

La mayoría de los diterpenos han sido extraídos de plantas vasculares, y de algunos talofitas, principalmente algas y hongos. Pueden actuar, en algunos casos, como sustancias repelentes, también como feromonas atrayentes de insectos e incluso como compuestos citotóxicos frente a células tumorales (Schiestl *et al.*, 2000).

Propiedades terapéuticas de los aceites esenciales

Varios aceites esenciales producen efectos farmacológicos como anti-inflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos. Otros son agentes biocidas contra un amplio rango de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios, insectos y plantas.(Hammer *et al.*, 1999; Kalemba y Kunicka, 2003). Estas propiedades se han reconocido empíricamente durante siglos y

sólo recientemente empiezan a ser confirmadas (Bergonzelli *et al.*, 2003; Faleiro *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004).

Antioxidante

En los últimos años, los antioxidantes naturales han generado un interés considerable en medicina preventiva y en la industria de los alimentos. Los aceites esenciales son considerados con potencial para el reemplazo de los antioxidantes sintéticos convencionales (Valentao *et al.*, 2002; Alma *et al.*, 2003).

Diferentes especies de oxígeno reactivo (radicales libres) se forman en la célula durante la respiración aeróbica y pueden causar daño celular relacionado con el cáncer y con enfermedades cardiovasculares. Los antioxidantes participan en la protección de las células contra daños oxidativos tanto por inhibición de la oxidación como por su afinidad a los radicales libres. El aceite esencial de *Satureja hortensis* L. inhibe la oxidación del ácido linoleico en un 95%, impidiendo la formación de productos que pueden causar cáncer (Gulluce *et al.*, 2003).

En el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. el efecto antioxidante se relaciona con la presencia de timol y carvacrol los cuales capturan radicales libres (Milos *et al.*, 2000). En *Thymus pectinatus* los componentes principales del aceite esencial son también el carvacrol y el timol, por separado su actividad antioxidante fue más débil que la del aceite esencial, lo que sugiere la participación de otros componentes del aceite esencial en la actividad antioxidante (Vardar-Unlu *et al.*, 2003).

Antiinflamatoria

En un estudio de la actividad antiinflamatoria del extracto etílico de *Lippia dulcis* se encontró que la administración oral de 400 mg/kg en 1.5 h inhibió en un 43% el edema provocado por la inyección de carragenanos en la región subplantar y redujo el peso del granuloma inducido mediante la inserción subcutánea de algodón; además, la aplicación tópica de 0.5 mg a la oreja inhibió el edema inducido con TPA (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) en un 49.13% (Perez *et al.*, 2005).

Un estudio similar realizado con los aceites esenciales de tres especies del género *Eucalyptus*, demostró su efecto analgésico en las contusiones inducidas por ácido acético y en la estimulación térmica. Además, estos aceites esenciales inhibieron el edema inducido por carragenanos y dextran en la región subplantar en ratas, redujeron la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal de las ratas, inducida por la inyección de carragenanos y la permeabilidad vascular provocada por carragenanos e histamina. Sin embargo, para algunos de los parámetros estudiados se observaron efectos inconsistentes tanto en términos de su actividad como de la relación dosis-respuesta (Silva *et al.*, 2003).

El extracto de *Cordia verbenacea* mostró actividad antiinflamatoria en modelos animales de inflamación subcrónica. La administración tópica del extracto a dosis de 4.56 mg/kg inhibió el edema inducido en forma similar a la observada con 6.0 mg/kg de naproxeno. La administración oral del extracto en

dosis de 1.24 mg/kg tuvo un efecto muy similar al de 2.5mg/kg de nimezulide (Sertie *et al.*, 2005).

Insecticida

Los aceites esenciales tienen propiedades insecticidas, aunque su mayor acción es contra larvas y huevos de insectos; además, han sido usados como repelentes. Los aceites esenciales de *L. sidoides* mostraron poseer timol que tiene acción larvicida contra las especies del mosquito *Aedes aegypti*, causando una mortalidad casi instantánea a concentraciones de 0.017% (p/v). Estos resultados sugieren que el aceite esencial de *L. sidoides* podría ser útil como larvicida biodegradable en el combate de este mosquito en ciudades (Carvalho *et al.*, 2003).

Fungicida

Los hongos son más susceptibles que las bacterias a algunos aceites esenciales, como los de la hierba del carpintero, el de la pimienta, el de canela, el de zanahoria, aunque también muestran mayor resistencia contra los aceites de junípero, de hierba lombriguera y a la mayoría de otros 45 aceites probados. El aceite de orégano tiene cierta efectividad contra *Aspergillus niger* (CMI=0.1%) y *Candida* spp. (5 ppm) (Kalemba *et al.*, 2003).

Algunos estudios han mostrado que los aceites esenciales y compuestos fenólicos específicos pueden controlar la tasa del crecimiento y el tiempo de germinación de las esporas de hongos responsables de la descomposición de alimentos. Entre estos se encuentran el aceite esencial de orégano y el de tomillo que inhibieron el crecimiento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*

y *Aspergillus flavus* (Lopez-Malo *et al.*, 2005). Se reconoce que el carvacrol, y los aceites esenciales que lo contienen, tiene propiedades fungicidas, por lo que se han usado contra hongos fitopatógenos (Schwämmle *et al.*, 2001). Varios aceites esenciales incluyendo los de *Tymus vulgaris* y de *Ocimum basilicum* (albahaca), inhiben totalmente el desarrollo de hongos sobre granos de maíz; así mismo el aceite esencial de mostaza se ha usado para inhibir el crecimiento del hongo del pan (Bagamboula *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales de *Thymus revolutus*, *Thymus glandulosus* y *Origanum compactum* mostraron fuerte actividad antifúngica; sin embargo, los aceites esenciales de *Calamintha officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavendula dentata* y *Salvia aegyptica*, con menores contenidos de carvacrol y timol, tuvieron un insignificante efecto inhibitorio ante el hongo probado, lo que apoya la idea de que el efecto inhibitorio del crecimiento de hongos de los aceites esenciales se debe principalmente a su contenido de estos componentes (Karaman *et al.*, 2001; Bouchra *et al.*, 2003). Salgueiro *et al.* (2003) incluyen al precursor del carvacrol, *p*-cimeno entre los responsables de la actividad antifúngica de los aceites esenciales.

Se ha sugerido que los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales, o de sus componentes tales como timol, carvacrol y vainillina, podrían ser el resultado de la perturbación en varios sistemas enzimáticos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de los componentes estructurales. Una vez que los compuestos fenólicos cruzan la membrana celular, sus interacciones con las enzimas y proteínas de la membrana podrían

causar un flujo opuesto de protones, afectando la actividad celular (Lopez-Malo *et al.*, 2005).

No todos los aceites esenciales tienen actividad antimicótica como lo demostró el ensayo del aceite de *Haplophyllum tuberculatum* compuesto principalmente por β -felandreno (23.3%), limoneno (12.6%), (Z)- β -ocimeno (12.3%), β -cariofleno (11.6%), mirceno (11.3%) y β -felandreno (10.9%), que demostró débil actividad fungicida contra *Alternaria alternata*, *Stemphylium solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporium* y *Bipolaris sp* (Al-Burtamani *et al.*, 2005).

Antiviral

Un gran parte de los estudios sobre la actividad antiviral de los aceites esenciales se ha realizado usando virus del Herpes Simple tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2) causantes de infecciones comunes en humanos (Schnitzler *et al.*, 2001).

El aceite esencial de *Santalina insulares*, inactiva a los virus HSV-1 y 2 directamente, previniendo la absorción del virus por la célula huésped e inhiben la replicación del virus en la célula *in vitro* (De Logu *et al.*, 2000). El aceite esencial de 12 plantas mostró capacidad para suprimir la replicación del virus de Herpes simple tipo 1, especialmente el de zacate limón (*Cymbopogon citratos*) el cual inhibió completamente la replicación a una concentración de 0.1% (Minami *et al.*, 2003).

Antibacteriana

Empíricamente se ha reconocido durante siglos la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales aislados de muchas plantas. La fuente botánica, la procedencia de la planta, el tiempo de cosecha o fase de desarrollo, la técnica de extracción, la parte de la planta, material fresco o seco, los microorganismos en que se prueban y la metodología antimicrobiana usada son factores que influyen sobre los resultados de la medición de la actividad antimicrobiana (Faleiro *et al.*, 2003).

Por siglos diversas plantas y especias se han usado para aumentar la vida útil de los alimentos. Existen evidencias sólidas que indican que los aceites esenciales pueden actuar contra un amplio rango de bacterias (Cuadro 2) (Bergonzelli *et al.*, 2003).

Cuadro 2. Componentes de los aceites esenciales con actividad antibacteriana.

Especie	Componentes	Bacterias	Fuente
<i>Anthemis xylopoda</i>	Borneol (31.80%), Carvacrol (12.67%), 1,8-cineole (5.45%) 2, 5,5-trimethyl-3,6-heptadien-2-ol (5.10%)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	(Uzel <i>et al.</i> , 2004)
<i>Carum carvi L.</i>	Carvone (23.3%), Limoneno (18.2%) Germacreno D (16.2%) <i>Trans-dihydrocarvone</i> (14.0%).	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	(Iacobellis <i>et al.</i> , 2005)
<i>Centaurea armena</i>	β -eudesmol (19.3%), Calareno (10.3%), 6, 10,14-trimetil-2-pentadecanono (5.7%), β -cariofileno (5.4%).	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	(Yayli <i>et al.</i> , 2005)
<i>Centaurea sessilis</i>	β -Eudesmol (12.4%), Oxido de cariofileno (10.0%), Fitol (6.4%), Spatuleno (4.9%), 6, 10,14-trimetil-2-pentadecanono (3.1%)	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	(Yayli <i>et al.</i> , 2005)
<i>Chrysanthemum indicum</i>	1,8-cineole, camfor, borneol Bornyl acetate,	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Escherichia coli</i>	(Shunying <i>et al.</i> , 2005)
<i>Cuminum cyminum L.</i>	<i>p</i> -menta-1,4-dien-7-al (27.4%), Cumio aldehyde (16.1%), γ -terpineno (12.8%), β -pineno (11.4%)	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus megaterium</i>	(Iacobellis <i>et al.</i> , 2005)
<i>Haplophyllum tuberculatum</i>	β -felandreno (23.3%), limoneno (12.6%), (Z)- β -ocimeno (12.3%), β -cariofileno (11.6%), Mirceno (11.3%), α -fellandreno (10.9%).	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	(Al-Burtamani <i>et al.</i> , 2005)
<i>Lantana achyranthifolia Desf.</i>	Carvacrol (30.64%), 1,8-cineole (5.03%), Isocaryophyllene (10.73%), α -bisabolol (11.23%) β -bisaboleno (5.68%).	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella boydii</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	(Hernandez <i>et al.</i> , 2005)
<i>Lippia graveolens</i>	Carvacrol (44%), <i>P-cimeno</i> (21.8%), Timol (7.4%),	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	(Salgueiro <i>et al.</i> , 2003)
<i>Mentha piperita L.</i>	α -terpineno (19.7%), Isomentone (10.3%), <i>Trans-carveol</i> (14.5%) Oxido de pipertinono (19.3%)	<i>Escherichia coli</i>	(Yadegarinia <i>et c</i>
<i>Ziziphora persica Bunge</i>	(+)-pulegone (79.33%), Limoneno (6.78%), Piperitenono (4.2%)	<i>Bacillus dipsauri</i> , <i>Corynebacterium cystitidis</i> <i>Corynebacterium flavescens</i> .	(Ozturk y Ercisli, 2006)
<i>Micromeria cilicica</i>	<i>Cis-p-mentono</i> (21.71, 25.31%), <i>Trans-p-mentono</i> (9.59, 5.59%), Nerol (0.35, 2.49%), 3-octonol (0.81,0.25%)	<i>Salmonella typhimurium</i> and <i>S. aureus</i> .	(Duru <i>et al.</i> , 2004)
<i>Myrtus communis L.</i>	β -cariofileno (7.6%) α -Pineno (29.1%), Limoneno (21.5%), 1,8-cineole (17.9%), Linalo (10.4%)	<i>Escherichia coli</i>	(Yadegarinia <i>et al.</i> , 2006)

Cuadro 3. Componentes de los aceites esenciales con actividad antibacteriana (continuación)

Especie	Componentes	Bacterias	Fuente
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Linalo (54.95%) meticavicol (11.98%) metilcinnamat (7.24%) linolen (0.14%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	(Opalchenova y Obreshkova, 2003)
<i>Pulicaria odora</i> L.	Timol (47.83%) Isobutirate (30.05%)	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas vulgaris</i> .	(Hanbali <i>et al.</i> , 2005)
<i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabr	β -Pinenos 8.91% 1-Decanol 8.56 %	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i>	(Erazo <i>et al.</i> , 2006)
<i>Scutellaria barbata</i> D.Don (Lamiaceae)	Mentol (7.7%), Linalo (6.7%), α -terpieol (1.5%), Timol (1.4%) (Z)- α -trans-bergamotol (5.1%) globulol (4.2%)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2004; Yu <i>et al.</i> , 2004)
<i>Sesuvium portulacastrum</i>	α -cimeno (32.60%), 2- β -pineno (13.55%) α -pineno (14.12%)	<i>Acetobacter calcoacetica</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> .	(Magwa <i>et al.</i> , 2006)
<i>Sideritis italica</i> (Miller)	<i>p</i> -metoxiacetofenono 26.4 % Acido palmitico 21.8 %	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Basile <i>et al.</i> , 2006; Monteiro <i>et al.</i> , 2006)
<i>Teucrium marum</i> (Lamiaceae)	Isocariofileno (20.24%), β -bisabolene (14.73%), α -sesquifellandrene (11.27%), β -santalene (10.97%), Dolichodial (9.38%) α -caryophyllene (7.18%)	<i>Rhizoctonia solani</i>	(Ricci <i>et al.</i> , 2005)
<i>Thymus revolutus</i> Celak	Carvacrol (43.13%) γ -terpineno (20.86%), <i>p</i> -cimeno (13.94%), β -cariofileno (5.40%), Timol (4.62%)	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i>	(Karaman <i>et al.</i> , 2001)

Métodos para la valoración de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Existen dos métodos básicos usados para la valoración de la actividad antibacteriana y antimicótica de los aceites esenciales:

1. Método de difusión.
2. Método de dilución.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es difícil debido a su volatilidad, insolubilidad al agua y complejidad. Las propiedades específicas de los aceites esenciales requieren algunas modificaciones a los métodos que se han desarrollado para los agentes antimicrobianos solubles en agua. Los aceites esenciales son de naturaleza hidrófoba y de alta viscosidad. Estas propiedades pueden reducir la capacidad de la dilución o causan la distribución desigual del aceite a través del medio aun cuando sea usado un agente dispersor apropiado o un agente solubilizador. Se tiene que verificar que las concentraciones aplicadas de los solventes a los emulsificantes no afecten el crecimiento y diferenciación de los microorganismos probados. Los largos periodos de incubación pueden provocar la evaporación o descomposición de algunos de los componentes durante el periodo de la comprobación debido a su carácter volátil, estas condiciones del experimento deben tomarse en cuenta para evitar estos fenómenos (Kalemba *et al.*, 2003).

Es común que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se pruebe ante microorganismos tipo de colecciones de cultivos

internacionalmente reconocidas (Hammer *et al.*, 1998; Ohno *et al.*, 2003; Vardar-Unlu *et al.*, 2003; Maksimovic *et al.*, 2005), pero también pueden ser aislados a partir de diferentes ambientes naturales, ej. pacientes clínicos (Navarro *et al.*, 1996; Kunle *et al.*, 2003), plantas (Dorman *et al.*, 2000; Iacobellis *et al.*, 2005), alimentos (Lemay *et al.*, 2002; Valero y Salmeron, 2003) o animales (Dorman *et al.*, 2000; Janahmadi *et al.*, 2006; Pultrini Ade *et al.*, 2006). Los microorganismos tienen que alcanzar una fase de crecimiento apropiada, y un número especificado de células antes de ser usados para las pruebas. Todos los parámetros que pueden afectar los resultados experimentales tienen que ser definidos estrictamente (Kalemba *et al.*, 2003).

Los experimentos se hacen siempre con dos a siete repeticiones (Marino *et al.*, 2001; Shin y Lim, 2004). Los cultivos conteniendo aceites esenciales son acompañados por cultivos de control negativo, donde los aceites son reemplazados por agua o el solvente utilizado. También se establecen comúnmente cultivos de control positivos a los que se adicionan antibióticos estándar para evaluar la susceptibilidad de las cepas probadas y compararla con la correspondiente a los aceites esenciales.

El crecimiento de los microorganismos puede evaluarse visual o instrumentalmente. La turbidimetría es una técnica comúnmente usada, donde se miden los cambios en la densidad óptica del cultivo por medio de un espectrofotómetro, cuyo funcionamiento consiste básicamente en iluminar la muestra con luz blanca y calcular la cantidad de luz que refleja dicha muestra

en una serie de intervalos de longitudes de onda (Periago y Moezelaar, 2001; Niu y Gilbert, 2004).

Método de difusión en agar

Este método es el más usado en la valoración de la actividad antimicrobiana. El método se reconoce como preciso y fiable, aunque produce resultados semi-cuantitativos, y según algunos autores, sólo cualitativo y no siempre fidedignos. No obstante, hace posible estimar el grado de inhibición de crecimiento de los microorganismos y sus cambios de morfología de una manera simple. Según este método, la caja Petri de 5-12 cm. de diámetro (normalmente 9 cm.) se llena con 10 a 20 ml. de agar se deja solidificar y posteriormente es inoculada con microorganismos. La incorporación de el aceite esencial se puede realizar de dos maneras distintas: en un disco de papel filtro o en un pozo en medio del agar (Kalemba *et al.*, 2003; Lahlou, 2004). El diámetro del disco de papel o del pozo, la cantidad de aceite esencial, así como la clase del solvente dispersor son los parámetros más importantes de las variaciones de este método. El aceite esencial raramente se utiliza como liquido puro, normalmente se usa en solución, preparando una serie de cajas de Petri con la misma cantidad de solución de aceite esencial pero a diferentes concentraciones. Las cajas se guardan durante algún tiempo para permitir que todos los componentes del aceite esencial puedan difundir y entonces se incuban.

La efectividad del aceite esencial es demostrada por el tamaño de la zona de inhibición de crecimiento del microorganismo alrededor del disco o

pozo, y normalmente se expresa como el diámetro en milímetros de esta zona, incluyendo el diámetro del disco o del pozo (Cimanga *et al.*, 2002; NCCLS, 2005; Mahmoud *et al.*, 2006).

El método de difusión de agar es considerado como impropio para aceites esenciales, cuando sus componentes pudieran ser volátiles, por que se evaporan con el solvente dispersándose durante la incubación. Sin embargo es todavía la técnica más común de valoración de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (sobre todo en su modalidad de disco) porque es fácil de realizar y requiere cantidades pequeñas de aceite esencial. Puede recomendarse como un método de pre-evaluación para un gran número de aceites esenciales, para seleccionar al más activo y luego hacer análisis por otros métodos más adecuados (Cowan, 1999; Kalemba *et al.*, 2003; Lahlou, 2004).

El Método de Dilución

El método de dilución en serie se usa para bacterias y hongos, pero su modificación con caldo de cultivo es utilizada principalmente en hongos. El ensayo de microdilución en caldo tiende a ser últimamente el más popular. Los cultivos en agar se hacen en cajas Petri o en tubos, mientras los cultivos en caldo se hacen en matraces cónicos de 100 ml (para hongos) o en tubos de ensaye con 2.5 a 5 ml de medio (para bacterias y mohos). Los efectos inhibitorios de los aceites esenciales en los cultivos en tubo de ensaye son medidos por turbidimetría o con el método de contero en placa. En todas estas modificaciones los resultados pueden presentarse de dos maneras:

- El índice de inhibición del crecimiento, definido como el porcentaje del crecimiento del cultivo respecto al testigo sin aceite esencial.

- La concentración mínima inhibitoria (CMI) que restringe el crecimiento de los microorganismos (ensayos bacteriostáticos o fungistáticos) o como concentración letal mínima (CLM) en ensayos bactericidas o fungicidas (Cowan, 1999; Kalemba *et al.*, 2003; Lahlou, 2004).

La actividad de los aceites esenciales contra mohos también puede ser investigada verificando la inhibición de la esporulación y de la producción de las toxinas (Ultee y Smid, 2001).

La concentración mínima inhibitoria se define como la concentración de aceite esencial más baja en el medio que produce la falta de cambios visibles en el crecimiento del microorganismo (Mann y Markham, 1998; Lambert y Pearson, 2000; Andrews, 2001; Lambert *et al.*, 2001). Para estimar la actividad letal de aceite esencial, los microorganismos se transfieren del líquido o agar en el que se inhibió el crecimiento a un nuevo medio de cultivo y se incuban. La concentración de aceite esencial más baja que produce inhibición de crecimiento total se reconoce como la concentración letal mínima, CMB para las bacterias (concentración mínima bactericida) y CMF para los hongos (concentración mínima fungicida).. Los investigadores que usan el método de la dilución están normalmente interesados en la estimación de CMI, sólo en algunos artículos también se calcula CLM (Kalemba *et al.*, 2003; Lahlou, 2004).

Métodos no-convencionales

Método de microatmósfera

El método de microatmósfera es una modificación del método de difusión en disco muy conveniente para la estimación de la actividad de aceites esenciales en fase de vapor. En este caso, un disco humedecido con aceite esencial se ata a la tapa de una caja de Petri que es entonces invertida para incubar. Los resultados se presentan como el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de los microorganismos, o como la cantidad de aceite esencial mínima inhibitoria del crecimiento del microorganismo (MIQ por sus siglas en ingles) (Kalemba *et al.*, 2003; Lahlou, 2004).

Turbidimetria

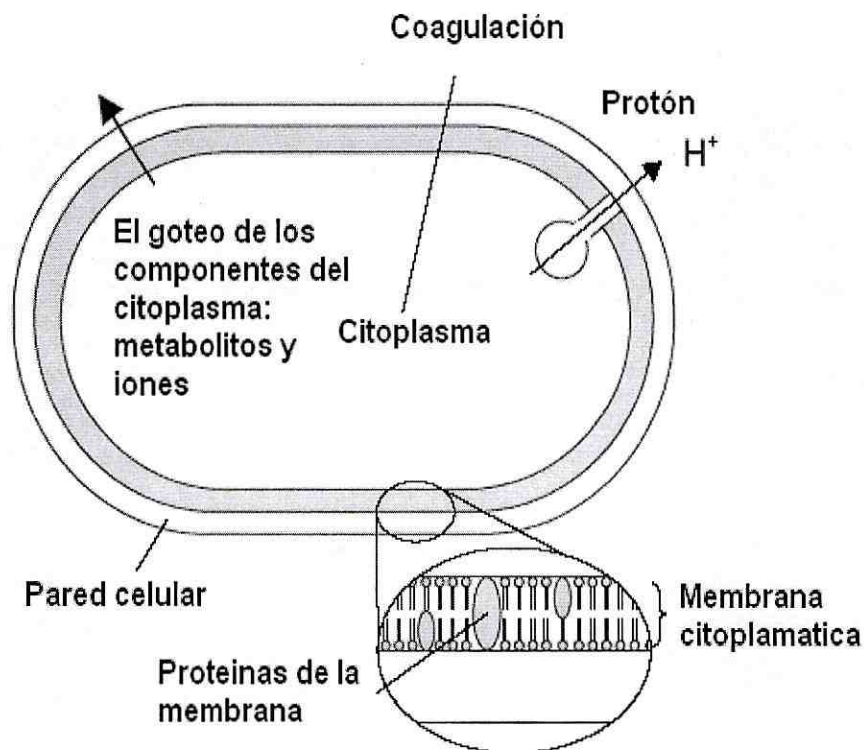
Durante muchos años, el método de turbidimetria se ha usado para probar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. El desarrollo de las computadoras y maquinaria robótica han dado la posibilidad de examinar muy pequeñas cantidades de medios leyendo su densidad óptica (OD). Se usan cultivos líquidos que contienen concentraciones de aceites esenciales. Después de la incubación, los platos se agitan vigorosamente en una plataforma vibrando e inmediatamente se examinan con un fotómetro. Los resultados se guardan en la memoria de la computadora y se analizan. La turbiedad de la emulsión aceite-agua puede interferir con la lectura, por lo que a veces se usan indicadores (Kalemba *et al.*, 2003).

Modo de acción antimicrobiana de los aceites esenciales

El mecanismo de acción de los aceites esenciales no se ha estudiado detalladamente (Lambert *et al.*, 2001). Debido al gran número de diferentes

compuestos químicos presente en los aceites esenciales, lo más probable es que su acción antibacteriana no se deba a un mecanismo específico, sino a la suma de varios de ellos sobre la célula bacteriana (Figura 7) (Burt, 2004)

Figura 7. Mecanismos y sitios de acción antibacteriana de los aceites esenciales



Fuente: Burt, 2004

Una característica importante de los aceites esenciales y sus componentes es su hidrofobicidad que les permite dividir los lípidos de la membrana celular bacteriana y de la mitocondria, perturbando las estructuras y haciéndola más permeable, lo que provoca el escape de iones y otros componentes celulares (Gustafson *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002). La célula puede tolerar cierto nivel de fuga del contenido celular sin la pérdida de la viabilidad, pero si éste continúa se

presenta la muerte celular. Existe alguna evidencia de que la muerte celular puede ocurrir antes de la lisis (Gustafson *et al.*, 1998).

Generalmente, los aceites esenciales que poseen mayor efectividad antibacteriana contra los patógenos, son los que contienen un porcentaje alto de compuestos fenólicos como el carvacrol, eugenol y timol (Dorman *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001). Parece razonable que el mecanismo de acción sería por consiguiente similar al de otros fenoles: La perturbación de la membrana citoplasmática, del flujo de electrones, del transporte activo y la coagulación del contenido celular (Burt, 2004).

La estructura química de los componentes de los aceites esenciales afecta de un modo individual la acción y la actividad antibacteriana (Dorman *et al.*, 2000). Se ha confirmado la importancia de la presencia de las agrupaciones de hidroxilos en los compuestos fenólicos como el carvacrol y el timol (Dorman *et al.*, 2000; Ultee *et al.*, 2002). La posición relativa de los grupos hidroxilos en el anillo de los fenoles no parece influir fuertemente en el grado de la actividad antibacteriana; la acción de timol contra el *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* parece ser comparable a la del carvacrol (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002). Sin embargo, existen estudios de la actuación diferente de la actividad del carvacrol y timol contra especies Gram-positivo y Gram-negativo (Dorman *et al.*, 2000).

La importancia del anillo fenolico (desestabilización de los electrones) se demuestra por la falta de actividad del mentol comparado con el carvacrol (Ultee *et al.*, 2002). En un estudio se demostró que la molécula de acetato aumenta la actividad antibacteriana; el acetato de geranil era más activo contra

un rango amplio de especies Gram-positivas y negativas que el geraniol (Dorman *et al.*, 2000). Hasta los componentes no fenólicos de los aceites esenciales están involucrados, se ha encontrado que el grupo de alquil influye en la actividad antibacteriana; por ejemplo, el limoneno es más activo que el *p*-cimeno (Dorman *et al.*, 2000).

Los componentes de los aceites esenciales también parecen actuar en las proteínas incrustadas en la membrana citoplasmática de la célula. Las enzimas como la ATPasas se conocen por que se localizan en la membrana citoplasmática y por estar en las orillas de las moléculas de lípidos. Se han sugerido dos posibles mecanismos de cómo los hidrocarburos cíclicos podrían actuar en éstas. Las moléculas del hidrocarburo podrían aumentar y deformar la interacción de la bicapa lípido-proteína; alternativamente, posiblemente se presenta la interacción directa de los compuestos lipofílicos con las partes hidrófobas de la proteína (Burt, 2004). Se ha encontrado que algunos aceites esenciales estimulan el crecimiento del pseudomicelio (una serie de células que adhieren al final para terminar con el resultado de la separación incompleta de las células recién formadas) en ciertas levaduras. Esto podría ser un indicador de que los aceites esenciales actúan en las enzimas involucradas en la regulación de la energía o en la síntesis de los componentes estructurales. Se ha demostrado que el aceite de canela y sus componentes inhiben la aminoácido descarboxilasa en *Enterobacter aerogenes*. El mecanismo de acción fue a través de ligar las proteínas, señal de que los componentes de los aceites esenciales pueden actuar también con proteínas se obtuvieron de

estudios que usan la leche conteniendo proteína a diferente niveles (Pol *et al.*, 2001).

Carvacrol y timol

El modo de acción del carvacrol, uno de los componentes principales de los aceites esenciales de orégano y de tomillo, parece haber recibido la mayor atención de los investigadores. El timol es estructuralmente muy similar al carvacrol debido a que tiene el grupo hidroxilo en una situación diferente en el anillo fenolico. Ambas sustancias aumentan la permeabilidad de la membrana celular (Lambert *et al.*, 2001; Schwämmle *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2003).

El carvacrol y el timol pueden desintegrar la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, liberando los lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Los estudios con *B. cereus* han mostrado que el carvacrol interactúa con la membrana de la célula, donde disuelve la doble capa de fosfolípidos. Esta distorsión física de la estructura podría causar la expansión y desestabilización de la membrana, aumenta su permeabilidad pasiva (Ultee *et al.*, 2002).

La medida de la temperatura media de la fase de transición de los lípidos bacterianos confirmó que las membranas se volvieron instantáneamente más fluidas en presencia de carvacrol. En estudios en *B. cereus* se concluyó que el carvacrol forma canales a través de la membrana al separar las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, permitiendo que los iones dejen el citoplasma. El carvacrol de los aceites esenciales de orégano, causa de la fuga de iones de fosfato en *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001).

Aparte de la inhibición del crecimiento vegetativo de células bacterianas, la inhibición de la producción de las toxinas es también de interés en la microbiología de alimentos. El carvacrol puede inhibir la producción de toxinas que causan diarrea, producidas por *B. cereus*. Se ofrecen dos teorías para el modo de acción de la limitación de la producción de la toxina: Si la excreción de la toxina es un proceso activo, puede haber ATP insuficiente para exportarlo de la célula. Alternativamente, la proporción de crecimiento específica es más baja y puede significar que las células usan toda la energía disponible para sostener la viabilidad y dejan la producción de la toxina (Ultee *et al.*, 2001).

Eugenol

El eugenol es el componente principal del aceite del clavo de olor (aproximadamente 85%). Concentraciones sub-letales de este inhiben la producción de amilasa y proteasa en *B. cereus*. El mecanismo actúa a nivel de pared celular y también se presenta un grado alto de lisis en la célula. Los grupos hidroxilos en el eugenol se cree que se ligan a las proteínas, impidiendo la acción enzimática en *E. aerogenes* (Burt, 2004).

El ρ -cimeno

Es el precursor biológico de carvacrol, el ρ -cimeno es hidrófobo y causa tumefacción de la membrana citoplasmática en magnitud mayor que el carvacrol (Ultee *et al.*, 2002). Sin embargo, el ρ -cimeno no es un antimicrobiano eficaz cuando se usa solo (Dorman *et al.*, 2000), pero cuando se combina con carvacrol, se ha observado una acción sinérgica contra *B. cereus*. La mayor eficiencia del ρ -cimeno para ser incorporado a la doble capa de lípidos de *B.*

cereus facilita el transporte de carvacrol a través de la membrana citoplasmática (Ultee *et al.*, 2002).

Descripción de la familia Verbenaceae

Familia de plantas de tubifloras del suborden de las verbeníneas, de cáliz gamosépala y corola de largo tubo, a menudo encorvado, y limbo bilabiado; androceo por lo común, de 4 estambres didinamos, y gineceo con el ovario cuadrilocular, por el desarrollo de desepimentos secundarios, y estilo terminal. El fruto por lo regular, es drupáceo, con 2-4 lóculos o se descompone en mericarpos uniloculares (Correll y Johnston, 1979). Plantas herbáceas o leñosas, con las flores en inflorescencias cimosas o racemosas. Se conocen unas 760 especies en su mayoría de países cálidos y templados del hemisferio austral. Géneros importantes *Lantana*, *Lippia* (100 especies), *Verbenas* (80 especies), *Teutona*, *Vitex*, *Clerodendron*, *Avicenia*, etc. (Font Quer, 1979).

Encuadre taxonómico del genero Lippia

Reino: Plantae

División: Angiospermas

Subdivisión: Magnoliopsida

Clase: Dicotiledoneas

Subclase: Asteridae

Orden: Labiales

Familia: *Verbenaceae*

Genero: *Lippia*

Descripción del Género *Lippia*

El género *Lippia* (*Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies están principalmente distribuidas a lo largo de los países de América del sur y Centroamérica y en los territorios de África Tropical. La mayoría de ellas se utilizan tradicionalmente como remedio contra enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Algunas especies de *Lippia* han mostrado actividad antimalaria, antiviral y citostática. Además, las hojas de la mayoría de estas especies se utilizan como sazonador para las preparaciones de alimentos (Pascual *et al.*, 2001; Stashenko *et al.*, 2004).

En género parece presentar un perfil consistente de composición química (Cuadro 3), actividades farmacológicas y usos de la gente. En la mayoría de los casos, las partes usadas son las partes aéreas y las flores. Normalmente son preparados como una infusión o decocción, y administradas por vía oral (Pascual *et al.*, 2001).

Cuadro 4. Componentes de las especies del género *Lippia*

Especie	Monoterpenos	Sesquiterpenos
<i>L. affinis aristata</i> Schau.	Sabineno	β -cariofileno
	Limoneno	β -cadineno
	γ -terpineno	γ -elemeno
	α -pineno	
	A-thujeno	
<i>L. affinis sidoides</i> Cham.	Timol,	β -cariofileno
	α -felandreno	
	ρ -cimeno	
	Mirceno	
	Carvacrol	
	γ -terpineno	
	terpineol α -	δ -cadineno
	β -pineno	β -cariofileno
	γ -terpineno	germacreno-D
	1,8-cineole	Nerolidol
<i>L. adoënsis</i> Hochst.	ρ -cimeno	
	Limoneno	
	Linalol	
	Piperitono	
	Timol	
	Borneol	α -muuroleno
	Camfor	β -cariofileno
	1,8-cineole	β -cubebeno
	Citronelol	β -elemeno
	Gerianal	γ -cadineno
	Linalol	allo-aromadendreno
	Mirceno	oxido de cariofileno
	Peral	
	Piperitono	
	Sabineno	
<i>L. alba</i> (Mill.) N.E. Brown	2-undecanono	
	Carvacrol	β -cariofileno
	ρ -cimeno	allo-aromadendreno
	metil timol	α -humuleno
	Timol	
<i>L. alnifolia</i> Schau.	γ -terpineno	
<i>L. americana</i> L.		Cardidenol
<i>L. aristata</i> Schau.	Sabineno	β -cariofileno
	Limoneno	γ -elemeno
	δ -3-careno	γ -cadineno
	Linalol	α -humuleno
	Carvono	α -copaeno
<i>L. carviadora</i> Meikle.	acetato de carvil	
	ρ -cimeno	
	Limoneno	
	Linalol	
<i>L. carviadora</i> Meikle var <i>Minor</i>	Limoneno	β -cubebeno
		β -elemeno
		γ -muuroleno
		α -humuleno

Cuadro 5. Componentes de las especies del género *Lippia* (Continuación)

Especie	Monoterpenos	Sesquiterpenos
<i>L. chamaedrifolia</i> Steud.	1,8-cineole Linalol Sabineno Limoneno	Globulolo Spatulenol γ -elemeno β -cariofileno β -cubebeno
<i>L. citriodora</i> Kunth.	citral-A citral-B 1,8-cineole Geraniol Limoneno Linalol	óxido de cariofileno
<i>L. dauensis</i> (Chiov.) Chiov.	β -ocimeno Ipsenono Mirceno Z-tagetono	
<i>L. dulcis</i> Trevir.	Camfor Camfeno Limoneno Terpinoleno α -pieneno Lippiol Óxido de piperitono	α -copaeno β -cariofileno δ -cardineno 4- β -hernandulcin Hernandulcin Epihernandulcin
<i>L. fissicalyx</i> Tronc.	Limoneno Pulegono Carvono	
<i>L. gracilis</i> H.B.K.	Timol Carvacrol ρ -cimeno 4- acetato de terpenil	β -cubebeno α -copaeno
<i>L. grandifolia</i> Hochst. ex. A. Rich.	Linalol ρ -cimeno Timol	β -cubebeno
<i>L. grandis</i> Mart. & Schau.	ρ -cimeno Carvacrol Timol	
<i>L. grata</i> Schau.	ρ -cimeno Carvacrol Timol γ -terpineno β -felandreno	β -cariofileno α -copaeno α -muuroleno
<i>L. graveolens</i> H.B.K.	Carvacrol 1,8-cineole ρ -cimeno Timol α -terpineol Dihidrocarvono	α -humuleno β -cariofileno β -bisaboleno Aromadendreno
<i>L. grisebachiana</i> Moldenke.	Linalol Mirceno Piperitono Pulegono acetato de linalil	

Cuadro 6. Componentes de las especies del género *Lippia* (Continuación)

Especie	Monoterpenos	Sesquiterpenos
<i>L. hastulata</i> (Griseb.) Hieron.	α -tujono β -tujono Alcohol de tujil	Lippifoli-1(6)-ene-5-one
<i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Hieron.	Camfor Limoneno Camfeno metil isoeugenol	Δ -africaneno biciclo germacreno germacreno-D α -humuleno Asteriscazo Derivatives β -cariofileno
<i>L. javanica</i> (N.L. Burm.) Spreng.	Mirceno Mircenono Ocimeno Z-tagetono E-tagetono cis-tagetono cis-dihidrocarvono	β -cariofileno
<i>L. junelliana</i> (Moldenke) Tronc	Mircenono Camfor Limoneno Mirceno	Spatuleno biciclogermacreno
<i>L. ligustrina</i> (Lag.) Britton.	1,8-cineole α -pieneno Vanillin	β -cariofileno α -humuleno
<i>L. lycoides</i> (Cham.) Steud.	ρ -cimeno Camfor Carvono 1,8-cineole Citral α -pieneno Geraniol Mentono	β -cariofileno α -humuleno
<i>L. micromera</i> Schau.	Gerianal Peral	β -cariofileno α -humuleno
<i>L. micromera</i> var. <i>helleri</i> (Britton)	Carvacrol 1,8-cineole α -terpineol	β -cariofileno α -humuleno
<i>L. microphylla</i> Cham.	metil timol Sabineno γ -terpineno Timol	Norolidol
<i>L. multiflora</i> Moldenke	1,8-cineole	β -farneseno germacreno-D β -cariofileno

Cuadro 7. Componentes de las especies del género *Lippia* (Continuación)

Especie	Monoterpenos	Sesquiterpenos
<i>L. nodiflora</i> (L.) Greene	Linalol ρ -cimeno 2, 6-dimethiloctano metil sabineno	Calameneno β -cariofileno α -copaeno α -bergamoteno δ -cardineno β -bisaboleno
<i>L. organoides</i> H.B.K.	α -terpineno γ -terpineno 1,8-cineole ρ -cimeno Timol acetato de timil	
<i>L. polystachia</i> Griseb.	α -tujono Carvono Limoneno Sabineno	β -cariofileno Lippifoli-1(6)-ene-5-one
<i>L. sellowii</i> Briq.		1,6-germacradien-5-ol
<i>L. seriphioides</i> A. Gray	Carvacrol Citral ρ -cimeno Gerianal Piperitono Timol	
<i>L. sidoides</i> Cham.	Carvacrol ρ -cimeno Timol 1,8-cineole	β -cariofileno α -copaeno α -muuroleno β -cubebeno
<i>L. somalensis</i> Vatke.	δ -3-careno Mirceno Limoneno	
<i>L. stoechadifolia</i> H.B.K.	oxido de pulegono	
<i>L. thymoides</i> Mart. & Schau.	metil timol α -terpineno α -terpineol	
<i>L. trifida</i> Gay	Citronelol Citronelal Timol	
<i>L. turbinata</i> Griseb.	Carvono Limoneno Camfor acetato de bornil α -terpineol δ -3-careno	Spatulenol β -cariofileno germacreno-D biciclogermacreno β -cubebeno
<i>L. ukambensis</i> Vatke	Camfeno Camfor 1,8-cineole ρ -cimeno γ -terpineno	β -cariofileno
<i>L. wilmsii</i> H.H.W. Pearson	1,8-cineole ρ -cimeno Linalol Piperitono	β -elemeno

Usos tradicionales de Lippia spp.

El uso más común de las especies de *Lippia* es para el tratamiento de desórdenes respiratorios. Para este uso la planta se prepara normalmente como decocción. En Centroamérica y América del Sur (Guatemala, Venezuela, Brasil) también es empleado como un remedio contra resfriados, gripe, bronquitis, tos y asma, como sazonador de alimentos, y para teñir papel de cigarrillos, además como estimulante del apetito. Se usa también como remedio contra trastornos gastrointestinales (diarreas, disenterías e indigestión). Así como para solucionar problemas hepáticos, dolores de vesícula y actividad colérica. En Guatemala y Brasil, se aplican varias especies de *Lippia* externamente para tratar enfermedades cutáneas, quemaduras, heridas, úlceras y también en casos de fiebre. Se planta alrededor de las casas para alejar a los insectos. La especie africana, se usa para el tratamiento de hipertensión arterial y como diurético. En Brasil se usa como sedativo y en Senegal como estimulante. Varias especies mexicanas desplegaron una acción abortiva y de antifertilidad. Además, se toma para la diabetes (Pascual *et al.*, 2001; Burt, 2004).

Lippia javanica (Burm. f.) Spreng. se usa extensivamente en la medicina tradicional como sanadora tradicional y para tratar dolencias menores. Muchos de sus usos se relacionan con infecciones microbianas por ejemplo la tos o el resfriado, la fiebre y bronquitis, además de infecciones superficiales de la piel y heridas. Las hojas, los tallos y en algunos casos la raíz preparadas en infusión se usan como inhalante. Se usa tópicamente para la sarna y los piojos. La planta también se ha usado para la influenza. Las infusiones de las hojas como

antihelmínticos, como profiláctico contra la disentería, la diarrea y malaria. Las raíces se usan como antídoto para alimentos sospechosos de estar descompuestos y contra la inflamación de los ojos (*Viljoen et al., 2005*).

L. dulcis es usada normalmente en la medicina tradicional o en el tratamiento de condiciones inflamatorias, la infusión o la decocción se preparan con las partes aéreas y se administra oralmente. También se usa para tratar la tos, la diarrea, y el dolor de estómago (*Perez et al., 2005*).

L. chevalieri y *L. multiflora* son especies endémicas de África Oriental. Ambas especies crecen ampliamente, poseen flores blancas pequeñas, alcanzan alturas de 1 m y 2.5 m, respectivamente. La medicina tradicional africana usa sus hojas como infusión en el tratamiento de malaria, hipertensión, diarrea y como desinfectante bucal. Se ha informado de las propiedades biológicas de *L. multiflora*, como el efecto sobre la hipertensión, sus propiedades como relajante muscular, con acciones vasculares, actividad antimicrobiana, anti-malaria, insecticida, antimicótica, y contra los piojos y los ácaros (*Bassole et al., 2003*).

Lippia graveolens H.B.K. (Verbenaceae) es una planta aromática nativa del sur de Norte América, México, Guatemala, Nicaragua y Honduras, esta especie es muy usada en la medicina folklórica de Centroamérica para el tratamiento de varias enfermedades, principalmente desórdenes gastrointestinales y respiratorios. Se conoce con los nombres de "orégano de monte" y "mejorana" (*Rastrelli et al., 1998; Salgueiro et al., 2003*). Se usa para la diarrea, trastornos respiratorios, dolor de estómago, cólicos y como abortivo (*Hernandez et al., 2003; Canales et al., 2005*).

***Lippia graveolens* H.B.K**

Sinonimia: *Lanata organoides* M. Martens et Galeotti, *Lippia berlandieri* Schauer, *Goniostachyum graveolens* (H.B.K.) Small.

Nombres comunes: Hierba dulce, salve real, orégano cimarrón, oreganillo, romerillo de monte.

Descripción: Arbustos delgados de alrededor de 3 m de alto; ramas. Hojas con la lámina oblonga a elíptica u ovado oblonga, por lo general 2-4 cm de largo, el haz densa y suavemente piloso, el envés glandular y densamente tomentoso a piloso, el margen finamente crenado, el ápice generalmente obtuso o redondeado, raramente agudo, la base redondeada a subcordada; pecíolos de 5-10 mm de largo. Inflorescencia con 2-6 pedúnculos, en las axilas de las hojas, de 4-12 mm de largo, las espigas primero subglobosas pero a menudo cambiando a oblongas, de 4-12 mm de largo; corola amarillo o blanco un centro amarillo, el tubo 3-6 mm de largo, pubescente externamente; brácteas comúnmente en 4 hileras, ovadas a lanceoladas, glandulares y densamente pilósulas, agudas; cáliz 1-2 mm de largo, glandular veloso; corola blanca, el tubo estriguloso, de alrededor de 3 mm de largo. Frutos pequeños, encerrados en el cáliz (Correll *et al.*, 1979).

Hábitat: En pastizal con matorral desértico, sobre roca caliza. Matorral espinoso con *Brahea*, *Cnidoscolus*, en suelo rojo arcilloso; lugar rocoso, con arbustos espinosos, roca caliza, con *Fouquieria*, *Agave lechuguilla*, *A. asperima*, *Viguiera stenoloba*, *Acacia crassifolia*, *Acacia berlandieri*, *Mimosa* spp; matorral subtropical con elementos de Matorral xerófilo, *Lycium minimum*, *Leucophyllum*, *Jatropha*; vegetación secundaria de matorral con *Prosopis*,

Acacia, *Opuntia* y *Bursera*; matorral alto inerme parvifolio con *Rhus chondroloma*, *Lindleyella mespiloides*, *Mortonia diffusa* y *Senna galeottiana*, suelo gris, escaso y pedregoso de origen calizo; matorral esclerófilo, suelo somero discontinuo negro; matorral de *Rhus* y *Pseudosmodium*, suelo calizo. Crece preferentemente entre los 1,700 y 2,000 msnm. Florecen de marzo a octubre (Martin y Hutchins, 1980).

Existen tres ramas para las investigaciones futuras referente a *Lippia graveolens* y los aceites esenciales. La primera es referente a la cantidad y calidad del aceite esencial, en relación a las condiciones ambientales y geográficas o si ésta es determinada por la expresión genética por medio de quimiotipos. Además estudio de los tricomas de la planta y si estos producen distintos tipos de aceites esenciales.

La segunda es referente a las investigaciones *in vitro* que sobre los aceites esenciales con componentes semejantes a *Lippia graveolens*, se han hecho y su efectividad contra un amplio rango de organismos desde bacterias hasta artrópodos, pasando por virus y moluscos (Ultee *et al.*, 2001; Salgueiro *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003; Vardar-Unlu *et al.*, 2003; Tepe *et al.*, 2004; Ponce-Macotela *et al.*, 2006; Veldhuizen *et al.*, 2006) , por eso sería importante conocer los resultados de esta especie contra ese grupo de organismos.

La tercera rama de investigación es *in vivo*. La actividad de los aceites esenciales debe ser probada en modelos animales, esto ayudará clarificar el rol de los aceites en las infecciones causadas por bacterias (Minami *et al.*, 2003).

A nuestro conocimiento no se ha publicado información de la actividad antibacteriana de *L. graveolens* del Barrial de Guadalupe, Mpio. Torreón, Coah. Mex. Es por eso que el objetivo de este estudio fue determinar su composición química y evaluar la actividad antibacteriana.

LITERATURA CITADA

- Aharoni, A., A. P. Giri, S. Deuerlein, F. Griepink, W. J. de Kogel, F. W. Verstappen, H. A. Verhoeven, M. A. Jongsma, W. Schwab y H. J. Bouwmeester (2003). "Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants." Plant Cell 15(12): 2866-84.
- Al-Burtamani, S. K., M. O. Fatope, R. G. Marwah, A. K. Onifade y S. H. Al-Saidi (2005). "Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman." J Ethnopharmacol 96(1-2): 107-12.
- Alma, M. H., A. Mavi, A. Yildirim, M. Digrak y T. Hirata (2003). "Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey." Biol Pharm Bull 26(12): 1725-9.
- Andrews, J. M. (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations." J Antimicrob Chemother 48 Suppl 1: 5-16.
- Bagamboula, C., M. Uyttendaele y J. Debevere (2004). "Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*." Food Microbiology 21: 33-42.
- Basile, A., F. Senatore, R. Gargano, S. Sorbo, M. Del Pezzo, A. Lavitola, A. Ritieni, M. Bruno, D. Spatuzzi, D. Rigano y M. L. Vuotto (2006). "Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils." J Ethnopharmacol.
- Bassole, I. H., A. S. Ouattara, R. Nebie, C. A. Ouattara, Z. I. Kabore y S. A. Traore (2003). "Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso." Phytochemistry 62(2): 209-212.
- Bergonzelli, G. E., D. Donnicola, N. Porta y I. E. Corthesy-Theulaz (2003). "Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection." Antimicrob Agents Chemother 47(10): 3240-6.
- Bohlmann, J., J. Crock, R. Jetter y R. Croteau (1998). "Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional

expression of wound-inducible (E)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*)." Proc Natl Acad Sci U S A 95(12): 6756-61.

- Bohlmann, J., C. L. Steele y R. Croteau (1997). "Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase." J Biol Chem 272(35): 21784-92.
- Bouchra, C., M. Achouri, L. M. Idrissi Hassani y M. Hmamouchi (2003). "Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan *Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers: Fr." J Ethnopharmacol 89(1): 165-9.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review." Int J Food Microbiol 94(3): 223-53.
- Canales, M., T. Hernandez, J. Caballero, A. Romo de Vivar, G. Avila, A. Duran y R. Lira (2005). "Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico." J Ethnopharmacol 97(3): 429-39.
- Carvalho, A. F., V. M. Melo, A. A. Craveiro, M. I. Machado, M. B. Bantim y E. F. Rabelo (2003). "Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* linn." Mem Inst Oswaldo Cruz 98(4): 569-71.
- Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, J. Totte, L. Pieters y A. J. Vlietinck (2002). "Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo." J Ethnopharmacol 79(2): 213-20.
- Correll, D. S. y M. C. Johnston (1979). Manual of the vascular plants of Texas. Austin, Texas, University of Texas printing Division.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev 12(4): 564-82.
- Cox, S. D., C. M. Mann, J. L. Markham, H. C. Bell, J. E. Gustafson, J. R. Warmington y S. G. Wyllie (2000). "The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)." J Appl Microbiol 88(1): 170-5.
- De Logu, A., G. Loy, M. L. Pellerano, L. Bonsignore y M. L. Schivo (2000). "Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil." Antiviral Res 48(3): 177-85.
- Dharmagadda, V. S., S. N. Naik, P. K. Mittal y P. Vasudevan (2005). "Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species." Bioresour Technol 96(11): 1235-40.
- Dorman, H. J. y S. G. Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." J Appl Microbiol 88(2): 308-16.

- Dudareva, N., E. Pichersky y J. Gershenzon (2004). "Biochemistry of plant volatiles." Plant Physiol 135(4): 1893-902.
- Duru, M. E., M. Ozturk, A. Ugur y O. Ceylan (2004). "The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey." J Ethnopharmacol 94(1): 43-8.
- Erazo, S., C. Delporte, R. Negrete, R. Garcia, M. Zaldivar, G. Iturra, E. Caballero, J. L. Lopez y N. Backhouse (2006). "Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*." J Ethnopharmacol 107(3): 395-400.
- Ezoubeiri, A., C. A. Gadhi, N. Fdil, A. Benharref, M. Jana y M. Vanhaelen (2005). "Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L." J Ethnopharmacol 99(2): 287-92.
- Faleiro, M. L., M. G. Miguel, F. Ladeiro, F. Venancio, R. Tavares, J. C. Brito, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso y L. G. Pedro (2003). "Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*." Lett Appl Microbiol 36(1): 35-40.
- Font Quer, P. (1979). Diccionario de Botánica. Barcelona, España, Editorial Labor.
- Girao, V. C., D. C. Nunes-Pinheiro, S. M. Morais, J. L. Sequeira y M. A. Gioso (2003). "A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease." Prev Vet Med 59(1-2): 95-102.
- Gulluce, M., M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal, M. Polissiou, A. Sokmen y F. Sahin (2003). "In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L." J Agric Food Chem 51(14): 3958-65.
- Gustafson, J. E., Y. C. Liew, S. Chew, J. Markham, H. C. Bell, S. G. Wyllie y J. R. Warmington (1998). "Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*." Lett Appl Microbiol 26(3): 194-8.
- Gutierrez-Alcala, G., C. Gotor, A. J. Meyer, M. Fricker, J. M. Vega y L. C. Romero (2000). "Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis trichome* cells." Proc Natl Acad Sci U S A 97(20): 11108-13.
- Hammer, K. A., C. F. Carson y T. V. Riley (1998). "In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida spp.*" J Antimicrob Chemother 42(5): 591-5.
- Hammer, K. A., C. F. Carson y T. V. Riley (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts." J Appl Microbiol 86(6): 985-90.
- Hanbali, F. E., M. Akssira, A. Ezoubeiri, C. E. Gadhi, F. Mellouki, A. Benharrat, A. M. Blazquez y H. Boira (2005). "Chemical composition and

- antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L." J Ethnopharmacol 99(3): 399-401.
- Hernandez, T., M. Canales, J. G. Avila, A. Duran, J. Caballero, A. Romo de Vivar y R. Lira (2003). "Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (Mexico)." J Ethnopharmacol 88(2-3): 181-8.
- Hernandez, T., M. Canales, J. G. Avila, A. M. Garcia, A. Martinez, J. Caballero, A. R. de Vivar y R. Lira (2005). "Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae)." J Ethnopharmacol 96(3): 551-4.
- Iacobellis, N. S., P. Lo Cantore, F. Capasso y F. Senatore (2005). "Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils." J Agric Food Chem 53(1): 57-61.
- Inouye, S., T. Takizawa y H. Yamaguchi (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact." J Antimicrob Chemother 47(5): 565-73.
- Janahmadi, M., F. Niazi, S. Danyali y M. Kamalinejad (2006). "Effects of the fruit essential oil of *Cuminum cyminum* Linn. (Apiaceae) on pentylenetetrazol-induced epileptiform activity in F1 neurones of *Helix aspersa*." J Ethnopharmacol 104(1-2): 278-82.
- Kalembe, D. y A. Kunicka (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." Curr Med Chem 10(10): 813-29.
- Karaman, S., M. Digrak, U. Ravid y A. Ilcim (2001). "Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey." J Ethnopharmacol 76(2): 183-6.
- Katsura, H., R. I. Tsukiyama, A. Suzuki y M. Kobayashi (2001). "In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms." Antimicrob Agents Chemother 45(11): 3009-13.
- Kolb, D. y M. Muller (2004). "Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products." Ann Bot (Lond) 94(4): 515-26.
- Kunle, O., J. Okogun, E. Egamana, E. Emojevwe y M. Shok (2003). "Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract." Phytomedicine 10(1): 59-61.
- Lahlou, M. (2004). "Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils." Phytother Res 18(6): 435-48.
- Lambert, R. J. y J. Pearson (2000). "Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values." J Appl Microbiol 88(5): 784-90.

- Lambert, R. J., P. N. Skandamis, P. J. Coote y G. J. Nychas (2001). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol." J Appl Microbiol 91(3): 453-62.
- Lange, B. M., M. R. Wildung, E. J. Stauber, C. Sanchez, D. Pouchnik y R. B. Croteau (2000). "Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes." Proc Natl Acad Sci U S A 97(6): 2934-9.
- Lemay, M. J., J. Choquette, P. J. Delaquis, G. Claude, N. Rodrigue y L. Saucier (2002). "Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model." Int J Food Microbiol 78(3): 217-26.
- Lopez-Malo, A., S. M. Alzamora y E. Palou (2005). "*Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds." Int J Food Microbiol 73(2-3): 213-8.
- Magwa, M. L., M. Gundidza, N. Gweru y G. Humphrey (2006). "Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*." J Ethnopharmacol 103(1): 85-9.
- Mahmoud, B. S., K. Yamazaki, K. Miyashita, Y. Kawai, I. S. Shin y T. Suzuki (2006). "Preservative effect of combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during convectonal air-drying." Int J Food Microbiol 106(3): 331-7.
- Maksimovic, Z. A., S. Dordevic y M. Mraovic (2005). "Antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* essential oil." Fitoterapia 76(1): 112-4.
- Mann, C. M. y J. L. Markham (1998). "A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils." J Appl Microbiol 84(4): 538-44.
- Marino, M., C. Bersani y G. Comi (2001). "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*." Int J Food Microbiol 67(3): 187-95.
- Martin, W. W. y C. R. Hutchins (1980). A flora of New México, Cramer: Verlag Komman Gantaer diutgesellschaf.
- Matan, N., H. Rimkeeree, A. J. Mawson, P. Chompreeda, V. Haruthaithanasan y M. Parker (2006). "Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions." Int J Food Microbiol 107(2): 180-5.
- McGarvey, D. J. y R. Croteau (1995). "Terpenoid metabolism." Plant Cell 7(7): 1015-26.
- Milos, M., J. Mastelic y I. Jerkovic (2000). "Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*)." Food Chemistry 71: 79-83.
- Minami, M., M. Kita, T. Nakaya, T. Yamamoto, H. Kuriyama y J. Imanishi (2003). "The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro." Microbiol Immunol 47(9): 681-4.

- Monteiro, M. V., A. K. de Melo Leite, L. M. Bertini, S. M. de Morais y D. C. Nunes-Pinheiro (2006). "Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves." J Ethnopharmacol 111(2): 378-82.
- Muhlbauer, R. C., A. Lozano, S. Palacio, A. Reinli y R. Felix (2003). "Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism." Bone 32(4): 372-80.
- Navarro, V., M. L. Villarreal, G. Rojas y X. Lozoya (1996). "Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases." J Ethnopharmacol 53(3): 143-7.
- NCCLS (2005). "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Fourth Edition. National Committee Clinical Laboratory Standards." Approved Standard M7-A4.
- Nelson, R. R. S. (2003). "In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." J Antimicrob Chemother 40: 305-6.
- Niu, C. y E. S. Gilbert (2004). "Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure." Appl Environ Microbiol 70(12): 6951-6.
- Ohno, T., M. Kita, Y. Yamaoka, S. Imamura, T. Yamamoto, S. Mitsufuji, T. Kodama, K. Kashima y J. Imanishi (2003). "Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*." Helicobacter 8(3): 207-15.
- Oladimeji, F. A., O. O. Orafidiya, T. A. Ogunniyi y T. A. Adewunmi (2000). "Pediculocidal and scabidical properties of *Lippia multiflora* essential oil." J Ethnopharmacol 72(1-2): 305-11.
- Opalchenova, G. y D. Obreshkova (2003). "Comparative studies on the activity of basil--an essential oil from *Ocimum basilicum* L.--against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods." J Microbiol Methods 54(1): 105-10.
- Ozturk, S. y S. Ercisli (2006). "The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge." J Ethnopharmacol 106(3): 372-6.
- Pascual, M. E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sanchez Mata y A. Villar (2001). "*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review." J Ethnopharmacol 76(3): 201-14.
- Perez, S., M. Meckes, C. Perez, A. Susunaga y M. A. Zavala (2005). "Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*." J Ethnopharmacol 102(1): 1-4.
- Periago, P. M. y R. Moezelaar (2001). "Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*." Int J Food Microbiol 68(1-2): 141-8.

- Pol, I. E., W. G. van Arendonk, H. C. Mastwijk, J. Krommer, E. J. Smid y R. Moezelaar (2001). "Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment." Appl Environ Microbiol 67(4): 1693-9.
- Ponce-Macotela, M., Y. Rufino-Gonzalez, A. Gonzalez-Maciel, R. Reynoso-Robles y M. N. Martinez-Gordillo (2006). "Oregano (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage." Parasitol Res 98(6): 557-60.
- Pultrini Ade, M., L. A. Galindo y M. Costa (2006). "Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice." Life Sci 78(15): 1720-5.
- Ranger, C. M., R. E. Winter, G. E. Rottinghaus, E. A. Backus y D. W. Johnson (2005). "Mass spectral characterization of fatty acid amides from alfalfa trichomes and their deterrence against the potato leafhopper." Phytochemistry 66(5): 529-41.
- Rastrelli, L., A. Caceres, C. Morales, F. De Simone y R. Aquino (1998). "Iridoids from *Lippia graveolens*." Phytochemistry 49(6): 1829-1832.
- Ricci, D., D. Fraternali, L. Giamperi, A. Bucchini, F. Epifano, G. Burini y M. Curini (2005). "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae)." J Ethnopharmacol 98(1-2): 195-200.
- Rios, J. L. y M. C. Recio (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." J Ethnopharmacol 100(1-2): 80-4.
- Rosa-Putra, S., R. Nalin, A. M. Domenach y M. Rohmer (2001). "Novel hopanoids from *Frankia* spp. and related soil bacteria. Squalene cyclization and significance of geological biomarkers revisited." Eur J Biochem 268(15): 4300-6.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves y A. P. da Cunha (2003). "Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala." Planta Med 69(1): 80-83.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, E. Pinto, C. Pina-Vaz, A. G. Rodrigues, A. Palmeira, C. Tavares, S. Costa-de-Oliveira, M. J. Goncalves y J. Martinez-de-Oliveira (2003). "Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species." Planta Med 69(9): 871-4.
- Schellmann, S. y M. Hulskamp (2005). "Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a model system." Int J Dev Biol 49(5-6): 579-84.
- Schiestl, F. P., M. Ayasse, H. F. Paulus, C. Lofstedt, B. S. Hansson, F. Ibarra y W. Francke (2000). "Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception." J Comp Physiol [A] 186(6): 567-74.

- Schnitzler, P., K. Schon y J. Reichling (2001). "Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture." Pharmazie 56(4): 343-7.
- Schulz, H., B. Schrader, R. Quilitzsch, S. Pfeffer y H. Kruger (2003). "Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy methods." J Agric Food Chem 51(9): 2475-81.
- Schwab, B., U. Folkers, H. Ilgenfritz y M. Hulskamp (2000). "Trichome morphogenesis in Arabidopsis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355(1399): 879-83.
- Schwämmle, B., E. Winkelhausen, S. Kuzmanova y W. Steiner (2001). "Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms." Food Technol. Biotechnol. 39(4): 341-345.
- Sertie, J. A., R. G. Woisky, G. Wiezel y M. Rodrigues (2005). "Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract." Phytomedicine 12(5): 338-44.
- Shin, S. y S. Lim (2004). "Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton spp.*" J Appl Microbiol 97(6): 1289-96.
- Shunying, Z., Y. Yang, Y. Huaidong, Y. Yue y Z. Guolin (2005). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum.*" J Ethnopharmacol 96(1-2): 151-8.
- Silva, J., W. Abebe, S. M. Sousa, V. G. Duarte, M. I. Machado y F. J. Matos (2003). "Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus.*" J Ethnopharmacol 89(2-3): 277-83.
- Sirisoma, N. S., K. M. Hold y J. E. Casida (2001). "alpha- and beta-Thujones (herbal medicines and food additives): synthesis and analysis of hydroxy and dehydro metabolites." J Agric Food Chem 49(4): 1915-21.
- Stashenko, E. E., B. E. Jaramillo y J. R. Martinez (2004). "Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity." J Chromatogr A 1025(1): 93-103.
- Steele, C. L., J. Crock, J. Bohlmann y R. Croteau (1998). "Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase." J Biol Chem 273(4): 2078-89.
- Szentandrassy, N., P. Szentesi, J. Magyar, P. P. Nanasi y L. Csernoch (2003). "Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle." BMC Pharmacol 3(1): 9.

- Tadeg, H., E. Mohammed, K. Asres y T. Gebre-Mariam (2005). "Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders." J Ethnopharmacol 100(1-2): 168-75.
- Tepe, B., D. Daferera, M. Sokmen, M. Polissiou y A. Sokmen (2004). "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis." J Agric Food Chem 52(5): 1132-7.
- Tognolini, M., E. Barocelli, V. Ballabeni, R. Bruni, A. Bianchi, M. Chiavarini y M. Impicciatore (2006). "Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity." Life Sci 78(13): 1419-32.
- Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti y G. Bisignano (2005). "Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes." Antimicrob Agents Chemother 49(6): 2474-8.
- Ultee, A., M. H. Bennik y R. Moezelaar (2002). "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 68(4): 1561-8.
- Ultee, A., E. P. Kets y E. J. Smid (1999). "Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 65(10): 4606-10.
- Ultee, A. y E. J. Smid (2001). "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*." Int J Food Microbiol 64(3): 373-8.
- Uzel, A., A. Guvensen y E. Cetin (2004). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz from Turkey." J Ethnopharmacol 95(2-3): 151-4.
- Valentao, P., E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra y M. de Lourdes Basto (2002). "Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid." Biol Pharm Bull 25(10): 1324-7.
- Valero, M. y M. C. Salmeron (2003). "Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth." Int J Food Microbiol 85(1-2): 73-81.
- Valkama, E., J. P. Salminen, J. Koricheva y K. Pihlaja (2003). "Comparative analysis of leaf trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish birch species." Ann Bot (Lond) 91(6): 643-55.
- Vardar-Unlu, G., F. Candan, A. Sokmen, D. Daferera, M. Polissiou, M. Sokmen, E. Donmez y B. Tepe (2003). "Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (*Lamiaceae*)." J Agric Food Chem 51(1): 63-7.

- Veldhuizen, E. J., J. L. Tjeerdsma-van Bokhoven, C. Zweijtzer, S. A. Burt y H. P. Haagsman (2006). "Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol." J Agric Food Chem 54(5): 1874-9.
- Viljoen, A. M., S. Subramoney, S. F. van Vuuren, K. H. Baser y B. Demirci (2005). "The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils." J Ethnopharmacol 96(1-2): 271-7.
- Wagner, G. J., E. Wang y R. W. Shepherd (2004). "New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome." Ann Bot (Lond) 93(1): 3-11.
- Yadegarinia, D., L. Gachkar, M. B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. A. Astaneh y I. Rasooli (2006). "Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils." Phytochemistry 67(12): 1249-55.
- Yang, N. S., L. F. Shyur, C. H. Chen, S. Y. Wang y C. M. Tzeng (2004). "Medicinal herb extract and a single-compound drug confer similar complex pharmacogenomic activities in mcf-7 cells." J Biomed Sci 11(3): 418-22.
- Yayli, N., A. Yasar, C. Gulec, A. Usta, S. Kolayli, K. Coskuncelebi y S. Karaoglu (2005). "Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*." Phytochemistry 66(14): 1741-5.
- Yu, J., J. Lei, H. Yu, X. Cai y G. Zou (2004). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*." Phytochemistry 65(7): 881-4.

Artículos en revisión

Actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

Antibacterial activity of essential oil of oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

Artículo 1. Enviado a Agraria Nueva Epoca 20 de Marzo de 2006

Actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

Antibacterial activity of essential oil of oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

Genoveva Hernández Zamudio

Departamento de Agroecología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
veva_hz@yahoo.com

Margarita Guerrero Rodríguez

Pasante de Ing. en Agroecología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Rafael Rodríguez Martínez

Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Sara Elisa Alonzo Rojo

Laboratorio de Microbiología de la Unidad Médica de Altas Especialidades
No.71 del IMSS, Torreón, Coahuila, México.

Abstract

The main components and the antibacterial activity of the essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. collected in Torreón, Coahuila, México (LN 25° 00 ' , LO 103°14 ' and 1320 msnm) were studied. The essential oil was obtained by hydrodistillation of the air parts (leaves and flowers). The main components analysis was carried out by means of Nuclear Magnetic Resonance (RMN) method of ¹³C and its antibacterial capacity was evaluated determining the Minimal Inhibitory Concentration using *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strains, and *E. coli* and *S. aureus* strains, isolated from mastitis cow's milk. The main components were the carvacrol (72%) and p-cymene, the precursory of carvacrol (28%). Both percentages are elevated in comparison with those reported in other studies, (0.02 to 44.8% for carvacrol and 6.8 to 21.8% for p-cymene). In relation with ATCC strains, those from mastitis cow's milk showed it lowers sensibility to the oil's antibacterial effects, (.250 vs. .125 µl/ml to *E. coli* and .125 vs. .062 to *S. aureus*), while *Ps. aureuginosa* required .250 µl/ml. The antibacterial activity observed on the oregano essential oil was effective against the pathogenic bacteria tested, showing their potential use like a therapeutic agent.

Key Word: Bacterial, Dilution methods, Hydrodistillation, Carvacrol, p-cymene.

Resumen

Se estudiaron los componentes y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia graveolens* H.B.K. colectado en Torreón, Coahuila, México, obtenido por hidrodestilación de las partes aéreas (hojas y flores). El análisis de los

constituyentes principales (CP) se realizó por Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y la actividad antibacteriana determinando la Concentración Mínima Inhibitoria por el método de dilución en caldo, utilizando cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y dos cepas aisladas de leche de vaca con mastitis: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las constituyentes principales obtenidos fueron: carvacrol (72%) y su precursor, p-cimeno (28%). Ambos porcentajes son elevados respecto a los reportados en otros estudios (0.02 a 44.8% para el carvacrol y 6.8 a 21.8% para p-cimeno). En comparación con las cepas ATCC, *E. coli* y *S. aureus* aisladas de leche con mastitis fueron menos sensibles al aceite de orégano (.250 vs. .125 $\mu\text{l/ml}$ en *E. coli* y .125 vs. .062 en *S. aureus*) mientras que *Ps. aureuginosa* requirió .250 $\mu\text{l/ml}$. La actividad antibacteriana mostrada por el aceite esencial de orégano fue efectiva contra las bacterias patógenas probadas, lo que demuestra su potencial uso como agente terapéutico.

Palabras clave: Bacterias, Método de Dilución, Hidrodestilación, Carvacrol, p-cimeno.

Introducción

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies están distribuidas principalmente a lo largo de los países de América del Sur, Centroamérica y en los territorios de África Tropical (Rastrelli *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 2001; Stashenko *et al.*, 2004). Las plantas de este género se utilizan en forma de té o infusión por poseer propiedades curativas para distintos padecimientos que van desde infecciones respiratorias, digestivas, hipertensión arterial, antiespasmódico, hasta malaria, sarna, pedunculosis y también como desinfectante bucal (Abe *et al.*, 2002; Valentao *et al.*, 2002; Stashenko *et al.*, 2004).

Lippia graveolens H.B.K. es una planta fuertemente aromática nativa del sur de Norteamérica, México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá y Colombia (Valentao *et al.*, 1999). En la medicina folclórica se le conoce como "orégano de monte" y "mejorana" (Stashenko *et al.*, 2004). Esta especie es usada en Centroamérica para el tratamiento de varias enfermedades principalmente desordenes gastrointestinales y respiratorios (Rastrelli *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 2001; Salgueiro *et al.*, 2003), además de ser empleada como sazónador de alimentos (Salgueiro *et al.*, 2003; Stashenko *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales son productos naturales extraídos de materiales vegetales (Pascual *et al.*, 2001). Estudios de los metabolitos secundarios de las plantas muestran que los aceites esenciales son potencialmente utilizables en la medicina y en las industrias alimenticia, farmacéutica y de cosméticos. Generalmente se aíslan de plantas no maderables por métodos de destilación, normalmente por vapor (hidrodestilación), y son mezclas inconstantes de terpenos, principalmente de hemiterpenos [C5], monoterpenos [C10], sesquiterpenos [C15] y diterpenos [C20], aunque también pueden estar

presentes una variedad de hidrocarburos alifáticos de peso molecular bajo (lineal, ramificados, saturados y monosaturados), ácidos, alcoholes, aldehídos, acíclicos o lactones, y excepcionalmente compuestos que contienen nitrógeno y azufre. Los terpenos están entre los compuestos responsables de los usos medicinales y culinarios de las plantas aromáticas y en su mayoría derivan de la condensación de unidades de isopreno de cinco-carbonos ramificados y se categorizan según el número de estas unidades presentes en el esqueleto del carbono (Cowan, 1999; Ohno *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales se usan para infecciones ocasionadas por bacterias y hongos (Dorman *et al.*, 2000), poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Dorman *et al.*, 2000), además como fragancias en perfumería y en la industria alimenticia (Cowan, 1999).

Aunque durante siglos se han reconocido las propiedades antimicrobianas de algunos aceites esenciales derivados de plantas, éstas se han confirmado sólo recientemente y se relacionan con ciertos componentes de los aceites que son particularmente activos, como el carvacrol, timol, citral, geraniol, eugenol, mentol y el aldehído de la canela. Se ha reportado que a concentraciones superiores a 1 mM el carvacrol disminuye exponencialmente la viabilidad de *Bacillus cereus*. Al mismo tiempo, se observan aumentos en la fluidez de la membrana y el escape de protones e iones de potasio, lo que llevan a una disminución en la pendiente del pH en la membrana citoplasmática, a su colapso y a la inhibición de la síntesis de ATP. Estos eventos son seguidos por la muerte de la célula. (Hammer *et al.*, 1998) Esto ha despertado el interés en los aceites esenciales debido a que se ha sugerido que podrían ser útiles en la erradicación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Kalemba *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004). En lo que respecta a los compuestos presentes en *L. graveolens*, los principales son el timol y el carvacrol (Ultee *et al.*, 1999) cuyos precursores son el γ -terpineno y p -cimeno respectivamente (Nelson, 2003). Estos poseen actividad antibacteriana y tiene aplicación en el tratamiento de enfermedades (Nelson, 2003).

En la planta la cantidad de aceite esencial y sus componentes varía como resultado de los factores climáticos, el origen geográfico y la fecha de cosecha, encontrándose que su mayor producción se obtiene a finales del período de floración, además el rendimiento también se afecta por el proceso de extracción (Ultee *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2001; Salgueiro *et al.*, 2003).

Es necesario que la evaluación de la actividad antimicrobiana de un aceite esencial deba acompañarse por la determinación de su composición química (Burt, 2004). Si los componentes del aceite esencial de *L. graveolens* son los responsables de la actividad antibacteriana y varían de acuerdo con los factores climáticos y fonológicos, se espera que este aceite esencial del Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila, tenga como componente mayor a el carvacrol y por ende mayor potencial antibacteriano. Es por ello que este trabajo pretende determinar los principales componentes del aceite esencial de *L. graveolens* y evaluar su actividad *in vitro* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Materiales y Métodos

Material vegetativo

Durante septiembre a noviembre del 2003, fueron colectadas partes aéreas de plantas silvestres de orégano en floración en el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila, con coordenadas geográficas 25° 00' de latitud norte y 103° 14' oeste y a 1320 msnm, y se depositó un ejemplar con el número 2006 en el Herbario "Jorge Saúl Marroquín de la Fuente" del Departamento de Agroecología de la Unidad Laguna de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Extracción y Análisis del Aceite Esencial

El aceite esencial se extrajo de las partes aéreas de las plantas (hojas y flores) desecadas al sol y tratadas por hidrodestilación durante 3 h, usando un aparato tipo Rotavapor Buche R-114 modificado. El análisis de los componentes del aceite se realizó en el laboratorio de Química Heterocíclica del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) Unidad Zacatenco en la Ciudad de México del Instituto Politécnico Nacional (IPN), mediante el método Espectros de Cloroformo Deuterado de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C .

Cepas Bacterianas

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* fueron aisladas de las ubres de vacas lecheras con mastitis. *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922 fueron proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo por el método de dilución en caldo (Gulluce *et al.*, 2003). Las Diluciones fueron de 4.0 a 0.008 $\mu\text{l/ml}$. de aceite esencial de *Lippia graveolens* al 0.1% en etanol al 96% para la solubilidad. Los tubos fueron inoculados con una suspensión de los microorganismos que se ajustó a una densidad de 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias de acuerdo al 5 nefelómetro de Mc. Farland en 2 ml. de infusión cerebro-corazón (Sigma) en tubos de ensaye de 10 ml. Se tomaron los valores de la CMI como la concentración más baja de extracto que completamente inhibió el crecimiento bacteriano después de 24 h de incubación a 37 °C después de lo cual se leyó la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro Coleman Junior II. Se uso un testigo sin el extracto. Cada experimento se repitió por lo menos tres veces.

Resultados y Discusión

El análisis del aceite permitió observar que los dos compuestos más abundantes de la muestra fueron el carvacrol, con un 72%, y el *p*-cimeno, precursor del carvacrol, con un 28%. Estos resultados difieren de los obtenidos por Salgueiro *et al.* (2003a), quienes reportan niveles de 21.8% de *p*-cimeno y 44.8 % de carvacrol para su muestra con, niveles más altos. Los resultados son

importantes debido a que según reportes previos (Perez-Galindo *et al.*, 2000; Gulluce *et al.*, 2003; Burt, 2004) la actividad antimicrobiana del aceite de orégano depende de su contenido en carvacrol y timol, mientras que por otra parte, los organismos con infecciones bacterianas se benefician por la acción antioxidante de estos compuestos (Burt, 2004).

Cuadro 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Lippia graveolens*.

Bacteria	CMI (µl/ml)
<i>Escherichia coli</i>	0.250
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.062
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.250

Los resultados muestran que la CMI para las bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 es ocho veces menor a los reportados por Salgueiro *et al.* (2003a), debido quizás a las diferencias en el aceite esencial de *L. graveolens* usado, principalmente por su concentración en carvacrol.

Las cepas obtenidas de leche de vacas con mastitis requirieron más del doble de la concentración para inhibir el crecimiento, que las bacterias ATCC, es decir, las bacterias nativas mostraron menor susceptibilidad a los efectos antibacterianos del aceite. Por otra parte se observó que las bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *E. coli* ATCC 25922) presentaron menor sensibilidad a los efectos antibacterianos del aceite de *L. graveolens*, que las bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923). *P. aeruginosa* 27853 presentó una CMI de .250 µl/ml, por lo que no encontramos evidencias de que esta bacteria sea capaz de degradar el carvacrol parcialmente (Schwämmle *et al.*, 2001).

Conclusiones

De acuerdo con el objetivo planteado sobre la caracterización del aceite esencial de *Lippia graveolens* obtenido del ejido Barrial de Guadalupe, municipio de Torreón, Coahuila, México. Se puede afirmar que tiene un alto contenido de carvacrol por lo que se deduce que es de buena calidad.

Con respecto al potencial antibacteriano del aceite esencial de *Lippia graveolens* demostró tener magníficas cualidades para inhibir el crecimiento a bajas concentraciones de todas las bacterias probadas pero de mejor manera con las Gram-positivas.

La posibilidad de utilizar en forma extensa el aceite esencial de *L. graveolens* para infecciones bacterianas requiere que se continúe con pruebas *in vitro* para otros grupos bacterianos y de hongos, así como con pruebas *in vivo* para las

bacterias que presentaron susceptibilidad en la pruebas *in vitro*. Son necesarios también, más estudios que permitan identificar la farmacodinamia y la farmacocinética de este recurso natural.

Agradecimiento

Al Establo Beta San Gabriel, S. A. de C.V. por el apoyo económico, para la realización del proyecto.

Literatura Citada

Bagamboula, C., M. Uyttendaele y J. Debevere (2004). "Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*." Food Microbiology 21: 33-42.

Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review." Int J Food Microbiol 94(3): 223-53.

Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev 12(4): 564-82.

Dorman, H. J. y S. G. Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." J Appl Microbiol 88(2): 308-16.

Gulluce, M., M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal, M. Polissiou, A. Sokmen y F. Sahin (2003). "In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L." J Agric Food Chem 51(14): 3958-65.

Hammer, K. A., C. F. Carson y T. V. Riley (1998). "In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp." J Antimicrob Chemother 42(5): 591-5.

Kalamba, D. y A. Kunicka (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." Curr Med Chem 10(10): 813-29.

Nelson, R. R. S. (2003). "In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." J Antimicrob Chemother 40: 305-6.

Ohno, T., M. Kita, Y. Yamaoka, S. Imamura, T. Yamamoto, S. Mitsufuji, T. Kodama, K. Kashima y J. Imanishi (2003). "Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*." Helicobacter 8(3): 207-15.

Pascual, M. E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sanchez Mata y A. Villar (2001). "Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review." J Ethnopharmacol 76(3): 201-14.

Perez-Galindo, J. A., J. Lopez-Miranda y I. R. Martinez-Dominguez (2000). "Geometric and Reynolds number effects on oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil extraction." J Food Eng 44: 127-33.

Rastrelli, L., A. Caceres, C. Morales, F. De Simone y R. Aquino (1998). "Iridoids from *Lippia graveolens*." Phytochemistry 49(6): 1829-1832.

Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves y A. P. da Cunha (2003a). "Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala." Planta Medica 69(1): 80-83.

Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, E. Pinto, C. Pina-Vaz, A. G. Rodrigues, A. Palmeira, C. Tavares, S. Costa-de-Oliveira, M. J. Goncalves y J. Martinez-de-Oliveira (2003b). "Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species." Planta Med 69(9): 871-4.

Schwämmle, B., E. Winkelhausen, S. Kuzmanova y W. Steiner (2001). "Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms." Food Technol. Biotechnol. 39(4): 341-345.

Stashenko, E. E., B. E. Jaramillo y J. R. Martinez (2004). "Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography." J Chromatogr A 1025(1): 105-13.

Ultee, A., M. H. Bennik y R. Moezelaar (2002). "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 68(4): 1561-8.

Ultee, A., E. P. Kets y E. J. Smid (1999). "Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 65(10): 4606-10.

Valentao, P., E. Fernades, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra y M. L. Bastos (2002). "Studies on the Antioxidant Activity of *Lippia citriodora* Infusion: Scavenging Effect on Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid." Biol. Pharm. Bull. 25(10): 1324-1327.

**Actividad antibacteriana in vitro de los aceites esenciales de
Lippia graveolens H.B.K. y *Thymus vulgaris* L.**

Artículo 2. Enviado a la revista Universidad y Ciencia 22 de agosto 2006

Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo

Actividad antibacteriana *in vitro* de los aceites esenciales de *Lippia*

graveolens H.B.K. y *Thymus vulgaris* L.

Antibacterial activity *in vitro* of the essential oils of *Lippia graveolens*

H.B.K. and *Thymus vulgaris* L.

Genoveva Hernández-Zamudio veva_hz@yahoo.com¹,
José Luís Corona-Medina², Margarita Yolanda Mendoza-Ramos³,
Marisela del Rocío González-Martínez⁴, Sara Elisa Alonzo-Rojo⁴.

¹ (GHZ) Departamento de Agroecología
División de Agronomía UAAAN-UL
Periférico Antonio Narro y Carr. Santa Fe
San Antonio de los Bravos
Torreón 27135 Coahuila México

²Depto. Salubridad e Higiene de la UAAAN-UL

³Depto. Ciencias Médico Veterinarias de la UAAAN-UL

⁴Laboratorio de Microbiología de la UMAE No.71 del IMSS

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Lippia graveolens* con 95.86 % de carvacrol y *Thymus vulgaris* con 99.71 % de timol. La actividad antibacteriana de los aceites esenciales fue evaluada determinando la CMI por el método de dilución en caldo para cinco bacterias estandarizadas (ATCC) y cinco nativas conocidas como patógenas. *Staphylococcus aureus* 25923 y *Salmonella typhimurium* 14024 fueron las más susceptibles a el aceite de *L. graveolens* con una CMI de 0.0048 µl/ml. Para *T. vulgaris*, *Staphylococcus aureus* 25923, con 0.024 µl/ml. El aceite de *L. graveolens* presento mayor actividad antibacteriana.

Palabras claves: *Lippia graveolens*, *Thymus vulgaris*, aceites esenciales, actividad antibacteriana

ABSTRACT. The aim of this work was to determine the antibacterial activity of the essential oils of *Lippia graveolens* with 95.86 % carvacrol and *Thymus vulgaris* with 99.71 % thymol. The antibacterial activity of the essential oils was evaluated determining the MIC for the dilution method in broth for five standardized bacteria (ATCC) and five native well-known as pathogens. *Staphylococcus aureus* 25923 and *Salmonella typhimurium* 14024 the most sensitive went to the oil of *L. graveolens* with an MIC of 0.0048 µl/ml. For *T. vulgaris*, *Staphylococcus aureus* 25923, with 0.024 µl/ml. The oil of *L. graveolens* presents most activity. The bacteria Gram positive showed most sensibility to both oils.

Key Word: *Lippia graveolens*, *Thymus vulgaris*, essential oil, antibacterial activity

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas naturales, complejas y volátiles de metabolitos secundarios aislados por hidrodestilación o por expresión (en cítricos) de las plantas. Estos han sido usados durante mucho tiempo, en las industrias farmacéutica, cosmética, alimenticia, en la aromaterapia, la fitoterapia y la nutrición, además de aliviar un gran número de enfermedades. (Ultee *et al.*, 1999; Bagamboula *et al.*, 2004). Las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas de los aceites esenciales han sido

demostradas en un número cada vez mayor de investigaciones (Horváth *et al.*, 2002; Ultee *et al.*, 2002), usando para ello distintas bacterias, virus y hongos . En el aceite esencial de orégano *L. graveolens* H.B.K. (Verbenaceae) contiene principalmente carvacrol, seguido por el timol y el *p*-cimeno. (Schwämmle *et al.*, 2001; Valentao *et al.*, 2002; Kalemba *et al.*, 2003); en el de tomillo, *T. vulgaris* L. (Lamiaceae) los componente dominante en muchas de sus muestras son el timol (44.4 a 58.1 %), el *p*-cimeno (9.1 a 18.5 %), γ -terpineno (6.9 a 18.9 %) y el carvacrol (2.4 a 4.2 %) (Oladimeji *et al.*, 2000; Perez-Galindo *et al.*, 2000; Gulluce *et al.*, 2003) (Figura 1).

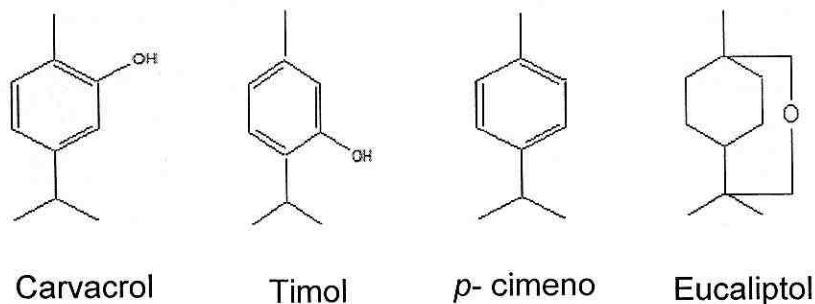


Figura. 1. Estructuras moleculares de los principales componentes de los aceites esenciales del orégano y el tomillo.

Se ha sabido desde tiempos antiguos que las especias y sus aceites esenciales tienen grados variables de actividad antimicrobiana (Szentandrassy *et al.*, 2003). El Carvacrol se ha caracterizado por ser un inhibidor del crecimiento de diferentes bacterias patógenas (Rastrelli *et al.*, 1998; Alma *et al.*, 2003) como la *Salmonella*, además de inhibir la producción de toxinas en *Bacillus cereus* (Ultee *et al.*, 1999; Salgueiro *et al.*, 2003). El timol se usa ampliamente en la medicina como antimicrobiano, antiséptico, desinfectante, además de tener propiedades para curar heridas (Karaman *et al.*, 2001).

El modo de acción del timol y del *p*-cimeno se debe probablemente a su naturaleza hidrófoba que disuelve el dominio hidrófobo de la membrana citoplasmática (Horváth *et al.*, 2002). El carvacrol a concentraciones mayores de 1 mM, disminuye la viabilidad exponencialmente de *Bacillus cereus*, donde se observa aumento en la fluidez de la membrana lo cual provoca un escape de los iones de potasio, lo que llevan a una disminución en la pendiente del pH de la membrana citoplasmática, un colapso de la membrana, la inhibición de la síntesis de ATP; finalmente, la muerte celular (Baranauskiene *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2003). La diferencia estructural entre el timol y el carvacrol sólo está en la posición del grupo OH (Ultee *et al.*, 2002; Bagamboula *et al.*, 2004). Ver Fig. 1.

Si el carvacrol y el timol tienen efectos antibacteriano como se ha visto en una gran cantidad de bacterias y debido a sus semejanzas del modo de acción y estructurales, se espera que usando aceites con contenido altos de ambos componentes, la susceptibilidad de las bacterias a estos sea semejante. Es por ello que el objetivo de este trabajo es determinar la susceptibilidad de 10 cepas bacterianas a los aceites esenciales de *L. graveolens* y *T. vulgaris* con altos contenidos de carvacrol y timol respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo

Las partes aéreas de *L. graveolens* en floración fueron colectadas de septiembre a noviembre del 2004, de poblaciones silvestres en el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila, LN 25° 00', LO 103°14' y 1320

msnm. El *T. vulgaris* fue cosechado en el municipio de Matamoros, Coahuila en el mes de junio del 2004.

Extracción del aceite esencial

Los aceites esenciales se obtuvieron de las partes aéreas de las plantas (hojas, ramas y flores) desecadas al sol, por hidrodestilación (arrastre de vapor), durante 3 horas usando un aparato tipo Rotavapor Buche R-220 modificado.

Caracterización de los aceites esenciales

La caracterización del aceite se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación de los Recursos Naturales (CIReNa), de Salaires, Chihuahua, en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer. La columna usada para el análisis de cromatografía fue PE-5 columna capilar (30 m x 0.25 mm i.d. espesor de la membrana 0.25 μ m). El gas acarreador usado fue el helio e hidrógeno y aire cero. Las condiciones de inyector a 265°C, línea de transferencia 225 °C, y siguiendo un programa de temperaturas de 55 °C por minuto y llevándolo a 95 °C con una pendiente de 3 °C por minuto y terminado a 220 °C con una pendiente de 25 °C, manteniéndose por 10 minutos, con un tiempo total de 27.06 minutos. Las cantidades relativas de los porcentajes fueron calculadas para el total de iones del cromatograma de los compuestos separados por una computadora integrada.

Los aceites esenciales componentes y porcentaje

Los aceites esenciales usados en esta prueba mostraron: 95.84 % de carvacrol, 3.06 % de eucaliptol y 1.08 de timol para *L. graveolens*. Para el *T. vulgaris* el

componente predominante fue el timol con un 99.71 %, seguido de *p*-cimeno con 0.29 %.

Cepas bacterianas

Las bacterias ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Escherichia coli* ATCC 25922, fueron proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Las bacterias nativas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*, fueron obtenidas de pacientes en el Laboratorio de Microbiología de la UMAE N° 71 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Torreón, Coahuila, México.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria, es la concentración más baja del aceite esencial a la que el microorganismo no demuestra crecimiento visible. Ésta se determinó por el método de dilución en caldo. Utilizando tubos de 10 ml conteniendo 4 ml de Caldo Mueller-Hinton. Para *L. graveolens* se agregó 0.50 ml de la dilución de aceite esencial al 0.4% disuelto en etanol al 96% para reforzar su solubilidad, en diluciones seriadas de 1:9 que fueron de 3.27 a 6.15×10^{-6} µl/ml. Para el aceite esencial de *T. vulgaris* se agregaron a cada tubo

0.90 ml de aceite esencial al 0.4% en etanol al 96%, en diluciones de 1:5, desde 15.25 a 1.95×10^{-4} $\mu\text{l/ml}$. Para ambos aceites fueron inoculados con 1 ml. de suspensión de los microorganismos ajustado a una densidad de 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de acuerdo al 5 del nefelómetro de Mc Farland. Después de la inoculación, los tubos se incubaron a 35 °C durante 20 h (Bagamboula *et al.*, 2004), para posteriormente leer la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro "Spectronic 20 Genests" a 625 nm (Schwämmle *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2005). Se tomaron los valores de la CMI como la concentración más baja de extracto que inhibió por completo el crecimiento bacteriano. Cada serie se trabajó por triplicado, colocando un testigo negativo.

RESULTADOS

Actividad antibacteriana de *L. graveolens*

Los resultados obtenidos para el aceite esencial de *L. graveolens*, (Tabla 1) muestran que las bacterias con mayor susceptibilidad fueron *S. aureus* 25923 y *Salmonella typhimurium* 14028 con 0.0048 $\mu\text{l/ml}$ de CMI y las de mayor resistencia fueron *P. aeruginosa* nativa, *P. aeruginosa* 27853, *E. coli* nativa y *B. cereus* con 0.3633 $\mu\text{l/ml}$ de CMI.

Cuadro 1. Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales de *Lippia graveolens* y *Thymus vulgaris*, para diferentes cepas ATCC y nativas.

Bacteria	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	
	<i>L. graveolens</i>	<i>T. vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> 25922	0.0404	0.610
<i>Escherichia coli</i>	0.3633	3.050
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	0.0048	0.024
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.0404	0.610
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	0.3633	3.050
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.3633	3.050
<i>Salmonella typhimurium</i> 14028	0.0048	0.122
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.0404	0.122
<i>Bacillus cereus</i> 11778	0.0404	0.122
<i>Bacillus cereus</i>	0.3633	0.610

La CMI para las bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923. Las bacterias Gram-negativas presentan mayor resistencia que las Gram-positivas, a excepción de *B. cereus* 11778. Las bacterias probadas en este estudio mostraron una mayor susceptibilidad al aceite esencial de *L. graveolens*, lo cual se expresa con CMI menores (Tabla 1).

Actividad antibacteriana de *T. vulgaris*

En lo que respecta a las CMI del aceite esencial de *T. vulgaris*, se observa que la bacteria con mayor susceptibilidad fue la *S. aureus* 25923 con 0.024 ($\mu\text{l/ml}$) y las bacterias que mostraron mayor resistencia fueron *E. coli*, *P. aeruginosa* 27853, *P. aeruginosa* y *B. cereus* con 3.050 $\mu\text{l/ml}$ de CMI (Tabla 1). Las bacterias Gram-positivas de este estudio registraron una mayor sensibilidad en comparación con las bacterias Gram-negativas.

DISCUSIÓN

Las CMI obtenidas por Salgueiro (2001) para dos muestras del aceite esencial de *L. graveolens* y para las bacterias *E. coli* y *S. aureus* ATCC son mayores a las obtenidas en este trabajo. Debido probablemente al las diferencias de los componentes y a su proporción en el aceite esencial. Además coincide en la afirmación de que el carvacrol presento una mayor actividad que el timol. Los aceites usados por este autor se obtuvieron de dos localidades en Guatemala muestran menor cantidad de carvacrol que el de la localidad del Barreal de Guadalupe de mpio. de Torreón, Coahuila, México usado en este trabajo, por lo cual apoya lo dicho por (Niu *et al.*, 2004). Respecto a la diferencia en la composición de los aceites esenciales puede ser debido al tiempo de colecta del material, factores geográficos y climáticos.

Se han documentado ampliamente el uso tradicional de las plantas de orégano mexicano y tomillo, como infusión para múltiples trastornos de salud en humanos (Ultee *et al.*, 1999; Schwämmle *et al.*, 2001). Nuestros datos dan validez a estas prácticas tradicionales debido a la capacidad antibacteriana que los aceites esenciales usados en este trabajo evidenciaron.

Los aceites esenciales de *L. graveolens* y *T. vulgaris* presentan actividad antibacteriana *in vitro*, de acuerdo a los datos reportados por (Lennette *et al.*, 1982; Salgueiro *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2003; NCCLS, 2005). Además que el aceite esencial de *L. graveolens* con un alto contenido de carvacrol presentó una mayor efectividad en todas las bacterias probadas, que el aceite esencial

de *T. vulgaris* cuyo componente mayor fue el timol. Lo cual apoya las investigaciones que reportan que el carvacrol presenta mayor efectividad antibacteriana que el tomillo (Karaman *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2003).

Las bacterias Gram-positivas mostraron mayor susceptibilidad a los aceites esenciales usados en este trabajo, lo cual apoya lo reportado por (Rastrelli *et al.*, 1998).

Debido a la actividad antibacteriana demostrada por los aceites esenciales probados en este trabajo, las investigaciones de sobre este tema deben seguir es la utilización de estos, para lo cual se deben realizar investigación *in vivo*.

En resumen, los aceites esenciales de *L. graveolens* y *T. vulgaris* mostraron actividad antibacteriana contra las cepas probadas. Los aceites esenciales usados demostraron tener una mayor sensibilidad en las bacterias Gram-positivas. De los aceites usados el de *L. graveolens* presento ser mas activo que el de *T. vulgaris*.

LITERATURA CITADA

- Alma, M. H., A. Mavi, A. Yildirim, M. Digrak y T. Hirata (2003). "Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey." Biol Pharm Bull 26(12): 1725-9.
- Bagamboula, C., M. Uyttendaele y J. Debevere (2004). "Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*." Food Microbiology 21: 33-42.

- Baranauskiene, R., P. R. Venskutonis, P. Viskelis y E. Dambrauskiene (2003). "Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*)." J Agric Food Chem 51(26): 7751-8.
- Faleiro, M. L., M. G. Miguel, F. Ladeiro, F. Venancio, R. Tavares, J. C. Brito, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso y L. G. Pedro (2003). "Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*." Lett Appl Microbiol 36(1): 35-40.
- Gulluce, M., M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal, M. Polissiou, A. Sokmen y F. Sahin (2003). "In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L." J Agric Food Chem 51(14): 3958-65.
- Hernandez, T., M. Canales, J. G. Avila, A. Duran, J. Caballero, A. Romo de Vivar y R. Lira (2003). "Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (Mexico)." J Ethnopharmacol 88(2-3): 181-8.
- Horváth, G., B. Kocsis, L. Botz, J. Németh y L. Szabó (2002). "Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography." Acta Biologica Szegediensis 46(3-4): 145-146.
- Kalemba, D. y A. Kunicka (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." Curr Med Chem 10(10): 813-29.
- Karaman, S., M. Digrak, U. Ravid y A. Ilcim (2001). "Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey." J Ethnopharmacol 76(2): 183-6.
- Lenette, E. H., A. Balows, W. J. Hausler y J. P. Truant (1982). Manual de microbiología clínica. Buenos Aires, Argentina.
- NCCLS (2005). "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Fourth Edition. National Committee Clinical Laboratory Standards." Approved Standard M7-A4.
- Niu, C. y E. S. Gilbert (2004). "Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure." Appl Environ Microbiol 70(12): 6951-6.
- Oladimeji, F. A., O. O. Orafidiya, T. A. Ogunniyi y T. A. Adewunmi (2000). "Pediculocidal and scabidical properties of *Lippia multiflora* essential oil." J Ethnopharmacol 72(1-2): 305-11.
- Pascual, M. E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sanchez Mata y A. Villar (2001). "*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review." J Ethnopharmacol 76(3): 201-14.
- Perez-Galindo, J. A., J. Lopez-Miranda y I. R. Martinez-Dominguez (2000). "Geometric and Reynolds number effects on oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil extraction." J Food Eng 44: 127-33.

- Periago, P. M. y R. Moezelaar (2001). "Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*." Int J Food Microbiol 68(1-2): 141-8.
- Rastrelli, L., A. Caceres, C. Morales, F. De Simone y R. Aquino (1998). "Iridoids from *Lippia graveolens*." Phytochemistry 49(6): 1829-1832.
- Rios, J. L. y M. C. Recio (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." J Ethnopharmacol 100(1-2): 80-4.
- Robledo, S., E. Osorio, D. Munoz, L. M. Jaramillo, A. Restrepo, G. Arango y I. Velez (2005). "In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives." Antimicrob Agents Chemother 49(4): 1652-5.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves y A. P. da Cunha (2003). "Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala." Planta Med 69(1): 80-83.
- Schulz, H., B. Schrader, R. Quilitzsch, S. Pfeffer y H. Kruger (2003). "Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy methods." J Agric Food Chem 51(9): 2475-81.
- Schwämmle, B., E. Winkelhausen, S. Kuzmanova y W. Steiner (2001). "Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms." Food Technol. Biotechnol. 39(4): 341-345.
- Szentandrassy, N., P. Szentesi, J. Magyar, P. P. Nanasi y L. Csernoch (2003). "Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle." BMC Pharmacol 3(1): 9.
- Takeuchi, H., Z. G. Lu y T. Fujita (2004). "New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.)." Biosci Biotechnol Biochem 68(5): 1131-4.
- Ultee, A., M. H. Bennik y R. Moezelaar (2002). "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 68(4): 1561-8.
- Ultee, A., E. P. Kets y E. J. Smid (1999). "Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 65(10): 4606-10.
- Valero, M. y M. C. Salmeron (2003). "Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth." Int J Food Microbiol 85(1-2): 73-81.

DISCUSIÓN GENERAL

Es importante investigar científicamente las plantas que se han usado en la medicina tradicional como fuentes potenciales de nuevos compuestos antimicrobianos (Pascual *et al.*, 2001). Además ha resurgido el interés en terapias naturales, debido a que existe una creciente demanda de productos eficaces, seguros y naturales, que exigen datos cuantitativos de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (Salgueiro *et al.*, 2003). A los aceites esenciales se les han dado diversas aplicaciones (Takeuchi *et al.*, 2004), pero la de mayor reconocimiento, ha sido la actividad antimicrobiana (Faleiro *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004).

Los análisis de los aceites esenciales de *Lippia graveolens* recolectado en el Barrial de Guadalupe, Municipio Torreón, Coahuila, revelaron que tienen un alto contenido de carvacrol, mucho mayor al de los aceites esenciales de otras plantas y de la misma especie de diferente procedencia (Cuadro 4). Este monoterpeno se caracteriza por inhibir el crecimiento de diferentes patógenos (Schwämmle *et al.*, 2001), además de ser considerado como de alta actividad específica comparada con otros componentes de los aceites esenciales (Ultee *et al.*, 1999; Rios *et al.*, 2005).

De la planta de *Thymus vulgaris* L. (tomillo), se extrae un aceite con alto contenido de fenoles que se usa principalmente en los alimentos como sazónador y conservador, para el cuidado bucal, como cosmético, además como producto fitofarmacéutico (Mitscher *et al.*, 1987). Su efecto antibacteriano se atribuye a uno de sus principales componentes: el timol (Hammer *et al.*,

1999). El aceite de tomillo usado en este trabajo, extraído de plantas cultivadas en la Región, tuvo mayor concentración de timol que la reportada para diferentes especies de *Thymus* (Karaman *et al.*, 2001; Faleiro *et al.*, 2003; Kalemba *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004; Veldhuizen *et al.*, 2006).

Algunos autores apoyan la idea de que la variabilidad de la composición química de los aceites esenciales se debe a las condiciones climáticas, estacionales, geográficas, al periodo de cosecha y la técnica de destilación, (Horváth *et al.*, 2002; Hudaib *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003), Copolovici (2005) reporta que los isoprenos protegen las hojas del stress calorico. Además de la etapa fenológica de la planta en el momento del corte, en cambio Bode y Muller (2007) y Viljoen, et al (2001), reportan que las variaciones se deben a diferentes quimiotipos de la planta. Estas diferencias son de importancia en el estudio de las actividades biológicas y farmacológicas de estos productos, por lo cual se requieren más estudios para su plena comprensión.

En lo que respecta a la actividad antibacteriana, la comparación de los datos que se obtuvieron en este estudio con los resultados publicados es problemática debido a la variabilidad de los compuestos presentes en los aceites, el método de obtención, la parte de la planta de que se obtuvo el aceite y a los métodos usados para la evaluación de la actividad antibacteriana (Bode y Muller, 2003).

Cuadro 8. Contenido de carvacrol en aceites esenciales

Especie	Origen	Contenido %	Fuente
<i>Lippia graveolens</i>	México	72 - 95.86	Presente estudio
<i>Lippia graveolens</i>	Guatemala	0.2- 44	(Salgueiro, <i>et al</i> 2003a)
<i>Origanum virens</i>	Portugal	68.1	(Salgueiro, <i>et al</i> 2003b)
<i>Lippia chevalieri</i>	Burkina Faso	4.0	(Baranauskiene <i>et al.</i> , 2003)
<i>Syrian oreganum</i>	Turquía	26.97	(Alma, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Thymus vulgaris L.</i>	Croacia	3.9	(Faleiro <i>et al.</i> , 2003)
<i>Thymus eigii</i>	Turquía	26.1	(Tepe <i>et al.</i> , 2004)
<i>Thymus pectinatus</i> Fisch. <i>et Mey. Var. pectinatus</i>	Turquía	1.0- 10.9	(Perez-Galindo <i>et al.</i> , 2000; Jerkovic <i>et al.</i> , 2001)
<i>Lippia sidoides</i>	Turquía.	1.81	(Faleiro <i>et al.</i> , 2003)

El aceite esencial de *L. graveolens* mostró una alta actividad contra todas las bacterias utilizadas en este estudio, en especial para las Gram-positivas, como *S. aureus*, que fue la más sensible a este aceite. Al comparar las CMI con los obtenidos por Salgueiro (2003), con *L. graveolens*, estas fueron menores. La coincidencia con este estudio y otros, fue en la baja sensibilidad mostrada por la bacteria *P. aeruginosa* (Bassole *et al.*, 2003; Tepe *et al.*, 2004; Segvic Klaric *et al.*, 2007).

Los extractos de *T. vulgaris*, mostraron alta actividad contra las bacterias usadas, pero menor a la obtenida para *L. graveolens*. Lo cual no está de acuerdo a lo reportado por Tepe (2003). Se conoce que sus componentes principales, el timol y el carvacrol respectivamente, son agentes bactericidas o bacteriostáticos (Hammer *et al.*, 1999; Salgueiro *et al.*, 2003; Vardar-Unlu *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2006), por lo que es probable que los altos niveles de

actividad antibacteriana de los aceites esenciales evaluados se deba a las elevadas concentraciones de estos componentes (Lambert *et al.*, 2001; Kalemba *et al.*, 2003; Tepe *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2005).

El carvacrol es el componente de los aceites esenciales que presenta mayor actividad antimicrobiana (Ultee *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002; Bagamboula *et al.*, 2004; Burt, 2004; Nostro *et al.*, 2004; Kisko y Roller, 2005; Knowles *et al.*, 2005; Mahmoud *et al.*, 2006; Veldhuizen *et al.*, 2006). Los resultados del presente estudio muestran que a mayor concentración de carvacrol en el aceite esencial, se requiere menor concentración de éste para inhibir el crecimiento bacteriano.

Las bacterias Gram-positivas mostraron mayor sensibilidad a los aceites esenciales probados que las bacterias Gram-negativas, lo que concuerda con lo reportado por (Ultee *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002; Kunle *et al.*, 2003), y sugieren que la membrana exterior que rodea la pared celular de las bacterias Gram-negativas restringe la distribución de los compuestos hidrófobos (Schwämmle *et al.*, 2001).

Puede esperarse que la actividad inherente de un aceite esté relacionada a la composición química de los componentes, las proporciones en las que ellos están presentes y a las interacciones entre ellos (Pol *et al.*, 2001). Un efecto aditivo se observa cuando el efecto combinado es igual a la suma de los efectos individuales. El efecto antagonista se observa cuando el efecto de varios compuestos es menos que cuando se aplican individualmente. El sinergismo se observa cuando el efecto de las sustancias combinadas es mayor que la suma de los efectos individuales (Periago *et al.*, 2001). Varios autores apoyan la idea

de que existe un efecto sinérgico entre el carvacrol y su precursor biológico el ρ -cimeno al actuar en *B. cereus*. El ρ -cimeno aparece con una acción antimicrobiana muy débil, pero hincha la membrana de la célula bacteriana a una magnitud mayor que el carvacrol, lo cual probablemente permite el transporte del carvacrol más fácilmente a el interior de la célula y provoca la muerte bacteriana (Lambert *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan estos resultados, dado que el efecto del aceite con carvacrol y ρ -cimeno, presentó mayor efectividad que el que mostró el que contenía mayormente carvacrol.

La posibilidad de utilizar en forma extensa ambos aceites para infecciones bacterianas requiere que se continúe con pruebas *in vitro* para otros grupos bacterianos y de hongos, así como con pruebas *in vivo* para las bacterias que presentaron susceptibilidad en la pruebas *in vitro*. Son necesarios también, más estudios que permitan identificar la farmacodinamia y la farmacocinética de este recurso natural, así como para identificar mecanismo molecular de acción de los componentes de los aceites esenciales.

En conclusión, este estudio revela que el aceite esencial de *L. graveolens* del Barrial de Guadalupe Municipio, de Torreón, Coahuila, tiene el contenido más alto de carvacrol reportado para la especie y para otras que contienen este compuesto. El aceite de *T. vulgaris* presentó el más alto contenido de timol. Los valores de CMI son menores para los aceites de *L. graveolens* especialmente para las bacterias Gram-positivas, las que mostraron mayor sensibilidad. Estos resultados confirman la posibilidad de usar los aceites

esenciales o algunos de sus componentes como antibacterianos, y apoyan la valoración médica de su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas. Así mismo apoya el uso de estas plantas en la medicina tradicional.

LITERATURA CITADA EN LA SECCIÓN DE DISCUSIÓN GENERAL

- .Abe, F., T. Nagao y H. Okabe (2002). "Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*." Biol Pharm Bull 25(7): 920-2.
- Aharoni, A., A. P. Giri, S. Deuerlein, F. Griepink, W. J. de Kogel, F. W. Verstappen, H. A. Verhoeven, M. A. Jongsma, W. Schwab y H. J. Bouwmeester (2003). "Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants." Plant Cell 15(12): 2866-84.
- Al-Burtamani, S. K., M. O. Fatope, R. G. Marwah, A. K. Onifade y S. H. Al-Saidi (2005). "Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman." J Ethnopharmacol 96(1-2): 107-12.
- Alma, M. H., A. Mavi, A. Yildirim, M. Digrak y T. Hirata (2003). "Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey." Biol Pharm Bull 26(12): 1725-9.
- Andrews, J. M. (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations." J Antimicrob Chemother 48 Suppl 1: 5-16.
- Bagamboula, C., M. Uyttendaele y J. Debevere (2004). "Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*." Food Microbiology 21: 33-42.
- Baranauskiene, R., P. R. Venskutonis, P. Viskelis y E. Dambrauskiene (2003). "Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*)." J Agric Food Chem 51(26): 7751-8.
- Basile, A., F. Senatore, R. Gargano, S. Sorbo, M. Del Pezzo, A. Lavitola, A. Ritieni, M. Bruno, D. Spatuzzi, D. Rigano y M. L. Vuotto (2006). "Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils." J Ethnopharmacol.
- Bassole, I. H., A. S. Ouattara, R. Nebie, C. A. Ouattara, Z. I. Kabore y S. A. Traore (2003). "Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso." Phytochemistry 62(2): 209-212.
- Bergonzelli, G. E., D. Donnicola, N. Porta y I. E. Corthesy-Theulaz (2003). "Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection." Antimicrob Agents Chemother 47(10): 3240-6.
- Bode, H. B. y R. Muller (2003). "Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites." Plant Physiol 132(3): 1153-61.

- Bohlmann, J., J. Crock, R. Jetter y R. Croteau (1998). "Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*)." Proc Natl Acad Sci U S A 95(12): 6756-61.
- Bohlmann, J., C. L. Steele y R. Croteau (1997). "Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase." J Biol Chem 272(35): 21784-92.
- Bouchra, C., M. Achouri, L. M. Idrissi Hassani y M. Hmamouchi (2003). "Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan *Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers: Fr." J Ethnopharmacol 89(1): 165-9.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review." Int J Food Microbiol 94(3): 223-53.
- Canales, M., T. Hernandez, J. Caballero, A. Romo de Vivar, G. Avila, A. Duran y R. Lira (2005). "Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico." J Ethnopharmacol 97(3): 429-39.
- Carvalho, A. F., V. M. Melo, A. A. Craveiro, M. I. Machado, M. B. Bantim y E. F. Rabelo (2003). "Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* linn." Mem Inst Oswaldo Cruz 98(4): 569-71.
- Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, J. Totte, L. Pieters y A. J. Vlietinck (2002). "Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo." J Ethnopharmacol 79(2): 213-20.
- Correll, D. S. y M. C. Johnston (1979). Manual of the vascular plants of Texas. Austin, Texas., University of Texas printing Division.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev 12(4): 564-82.
- Cox, S. D., C. M. Mann, J. L. Markham, H. C. Bell, J. E. Gustafson, J. R. Warmington y S. G. Wyllie (2000). "The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)." J Appl Microbiol 88(1): 170-5.
- De Logu, A., G. Loy, M. L. Pellerano, L. Bonsignore y M. L. Schivo (2000). "Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil." Antiviral Res 48(3): 177-85.
- Dharmagadda, V. S., S. N. Naik, P. K. Mittal y P. Vasudevan (2005). "Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species." Bioresour Technol 96(11): 1235-40.

- Dorman, H. J. y S. G. Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." J Appl Microbiol 88(2): 308-16.
- Dudareva, N., E. Pichersky y J. Gershenzon (2004). "Biochemistry of plant volatiles." Plant Physiol 135(4): 1893-902.
- Duru, M. E., M. Ozturk, A. Ugur y O. Ceylan (2004). "The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey." J Ethnopharmacol 94(1): 43-8.
- Erazo, S., C. Delporte, R. Negrete, R. Garcia, M. Zaldivar, G. Iturra, E. Caballero, J. L. Lopez y N. Backhouse (2006). "Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*." J Ethnopharmacol 107(3): 395-400.
- Faleiro, M. L., M. G. Miguel, F. Ladeiro, F. Venancio, R. Tavares, J. C. Brito, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso y L. G. Pedro (2003). "Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*." Lett Appl Microbiol 36(1): 35-40.
- Font Quer, P. (1979). Diccionario de Botánica. Barcelona, España, Editorial Labor.
- Girao, V. C., D. C. Nunes-Pinheiro, S. M. Morais, J. L. Sequeira y M. A. Gioso (2003). "A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease." Prev Vet Med 59(1-2): 95-102.
- Gulluce, M., M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal, M. Polissiou, A. Sokmen y F. Sahin (2003). "In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L." J Agric Food Chem 51(14): 3958-65.
- Gustafson, J. E., Y. C. Liew, S. Chew, J. Markham, H. C. Bell, S. G. Wyllie y J. R. Warmington (1998). "Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*." Lett Appl Microbiol 26(3): 194-8.
- Gutierrez-Alcala, G., C. Gotor, A. J. Meyer, M. Fricker, J. M. Vega y L. C. Romero (2000). "Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis trichome* cells." Proc Natl Acad Sci U S A 97(20): 11108-13.
- Hammer, K. A., C. F. Carson y T. V. Riley (1998). "In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida spp.*" J Antimicrob Chemother 42(5): 591-5.
- Hammer, K. A., C. F. Carson y T. V. Riley (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts." J Appl Microbiol 86(6): 985-90.
- Hanbali, F. E., M. Akssira, A. Ezoubeiri, C. E. Gadhi, F. Mellouki, A. Benherraaf, A. M. Blazquez y H. Boira (2005). "Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L." J Ethnopharmacol 99(3): 399-401.

- Hernandez, T., M. Canales, J. G. Avila, A. Duran, J. Caballero, A. Romo de Vivar y R. Lira (2003). "Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (Mexico)." J Ethnopharmacol 88(2-3): 181-8.
- Hernandez, T., M. Canales, J. G. Avila, A. M. Garcia, A. Martinez, J. Caballero, A. R. de Vivar y R. Lira (2005). "Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae)." J Ethnopharmacol 96(3): 551-4.
- Horváth, G., B. Kocsis, L. Botz, J. Németh y L. Szabó (2002). "Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography." Acta Biologica Szegediensis 46(3-4): 145-146.
- Hudaib, M., E. Speroni, A. M. Di Pietra y V. Cavrini (2002). "GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle." J Pharm Biomed Anal 29(4): 691-700.
- Iacobellis, N. S., P. Lo Cantore, F. Capasso y F. Senatore (2005). "Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils." J Agric Food Chem 53(1): 57-61.
- Inouye, S., T. Takizawa y H. Yamaguchi (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact." J Antimicrob Chemother 47(5): 565-73.
- Janahmadi, M., F. Niazi, S. Danyali y M. Kamalinejad (2006). "Effects of the fruit essential oil of *Cuminum cyminum* Linn. (Apiaceae) on pentylenetetrazol-induced epileptiform activity in F1 neurones of *Helix aspersa*." J Ethnopharmacol 104(1-2): 278-82.
- Jerkovic, I., J. Mastelic y M. Milosĭ (2001). "The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia." International Journal of Food Science and Technology 36: 649-654.
- Kalembe, D. y A. Kunicka (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." Curr Med Chem 10(10): 813-29.
- Karaman, S., M. Digrak, U. Ravid y A. Ilcim (2001). "Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey." J Ethnopharmacol 76(2): 183-6.
- Katsura, H., R. I. Tsukiyama, A. Suzuki y M. Kobayashi (2001). "In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms." Antimicrob Agents Chemother 45(11): 3009-13.
- Kisko, G. y S. Roller (2005). "Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice." BMC Microbiol 5(1): 36.
- Knowles, J. R., S. Roller, D. B. Murray y A. S. Naidu (2005). "Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development

- by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Appl Environ Microbiol 71(2): 797-803.
- Kolb, D. y M. Muller (2004). "Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products." Ann Bot (Lond) 94(4): 515-26.
- Kunle, O., J. Okogun, E. Egamana, E. Emojevwe y M. Shok (2003). "Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract." Phytomedicine 10(1): 59-61.
- Lahlou, M. (2004). "Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils." Phytother Res 18(6): 435-48.
- Lambert, R. J. y J. Pearson (2000). "Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values." J Appl Microbiol 88(5): 784-90.
- Lambert, R. J., P. N. Skandamis, P. J. Coote y G. J. Nychas (2001). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol." J Appl Microbiol 91(3): 453-62.
- Lange, B. M., M. R. Wildung, E. J. Stauber, C. Sanchez, D. Pouchnik y R. B. Croteau (2000). "Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes." Proc Natl Acad Sci U S A 97(6): 2934-9.
- Lemay, M. J., J. Choquette, P. J. Delaquis, G. Claude, N. Rodrigue y L. Saucier (2002). "Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model." Int J Food Microbiol 78(3): 217-26.
- Lennette, E. H., A. Balows, W. J. Hausler y J. P. Truant (1982). Manual de microbiología clínica. Buenos Aires, Argentina.
- Lopez-Malo, A., S. M. Alzamora y E. Palou (2005). "*Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds." Int J Food Microbiol 73(2-3): 213-8.
- Magwa, M. L., M. Gundidza, N. Gweru y G. Humphrey (2006). "Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*." J Ethnopharmacol 103(1): 85-9.
- Mahmoud, B. S., K. Yamazaki, K. Miyashita, Y. Kawai, I. S. Shin y T. Suzuki (2006). "Preservative effect of combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during convectional air-drying." Int J Food Microbiol 106(3): 331-7.
- Maksimovic, Z. A., S. Dordevic y M. Mraovic (2005). "Antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* essential oil." Fitoterapia 76(1): 112-4.
- Mann, C. M. y J. L. Markham (1998). "A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils." J Appl Microbiol 84(4): 538-44.

- Marino, M., C. Bersani y G. Comi (2001). "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*." Int J Food Microbiol 67(3): 187-95.
- Martin, W. W. y C. R. Hutchins (1980). A flora of New México, Cramer: Verlag Komman Gantaer diutgesellschaf.
- McGarvey, D. J. y R. Croteau (1995). "Terpenoid metabolism." Plant Cell 7(7): 1015-26.
- Milos, M., J. Mastelic y I. Jerkovic (2000). "Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*)." Food Chemistry 71: 79-83.
- Minami, M., M. Kita, T. Nakaya, T. Yamamoto, H. Kuriyama y J. Imanishi (2003). "The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro." Microbiol Immunol 47(9): 681-4.
- Mitscher, L. A., S. Drake, S. R. Gollapudi y S. K. Okwute (1987). "A modern look at folkloric use of anti-infective agents." J Nat Prod 50(6): 1025-40.
- Monteiro, M. V., A. K. de Melo Leite, L. M. Bertini, S. M. de Moraes y D. C. Nunes-Pinheiro (2006). "Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves." J Ethnopharmacol 111(2): 378-82.
- Muhlbauer, R. C., A. Lozano, S. Palacio, A. Reinli y R. Felix (2003). "Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism." Bone 32(4): 372-80.
- Navarro, V., M. L. Villarreal, G. Rojas y X. Lozoya (1996). "Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases." J Ethnopharmacol 53(3): 143-7.
- NCCLS (2005). "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Fourth Edition. National Committee Clinical Laboratory Standards." Approved Standard M7-A4.
- Nelson, R. R. S. (2003). "In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." J Antimicrob Chemother 40: 305-6.
- Niu, C. y E. S. Gilbert (2004). "Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure." Appl Environ Microbiol 70(12): 6951-6.
- Nostro, A., A. R. Blanco, M. A. Cannatelli, V. Enea, G. Flamini, I. Morelli, A. Sudano Roccaro y V. Alonzo (2004). "Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol." FEMS Microbiol Lett 230(2): 191-5.
- Ohno, T., M. Kita, Y. Yamaoka, S. Imamura, T. Yamamoto, S. Mitsufuji, T. Kodama, K. Kashima y J. Imanishi (2003). "Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*." Helicobacter 8(3): 207-15.

- Oladimeji, F. A., O. O. Orafidiya, T. A. Ogunniyi y T. A. Adewunmi (2000). "Pediculocidal and scabidical properties of *Lippia multiflora* essential oil." J Ethnopharmacol 72(1-2): 305-11.
- Opalchenova, G. y D. Obreshkova (2003). "Comparative studies on the activity of basil--an essential oil from *Ocimum basilicum* L.--against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods." J Microbiol Methods 54(1): 105-10.
- Ozturk, S. y S. Ercisli (2006). "The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge." J Ethnopharmacol 106(3): 372-6.
- Pascual, M. E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sanchez Mata y A. Villar (2001). "*Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review." J Ethnopharmacol 76(3): 201-14.
- Perez-Galindo, J. A., J. Lopez-Miranda y I. R. Martinez-Dominguez (2000). "Geometric and Reynolds number effects on oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil extraction." J Food Eng 44: 127-33.
- Perez, S., M. Meckes, C. Perez, A. Susunaga y M. A. Zavala (2005). "Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*." J Ethnopharmacol 102(1): 1-4.
- Periago, P. M. y R. Moezelaar (2001). "Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*." Int J Food Microbiol 68(1-2): 141-8.
- Pol, I. E., W. G. van Arendonk, H. C. Mastwijk, J. Krommer, E. J. Smid y R. Moezelaar (2001). "Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment." Appl Environ Microbiol 67(4): 1693-9.
- Ponce-Macotela, M., Y. Rufino-Gonzalez, A. Gonzalez-Maciel, R. Reynoso-Robles y M. N. Martinez-Gordillo (2006). "Oregano (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage." Parasitol Res 98(6): 557-60.
- Pultrini Ade, M., L. A. Galindo y M. Costa (2006). "Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice." Life Sci 78(15): 1720-5.
- Ranger, C. M., R. E. Winter, G. E. Rottinghaus, E. A. Backus y D. W. Johnson (2005). "Mass spectral characterization of fatty acid amides from alfalfa trichomes and their deterrence against the potato leafhopper." Phytochemistry 66(5): 529-41.
- Rastrelli, L., A. Caceres, C. Morales, F. De Simone y R. Aquino (1998). "Iridoids from *Lippia graveolens*." Phytochemistry 49(6): 1829-1832.
- Ricci, D., D. Fraternali, L. Giamperi, A. Bucchini, F. Epifano, G. Burini y M. Curini (2005). "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant

- activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae)." J Ethnopharmacol 98(1-2): 195-200.
- Rios, J. L. y M. C. Recio (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." J Ethnopharmacol 100(1-2): 80-4.
- Robledo, S., E. Osorio, D. Munoz, L. M. Jaramillo, A. Restrepo, G. Arango y I. Velez (2005). "In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives." Antimicrob Agents Chemother 49(4): 1652-5.
- Rosa-Putra, S., R. Nalin, A. M. Domenach y M. Rohmer (2001). "Novel hopanoids from *Frankia spp.* and related soil bacteria. Squalene cyclization and significance of geological biomarkers revisited." Eur J Biochem 268(15): 4300-6.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves y A. P. da Cunha (2003). "Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala." Planta Med 69(1): 80-83.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves y A. P. da Cunha (2003). "Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala." Planta Medica 69(1): 80-83.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, E. Pinto, C. Pina-Vaz, A. G. Rodrigues, A. Palmeira, C. Tavares, S. Costa-de-Oliveira, M. J. Goncalves y J. Martinez-de-Oliveira (2003). "Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species." Planta Med 69(9): 871-4.
- Schellmann, S. y M. Hulskamp (2005). "Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a model system." Int J Dev Biol 49(5-6): 579-84.
- Schiestl, F. P., M. Ayasse, H. F. Paulus, C. Lofstedt, B. S. Hansson, F. Ibarra y W. Francke (2000). "Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception." J Comp Physiol [A] 186(6): 567-74.
- Schnitzler, P., K. Schon y J. Reichling (2001). "Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture." Pharmazie 56(4): 343-7.
- Schulz, H., B. Schrader, R. Quilitzsch, S. Pfeffer y H. Kruger (2003). "Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy methods." J Agric Food Chem 51(9): 2475-81.
- Schwab, B., U. Folkers, H. Ilgenfritz y M. Hulskamp (2000). "Trichome morphogenesis in *Arabidopsis*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355(1399): 879-83.
- Schwämmle, B., E. Winkelhausen, S. Kuzmanova y W. Steiner (2001). "Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms." Food Technol. Biotechnol. 39(4): 341-345.

- Segvic Klaric, M., I. Kosalec, J. Mastelic, E. Pieckova y S. Pepeljnak (2007). "Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings." Lett Appl Microbiol 44(1): 36-42.
- Sertie, J. A., R. G. Woisky, G. Wiesel y M. Rodrigues (2005). "Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract." Phytomedicine 12(5): 338-44.
- Shin, S. y S. Lim (2004). "Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton spp.*" J Appl Microbiol 97(6): 1289-96.
- Shunying, Z., Y. Yang, Y. Huaidong, Y. Yue y Z. Guolin (2005). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*." J Ethnopharmacol 96(1-2): 151-8.
- Silva, J., W. Abebe, S. M. Sousa, V. G. Duarte, M. I. Machado y F. J. Matos (2003). "Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*." J Ethnopharmacol 89(2-3): 277-83.
- Sirisoma, N. S., K. M. Hold y J. E. Casida (2001). "alpha- and beta-Thujones (herbal medicines and food additives): synthesis and analysis of hydroxy and dehydro metabolites." J Agric Food Chem 49(4): 1915-21.
- Stashenko, E. E., B. E. Jaramillo y J. R. Martinez (2004). "Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography." J Chromatogr A 1025(1): 105-13.
- Stashenko, E. E., B. E. Jaramillo y J. R. Martinez (2004). "Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity." J Chromatogr A 1025(1): 93-103.
- Steele, C. L., J. Crock, J. Bohlmann y R. Croteau (1998). "Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase." J Biol Chem 273(4): 2078-89.
- Szentandrassy, N., P. Szentesi, J. Magyar, P. P. Nanasi y L. Csernoch (2003). "Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle." BMC Pharmacol 3(1): 9.
- Tadeg, H., E. Mohammed, K. Asres y T. Gebre-Mariam (2005). "Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders." J Ethnopharmacol 100(1-2): 168-75.
- Takeuchi, H., Z. G. Lu y T. Fujita (2004). "New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.)." Biosci Biotechnol Biochem 68(5): 1131-4.

- Tepe, B., D. Daferera, M. Sokmen, M. Polissiou y A. Sokmen (2004). "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis." J Agric Food Chem 52(5): 1132-7.
- Tognolini, M., E. Barocelli, V. Ballabeni, R. Bruni, A. Bianchi, M. Chiavarini y M. Impicciatore (2006). "Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity." Life Sci 78(13): 1419-32.
- Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti y G. Bisignano (2005). "Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes." Antimicrob Agents Chemother 49(6): 2474-8.
- Ultee, A., M. H. Bennik y R. Moezelaar (2002). "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 68(4): 1561-8.
- Ultee, A., E. P. Kets y E. J. Smid (1999). "Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Appl Environ Microbiol 65(10): 4606-10.
- Ultee, A. y E. J. Smid (2001). "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*." Int J Food Microbiol 64(3): 373-8.
- Uzel, A., A. Guvensen y E. Cetin (2004). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopada* O. Schwarz from Turkey." J Ethnopharmacol 95(2-3): 151-4.
- Valentao, P., P. B. Andrade, F. Areias, F. Ferreres y R. M. Seabra (1999). "Analysis of vervain flavonoids by HPLC/Diode array detector method. Its application to quality control." J Agric Food Chem 47(11): 4579-82.
- Valentao, P., E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra y M. de Lourdes Basto (2002). "Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid." Biol Pharm Bull 25(10): 1324-7.
- Valero, M. y M. C. Salmeron (2003). "Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth." Int J Food Microbiol 85(1-2): 73-81.
- Valkama, E., J. P. Salminen, J. Koricheva y K. Pihlaja (2003). "Comparative analysis of leaf trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish birch species." Ann Bot (Lond) 91(6): 643-55.
- Vardar-Unlu, G., F. Candan, A. Sokmen, D. Daferera, M. Polissiou, M. Sokmen, E. Donmez y B. Tepe (2003). "Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae)." J Agric Food Chem 51(1): 63-7.

- Veldhuizen, E. J., J. L. Tjeerdsma-van Bokhoven, C. Zweijtzer, S. A. Burt y H. P. Haagsman (2006). "Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol." J Agric Food Chem 54(5): 1874-9.
- Viljoen, A. M., S. Subramoney, S. F. van Vuuren, K. H. Baser y B. Demirci (2005). "The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (*Verbenaceae*) leaf essential oils." J Ethnopharmacol 96(1-2): 271-7.
- Wagner, G. J., E. Wang y R. W. Shepherd (2004). "New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome." Ann Bot (Lond) 93(1): 3-11.
- Yadegarinia, D., L. Gachkar, M. B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. A. Astaneh y I. Rasooli (2006). "Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils." Phytochemistry 67(12): 1249-55.
- Yang, N. S., L. F. Shyur, C. H. Chen, S. Y. Wang y C. M. Tzeng (2004). "Medicinal herb extract and a single-compound drug confer similar complex pharmacogenomic activities in mcf-7 cells." J Biomed Sci 11(3): 418-22.
- Yayli, N., A. Yasar, C. Gulec, A. Usta, S. Kolayli, K. Coskuncelebi y S. Karaoglu (2005). "Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*." Phytochemistry 66(14): 1741-5.
- Yu, J., J. Lei, H. Yu, X. Cai y G. Zou (2004). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*." Phytochemistry 65(7): 881-4.

Apéndice 1

Oficios de recepción de las publicaciones a las revistas



Dirección de Investigación y Posgrado
Secretaría de Servicios Académicos
ciencia.cda@ujaat.mx
Teléfono/fax 01.993.3127210

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



Villahermosa, Tabasco. 22 de agosto de 2006.

Autor (es): G Hernández-Zamudio, JL Corona-Medina, MY Mendoza-Ramos, MR González-Martínez, SE Alonzo-Rojo

Tengo el agrado de comunicar que recibimos copia electrónica del manuscrito:

273UC Actividad antibacteriana *in vitro* de los aceites esenciales de *Lippia graveolens*

H.B.K. y *Thymus vulgaris* L.

Agradecemos el envío del manuscrito para su posible publicación. Reciba un saludo respetuoso.



Atentamente



Dr. Juan Barajas Fernández
Editor

c.p. archivo



Agraria

Nueva Época

Tel. (844) 411-02-80; (844) 411-02-12; Fax (844) 411-02-11 agraria_ne@uaaan.mx

Órgano de Difusión Científica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Folio 61

FECHA: 20 de marzo de 2006

ACUSE DE RECIBO

RECIBÍ DE LA C. Genoveva Hernández Zamudio


EL SIGUIENTE TRABAJO PARA SU POSIBLE PUBLICACIÓN EN LA REVISTA AGRARIA NUEVA EPOCA:

"Actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.)"

Cuyos autores son: Genoveva Hernández Zamudio, Margarita Guerrero Rodríguez, Rafael Rodríguez Martínez y Sara Elisa Alonzo Rojo

MISMO QUE SERÁ SOMETIDO AL PROCESO DE ARBITRAJE.

RECIBI


Dr. Jesús Valdés Reyna
Editor Ejecutivo
Revista *Agraria* Nueva Época

C.c.p Dr. Miguel Ángel Capó Arteaga. Editor en Jefe Revista *Agraria* N.E.



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Dirección de Investigación
Buenavista, Saltillo, Coah., México. C. P. 25315: www.uaaan.mx