

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA DIVISIÓN DE CARRERAS

AGRONÓMICAS



COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

{Lippia graveolens H.B.K.) EN Candida spp. in vitro.

POR

EMANUEL RIVAS ROBLES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO

DE:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA DIVISIÓN DE CARRERAS

AGRONÓMICAS

TESIS QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO

DE:

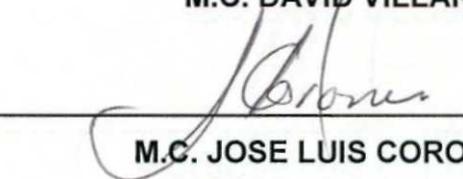
INGENIERO EN AGROECOLOGÍA


M.C. GENOVEVA HERNÁNDEZ ZAMUDIO

ASESOR PRINCIPAL


M.C. DAVID VILLAREAL REYES

ASESOR


M.C. JOSE LUIS CORONA MEDINA

ASESOR

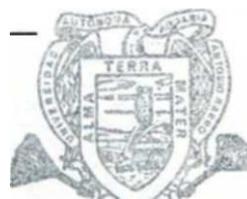
ASESOR

M.C. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Margarita Yolanda

M.C. VICTOR MARTÍNEZ CUETO



DICIEMBRE 2007

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO

Coordinación de la División
de Carreras Agronómicas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Unidad Laguna por permitirme realizar mis estudios de licenciatura.

A la M.C. Maricela del Rocío González Martínez, a la M.C. Genoveva Hernández Zamudio, al M.C. José Luís Corona Medina, a la M.C. Margarita Yolanda Mendoza Ramos y al M.C. David Villareal Reyes a quienes agradezco su invaluable apoyo y dedicación para la realización de este trabajo.

A mis maestros Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos, al Dr. Agustín Cabral Martell, y al M.C. José Villareal Reyes por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis amigos: Javier Macias López, Alfonso de Jesús Zuarth Salas, Francisco Javier Gutiérrez Figueroa, Ángel Alfredo Nava Joachin, Samuel Farias Olivera, Abel Hernández Trinidad, Elba Pastrana Ortiz, Zabdi Rodríguez Olivera, Nurian Isabel Briceño Díaz, Teresa Castro García, Artemio Ovando, Álvarez, Jesús Hernández Ruiz, y Abelardo Hilerio Cruz.

Al departamento del laboratorio de análisis clínico del Centro Médico Nacional del Noreste Unidad Médica de Alta Especialidad No. 71 integrado por: Q.F.B. Gabriela Romero, María del Lourdes Castillo García, Diana Martínez González, Rosa María Esparza Contreras, Laura Angélica Rodríguez Morales, Yazmín del Carmen Armas García y Lydia Zíntike Ramírez Robledo.

DEDICATORIA

A mis padres **Soledad Robles Vázquez** y José Manuel Rivas Hernández por sus consejos y su apoyo incondicional.

A mis abuelos Hortensia Vázquez de los Santos, Adelfo Robles Cruz, Crecencia Hernández Rosario y Victoriano Rivas Hilario f-

A mis tíos Luis Adelfo Robles Vázquez, Lucio Robles Vázquez, Irma Robles Vázquez, Emelia Robles Vázquez y Manuela Robles Vázquez.

A mis hermanos Jorge Alberto, Norma Elica y Laura Nayeli.

A mi Alma Terra Mater por permitirme realizar un logro importante en mi vida.

INDICE GENERAL

PRESENTACIÓN.....	I
APROBACIÓN.....	II
JURADO	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA	V
INDICE GENERAL.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
INDICE DE CUADROS.....	IX
RESUMEN	X
I.-INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	5
III.REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
3.1 Historia de los aceites esenciales	6
3.2 Plantas medicinales en México	7
3.3 Familia Verbenaceae.....	8
3.4 Usos tradicionales de <i>Lippia spp.</i>	8
3.5 Clasificación taxonómica de <i>Lippia graveolens</i> HBK	10
3.6 Distribución de <i>Lippia graveolens</i> HBK.....	10
3.7 Aceites esenciales.....	11
3.8 Tricomas	12
3.9 Componentes de los aceites esenciales	13
3.9.1 Principales componentes de los aceites esenciales del género <i>Lippia</i>	14
3.10 Rutas metabólicas de origen de los componentes volátiles de los aceites esenciales	16
3.11 Mecanismo de acción de los aceites esenciales	18
3.12 Susceptibilidad de los microorganismos a los aceites esenciales	19
3.13 Actividad fungicida de los aceites esenciales.....	21

3.14 <i>Candida spp</i>	22
3.14.1 Clasificación taxonómica de <i>Candida spp</i>	25
3.14.2 Distribución, habitat y fuente de infección de <i>Candida spp</i>	26
3.14.3 Importancia de <i>Candida spp</i>	26
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1 Aceite esencial	27
4.2 Caracterización del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> H.B.K	27
4.3 Cepas	28
4.4 Preparación del inóculo.....	28
4.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	28
V.- RESULTADOS	30
5.1 Caracterización del aceite esencial	30
VI.- DISCUSIÓN.....	35
6.1 Caracterización del aceite esencial.....	35
6.1.2 MCI del aceite esencial de <i>L. graveolens</i>	37
VII CONCLUSIÓN.....	39
VIII REFERENCIAS	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de un tricoma glandular peltado de una hoja de menta.....	12
Figura 2. Estructura química de los principales componentes en el orégano... 15	
Figura 3. Estructura del isopreno.....	17
Figura 4. Cepas nativas de <i>Candida spp</i>	34
Figura 5. CMI del aceite esencial de orégano <i>L. graveolens</i> HBK en <i>Candida spp</i>	34

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de terpenos. Adaptado de Wallach	18
Cuadro 2. Principales componentes del aceite esencial de <i>L. graveolens</i> HBK	30
Cuadro 3. CMI del aceite esencial de (<i>L. graveolens</i> HBK) en <i>C. albicans</i> ... 31	
Cuadro 4. CMI del aceite esencial de (<i>L. graveolens</i> HBK) en <i>C. krusei</i>	32
Cuadro 5. CMI del aceite esencial de (<i>L. graveolens</i> HBK) en <i>C. tropicalis</i>	32
Cuadro 6. CMI del aceite esencial de orégano (<i>L. graveolens</i> HBK) en <i>C.</i> <i>parapsilopsis</i>	33
Cuadro 7. CMI del aceite esencial de (<i>L. graveolens</i> HBK) en <i>C. glabrata</i>	33
Cuadro 8. CMI del aceite esencial de (<i>L. graveolens</i> HBK) en <i>C.</i> <i>zeylanoides</i>	33

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron la caracterización y evaluación de la actividad fúngica del aceite esencial de orégano [*Lippia graveolens* HBK) obtenido en el ejido el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón; Coahuila, México con especies del genero *Candida*. La determinación de los componentes del aceite se realizo por el método de cromatografía de gas. Para la evaluación de la actividad fúngica se determino la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), por el método de difusión, para ello se utilizaron un total 61 cepas de las cuales, 28 fueron de *C. albicans*, 12 de *Candida krusei*, 12 de *C. tropicalis*, 6 de *C. parapsilopsis*, 2 de *C. glabrata* y 1 *C. zeylanoide*, estas fueron aisladas de pacientes del laboratorio de análisis clínico del Centro Médico Nacional del Noreste Unidad Medica de Alta Especialidad No. 71 del IMSS e identificadas con CHROMagar. Posteriormente las cepas fueron preparadas en agua destilada estéril utilizando una suspensión de 5×10^6 ufe ml^{-1} ajustando la muestra con una cámara de Neubauer. Las cepas fueron sembradas en agar sabouraud 4% glucosa en cajas petri. Los discos de 6 mm de diámetro se prepararon con las diluciones de 0.50, 0.30, 0.25, 0.20 y 0.15 ul/ml^{-1} del aceite esencial. Utilizando tween 20 para reforzar solubilidad. Las cajas Petri fueron incubadas a 37 °C por 48 h. Los resultados obtenidos, muestran que las cepas fueron sensibles al aceite esencial en las 61 muestras colectadas, en las cuales 38 de total presentaron la (CMI) a 0.20 pl/ml^{-1} siendo el 62.2% del total de todas las muestras. Las cepas que presento mayor porcentaje en esta dilución fue *C. albicans*, seguida por *C. krusei*. Pero todas las especies muestran sensibilidad a esta concentración.

I.-INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos aceitosos obtenidos de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces) (Burt, 2004)

Los aceites esenciales cobran un amplio espectro de actividades. Producen efectos farmacológicos, demostrando propiedades antiinflamatoria y antioxidante (Karaman *et al.*, 2001).

El genero *Lippia* (*Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies se distribuyen principalmente a lo largo del Sur, países de Centro América y territorios de África Tropical (Pascual *et al.*, 2001).

L. graveolens se usa en la medicina tradicional como analgésico, antiinflamatorio, antipirético, sazónador culinario, remedio para diarrea, disentería, desordenes menstruales, antiespasmódico y tratamiento para enfermedades respiratorias (Pascual *et al.*, 2001).

Los principales componentes de los aceites esenciales de *L. graveolens* son:
Monoterpenos: p - pelandreno, carvacrol, 1, 8 cinoleno, p- cimeno, metil timol y timol.
Sesquiterpenos: a-humuleno, (3-cariopileno, (3-bisaboleno y aromadendreno (Pascual *et al.*, 2001).

La mayor actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de las hierbas y especias culinarias esta asociada a compuestos fenólicos. Compuestos purificados derivados de los aceites esenciales tales como carvacrol, eugenol, linalol y timol que inhiben una variedad de microorganismos (Bagamboula *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales son agentes biocidas contra un amplio rango de organismos tales como bacterias, hongos, virus, protozoarios insectos y planta (Karaman *et al.*, 2001).

El aceite esencial de orégano inhibe o retarda el crecimiento de varios organismos incluyendo especies de *Aspergillus*, *Hansenula*, *Trichophyton rubrum* y *C. albicans in vitro* así como *in vivo*, concluyendo que la administración oral diaria del aceite de orégano puede ser efectivo en la prevención y tratamiento de candidiasis (Manohar *et al.*, 2007).

El efecto antimicrobiano y fungicida *in vitro* de muchos aceite esenciales ha sido reportado. La actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales se ha establecido *in vitro* e *in vivo* (Chami *et al.*, 2004).

Los hongos son más sensibles que las bacterias a algunos aceites esenciales, ejemplo los dermatofitos son los más resistentes, aunque diversos aceites esenciales demuestran alta efectividad contra ellos. De entre 22 muestras de aceites esenciales de 11 especies *Cinnamomun*, el aceite de *C. suvabenium* fue el más activo contra *Microsporium canis*, *Trichophyton*

mentagrophytes, *T. rubrum* así como también algunas candidiasis (*C. albicans* y *C. glabrata*) (Kalemba and Kunicka, 2003).

Conforme a la literatura, la investigación de productos naturales en contra de *Candida* spp. se ha incrementado significativamente en los últimos 10 años, con la investigación de aproximadamente de 258 especies de plantas de 94 familias (Duarte *et al.*, 2005).

Las infecciones humanas, particularmente aquéllas que involucran la piel y mucosa superficial, constituyen un serio problema, especialmente en países tropicales y subtropicales, siendo los patógenos más frecuentes dermatofitos y *Candida* sp. (Portillo *et al.*, 2001).

C. albicans es una levadura que reside como comensal en las cavidades mucocutáneas de la piel, vagina e intestino de humanos, pudiendo causar infección bajo alteraciones fisiológicas y condiciones patológicas tales como diabetes, administración prolongada a un amplio espectro de antibióticos, quimioterapia y SIDA (Manohar *et al.*, 2007).

Diversos aceites esenciales muestran importante actividad fungicida contra levaduras, dematofitos y muestras de *Aspergillus* (Cavaleiro *et al.*, 2006).

El aceite esencial de *L. graveolens* de Guatemala tiene actividad en contra de bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como también levaduras y hongos filamentosos (Salgueiro *et al.*, 2003b).

Por lo mencionado anteriormente se puede pensar que el aceite esencial de orégano mexicano [*Lippia graveolens* H.B.K) obtenido del ejido el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila posee actividad fungicida en contra de las levaduras del género *Candida spp.*

HIPÓTESIS

Ho.- El aceite de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K) del ejido Barrial de Guadalupe Municipio de Torreón, Coahuila; México tiene efecto antimicótico, *in vitro*.

Ha.- El aceite de orégano (*L. graveolens* H.B.K) del ejido Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila; México no tiene efecto antimicótico, *in vitro*.

II.-OBJETIVOS

Caracterizar el aceite esencial de Orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) del ejido Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila; México.

Evaluar el efecto antimicótico del aceite esencial de Orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) del ejido Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón; Coahuila México *in vitro*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1.- Historia de los aceites esenciales

Aunque las especias han sido usadas en perfumería, las propiedades como sazonzadores y conservadores son conocidas desde la antigüedad, los egipcios usaron plantas aromáticas para embalsamar y frenar el crecimiento bacteriano y prevenir el decaimiento, un efecto atribuido a una gran magnitud de los aceites esenciales (Edris, 2007), únicamente el aceite de trementina fue mencionado por historiadores griegos y romanos. La destilación como un método de producción de aceites esenciales fue usada por primera vez en (Egipto, India y Persia) hace más de 2000 años y fue mejorado en el siglo IX por los árabes. El primer escrito autentico acerca de la destilación de aceite esencial es atribuido a Villanova (1235 - 1311 a.a), un médico Catalán. La primera medida experimental de la propiedad bactericida de los vapores de aceite esencial se publicó por De la Croix en 1881. Sin embargo, en el curso del siglo XIX y XX el uso de los aceites esenciales en medicina se volvió gradualmente secundario a su uso para sazonar y aromatizar (Burt, 2004).

Las propiedades farmacéuticas de las plantas aromáticas son particularmente atribuidas a los aceites esenciales. El término aceite esencial fue usado en sus inicios en el siglo XVI por Paracelsus von Hohenheim, quien nombró el componente eficaz de un medicamento .Para mediados del siglo XX el rol de los aceites esenciales se redujo al menos completamente para uso en perfumes, cosméticos y sazonador en alimentos, mientras sus usos en preparaciones farmacéuticas declinaron (Edris, 2007).

3.2 Plantas medicinales en México

México tiene una gran diversidad de plantas medicinales y un uso ancestral acerca de estas. Estimaciones actuales consideran que casi 3000 plantas medicinales son usadas en México (Canales *et al.*, 2005).

La medicina tradicional mexicana usa una gran variedad de plantas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, específicamente (diarreas infecciosas) una de las diez causas más importantes de muerte en áreas rurales. En México y muchos otros países, la medicina tradicional es la principal alternativa en el cuidado de la salud, porque muchos medicamentos para el tratamiento de infecciones gastrointestinales son caros o no están disponibles localmente, a más de que los microorganismos desarrollan resistencia a medicamentos (Hernández *et al.*, 2003).

Las plantas medicinales han sido usadas en países desarrollados como tratamientos alternativos para los problemas de salud (Duarte *et al.*, 2005).

Muchos extractos de plantas y aceites esenciales aislados de plantas han sido exhibidos por tener actividad biológica *in vitro* e *in vivo*, que justifica la investigación sobre la medicina tradicional enfocada en la caracterización de la actividad antimicrobiana de estas plantas. Brasil, Cuba, India, Jordania y México son ejemplo de países que tienen diversidad de flora y una rica tradición en el uso de plantas medicinales para ambas aplicaciones antibacterianas y antifúngicas respectivamente (Duarte *et al.*, 2005).

3.3 Familia *Verbenaceae*

El género *Lippia* (*Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y pequeños árboles (Pascual *et al.*, 2001). Muchas de las cuales son aromáticas y se encuentran principalmente en los trópicos de América y África (Combrinck *et al.*, 2007).

3.4 Usos tradicionales de *Lippia spp.*

Debido a sus propiedades antes mencionadas, desde la antigüedad hierbas y especias se agregan a los alimentos, no solo como sazonadores sino también como conservadores, los aceites esenciales cobran un amplio espectro de actividades. Varios son agentes biocidas contra un amplio rango de organismos tales como bacterias, hongos, virus, protozoarios, insectos y plantas (Kalembe y Kunicka, 2003).

Las plantas han sido tradicionalmente usadas en los tratamientos de infecciones fúngicas o problemas relacionados, lo cual podría ser un buen recurso por ser, seguro, biodegradable y renovable (Hamza *et al.*, 2006).

La mayoría de ellas son tradicionalmente usadas como remedios gastrointestinales y respiratorios, algunas especies de *Lippia* muestra actividad antimalarial, antiviral y citostático (Burt, 2004).

Además, las hojas de la mayoría de estas especies son usadas como sazonadoras para preparación de alimentos. En la mayoría de los casos, las partes usadas son hojas o partes aéreas y flores. Ellas se emplean comúnmente como una infusión administrada oralmente. El uso más común de las especies de *Lippia* es como analgésicos, antiinflamatorios, sedativos, remedios para diarreas, disenterías, tratamiento de enfermedades cutáneas, hepáticas, remedio para dolor de vesícula y desordenes menstruales, diurético, antihipertensivo, larvicida, repelentes, antimicrobiano, antiviral, molusquicida, antiespasmódico, tratamiento para sífilis y gonorrea, citostático, remedio para diabéticos, anticonvulsivos, avortificante, estimulante, anestésico local, por sus propiedades fungicidas, bactericidas y antisépticas (Pascual *et al.*, 2001).

L. graveolens tiene propiedad como analgésico, antiinflamatorio, antipirético, sazonador culinario, remedio para diarrea (Hernández *et al.*, 2003), dolor de pecho, abortificante, cólicos (Canales *et al.*, 2005).

Disentería, desordenes menstruales, antiespasmódico, tratamiento para enfermedades respiratorias (Navarro *et al.*, 1996; Rastrelli *et al.*, 1998; Salgueiro *et al.*, 2003a) remedio para diabetes, antioxidante (Phuektes *et al.*, 2001). *Lippia graveolens* H. B. K. {*Verbenaceae*) es una planta aromática ampliamente usada en la medicina tradicional de Centro América (Pascual *et al.*, 2001).

3.5 Clasificación taxonómica de *L. graveolens* H. B. K.

Reino: *Plantae* Subreino: *Tracheobionta*

Superdivisión: *Spermatophyta* División:

Magnoliophyta Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae* Orden: *Lamiales*

Familia: *Verbenaceae*

Género: *Lippia*

Especie: *L. graveolens* (Arci la-Loza no *et al.*, 2004).

3.6 Distribución de *Lippia graveolens* H. B. K.

El género *Lippia* (*Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y pequeños árboles (Pascual *et al.*, 2001).

Las especies son distribuidas principalmente a lo largo de los países del sur y centro América y territorios tropicales de África (Pascual *et al.*, 2001). *L. graveolens* H. B. K. (*Verbenaceae*) es una planta aromática nativa del sur y norte América, México, Guatemala, Nicaragua y Honduras. Estas especies son ampliamente usadas en la medicina humana de América Central (Salgueiro *et al.*, 2003).

3.7 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas de metabolitos secundarios, extraído de las plantas por hidrodestilación o destilación de vapor y por expresión (cascara de cítricos) (Burt, 2004).

Los aceites volátiles de las plantas generalmente se extraen de plantas no maderables por métodos de destilación, normalmente vapor o hidrodestilación y son mezclas inconstantes de terpenoides; principalmente, monoterpenos [C10], sesquiterpenos [C15] y diterpenos [C20]; también pueden estar presentes una variedad de hidrocarburos alifáticos de pesos moleculares bajos (lineales, ramificados, saturados y monosaturados), ácidos, alcoholes, aldehidos, lactones (Dormán y Deans, 2000).

Los principales constituyentes de los aceites esenciales son monoterpenos y sesquiterpenos incluyendo carbohidratos, alcoholes, éteres, aldehidos y cetonas que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas, aromáticas, medicinales de las plantas. Por siglos los aceites esenciales han sido extraídos de diferentes partes de las plantas y también son usadas con propósitos similares (Kalemba y Kunicka, 2003).

3.8 Tricomas

En algunas plantas el lugar donde se producen los aceites esenciales son los tricomas las cuales son las primeras células epidérmicas que empiezan a diferenciarse al 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; Schellmann y Hulskamp, 2005; Valkama *et al.*, 2003). Su estructura básica consiste de una célula basal, una célula peduncular y una cavidad subcuticular (Fig. 1). Las investigaciones sobre su morfología e histoquímica se han realizado preferentemente en las especies de las familias Asteraceae y Lamiaceae (Kolb y Muller, 2004).

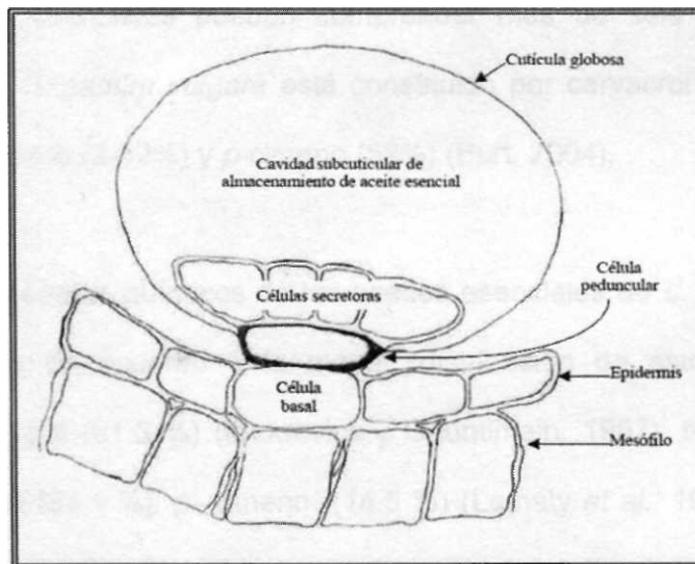


Figura 1. Diagrama esquemático de un tricoma glandular peltado, de una hoja de menta (Turner *et al.*, 2000).

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 esterres de sacarosa (Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000; Kolb y Muller, 2004; Ranger *et al.*, 2005; Valkama *et al.*, 2003).

3.9 Componentes de los aceites esenciales.

Uno de los principales componentes de los aceites esenciales del cual los efectos antibacterianos y fungicidas ha sido estudiado es el carvacrol, el mejor componente en el aceite esencial del orégano (60 - 70 % carvacrol) y timol (45 % carvacrol) (Ultee *et al.*, 1998).

Los aceites esenciales pueden comprender más de seis componentes individuales, el *Origanum vulgare* está constituido por carvacrol (80 %), timol (64 %), T- terpineno (2-52%) y p-cimeno (52%) (Burt, 2004).

Varios compuestos químicos de los aceites esenciales de *L. multiflora* han sido reportados de acuerdo a la mayor, distribución de estos principales compuestos: linalol (81.3 %) (Elakrovick y Oguntimein, 1987), timol (30.3 %), acetato de timol (24.1 %), p-cimeno (14.5 %) (Lamaty *et al.*, 1990), tagetone (35.5 %), ipsenone (12.5%), (3 caryophylleno (11.3 %) (Lamaty *et al.*, 1990), linalol (46.1 %), timol (15.2 %), (3 cubeneno (11.7 %) y p-cimeno (10.4%) (Bassolea *et al.*, 2003).

3.9.1 Principales componentes de los aceites esenciales del género *Lippia*.

Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, (3-cariofileno, r-cimeno, canfor, linalol, a-pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo. En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido; y tres iridoides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-o-p-coumaroil y 6'-o-cafeoil. También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

Pascual *et al.*, (2001), cita que los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia graveolens* son: Monoterpenos: (3 - pelandreno, carvacrol, 1, 8 cinoleno, p- cimeno, metil timol y timol. Sesquiterpenos: o> humuleno, (3-cariopileno, (3-bisaboleno y aromadendreno.

L. graveolens se caracteriza por tener un alto porcentaje monoterpenos hidrocarburos (36.7 - 31.4 %) y monoterpenos oxigenados (33.3 - 55.8 %). Aunque, algunas diferencias importantes entre los mejores componentes fueron encontrados, particularmente para carvacrol (0.2 vs. 44.8 %), p-cimeno (6.8 vs. 21.8 %) y timol (18.1 vs. 7.4 %). Estos resultados son en acuerdo con el polimorfismo químico previamente reportado para esta especie (timol, carvacrol y quimiotipos de timol/carvacrol. Una de nuestras muestras (A), que

contienen timol (18.1 %) así como estos precursores biogénicos, α -terpineno (1.2 %) y p-cimeno (6.8 %), puede ser incluido en el tipo de timol, incluso aunque el porcentaje de este fenol fue menor que otras muestras de tatémala (encima del 30 %). El quimiotipo timol es considerado por algunos autores como el único tipo de aceite de *Lippia graveolens* de Guatemala. La otra muestra (B) fue dominada por carvacrol (44.8 %) y p-cimeno (21.8 %), perteneciendo al quimiotipo carvacrol (Salgueiro *et al.*, 2003a).

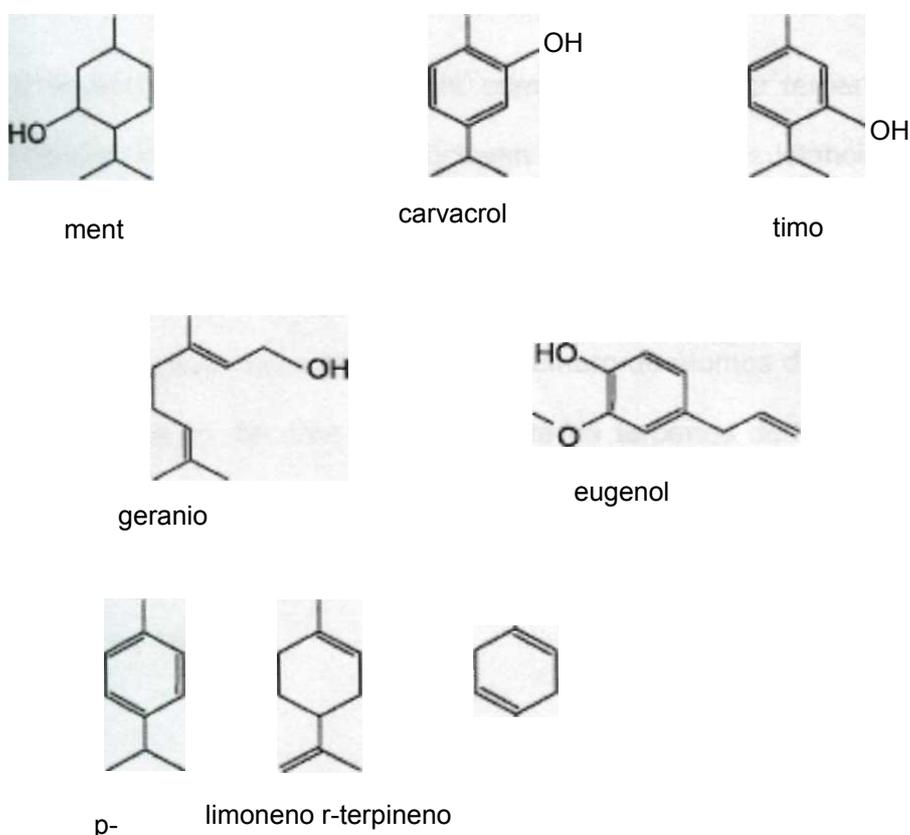


Figura 2. Estructura química de los principales componentes en el orégano (Burt, 2004).

3.10 Rutas metabólicas de origen de los componentes volátiles de los aceites esenciales.

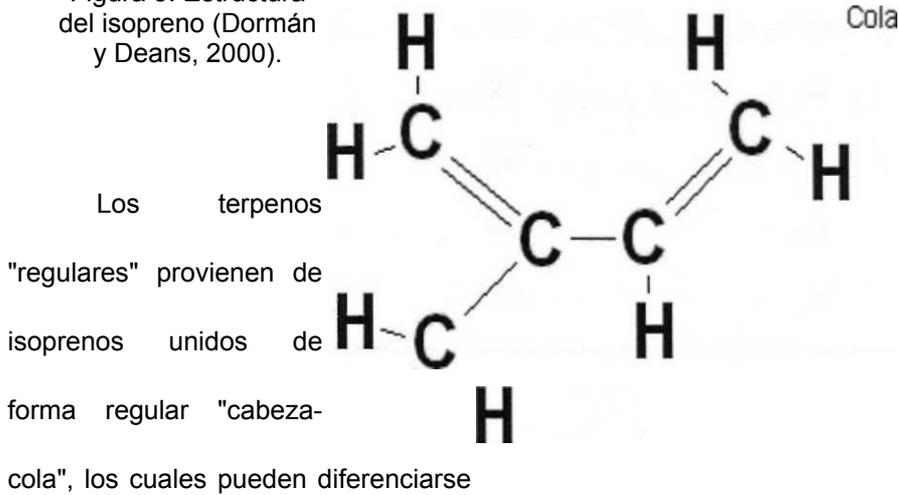
Actualmente se identifican tres diferentes rutas metabólicas de origen de los componentes volátiles de los aceites esenciales: 1) La vía del ácido mevalónico que da origen a los terpenoides, 2) La vía del ácido siquímico que origina los fenil propanoides, y 3) La biosíntesis de ácidos grasos y compuestos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

La unidad estructural básica de los terpenoides es el isopreno (Fig. 3), 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" (Dormán y Deans, 2000).

Cabeza / n

Figura 3. Estructura del isopreno (Dormán y Deans, 2000).



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. (Cowan, 1999; Dormán y Deans, 2000; Tognolini *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Clasificación de terpenos. Adaptado de: Wallach. 1987

Grupo	N° de átomos de	N° de unidades de
	carbono	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

3.11 Mecanismo de acción de los aceites esenciales

Ultee *et al.*, (1998), mostró el efecto antimicrobiano del carvacrol sobre *B. cereus*. Los compuestos hidrófobos como el carvacrol probablemente una influencia sobre las membranas biológicas. La membrana citoplasmática tiene dos funciones principales: (I) funciona como barrera y transducción de energía que permite a la membrana formar gradientes de iones que pueden ser usados para conducir varios procesos y (II) formación de una membrana para enlazar proteínas (Ultee *et al.*, 1999).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales es variable; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el DNA y de las lecitinas y lipopéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999).

3.12 Susceptibilidad de los microorganismos a los aceites esenciales.

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, lecitinas y polipéptidos (Cowan, 1999).

La mayor actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hierbas culinarias y especias parece estar asociada con compuestos fenólicos tales como carvacrol, eugenol, linalol y timol que inhiben una variedad de microorganismos (Bagamboula *et al.*, 2004).

Los aceites esenciales son agentes biocidas contra un amplio rango de organismos tales como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas (Kalembe y Kunicka, 2003).

Microorganismos tales como: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizobium leguminosarium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas auruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *Vibrio vulnificus* y *Rhodobacter sphaeroides* mostraron sensibilidad al carvacrol (Ultee *et al.*, 1998).

Sin embargo, la evidencia *in vitro* indica que los aceites esenciales pueden actuar como agentes antibacterianos contra un amplio espectro de bacterias patógenas teniendo incluyendo *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* y muchos más. Los aceites esenciales de tomillo y orégano pueden inhibir algunas bacterias patógenas tale como *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*, con la inhibición directamente correlacionada con los componentes fenólicos timol y carvacrol. La misma correlación fue también confirmada para los aceites ricos en carvacrol exclusivamente. El eugenol y carvacrol muestran un efecto inhibitorio contra el crecimiento de *E. coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes*. La presencia de un grupo fenólico hidroxilo en particular carvacrol, es acreditado con esta actividad contra patógenos tales como *Bacillus cereus*. Alguno aceites esenciales demostraron actividad antimicrobiana contra enteropatogenos zoonóticos incluyendo *Salmonella* spp., *E. coli* 0157, *Campylobacter jejunii* y *Clostridium perfringens*. Los aceites esenciales con altas concentraciones de timol y carvacrol ejemplo orégano, ajedrea y tomillo, usualmente inhiben bacterias patógenas Gram positivas más que Gram negativas. Sin embargo el aceite esencial de milenrama exhibe buena actividad

antibacteriana contra las Gram negativas *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* patógenas respiratorias (Edris, 2007).

La investigación *in vitro* ha demostrado la actividad inhibitoria contra muchas de las bacterias Gram positivas la mayoría frecuentemente responsable de infecciones respiratorias en humanos [*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes*], y, así, puede proporcionar una base científica para el uso etnomédico de *Lippia alba*. Los aceites esenciales de las especies de *Lippia* muestran ampliamente y exhiben actividad antimicrobiana contra otros microorganismos *L. sidoides* mostrando una actividad inhibitoria contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* y una baja actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* (Pascual *et al.*, 2001).

3.13 Actividad fungicida de los aceites esenciales.

Los hongos son cada vez más una causa importante de infecciones crónicas agudas, especialmente recurrente en mucosas, uñas o infecciones cutáneas que puede ser severo en individuos débiles o inmunocomprometidos. Las plantas aromáticas son normalmente usadas en la medicina tradicional como agentes antimicrobianos, sus aceites esenciales, mezclas o compuestos naturales volátiles poseen propiedades antibacterianas y fungicidas. Trabajos previos mencionan que varios aceites esenciales muestran importante actividad fungicida contra levaduras, dermatofitos y *Aspergillus*, y tienen potencial terapéutico, principalmente en enfermedades fúngicas involucrando

mucosa, cutáneas e infecciones del tracto respiratorio. Los mejores constituyentes de los aceites esenciales son compuestos fenólicos (terpenoides y fenilpropanoides) como timol, carvacrol o eugenol del que se ha documentado actividad antimicrobiana. Algunas especies de *Juniperus*, son usadas también en la medicina tradicional como antiséptico. *Juniperus communis* es tradicionalmente usada para curar infecciones urinarias y *Juniperus oxycedrus* es usado como un remedio para infecciones dermatológicas (Cavaleiro *et al.*, 2006).

3.14 *Candida spp.*

Los hongos del género *Candida* son un grupo de levaduras sumamente ubicuas con características muy diversas, este género abarca más de 160 especies, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenas el potencial patógeno de las levaduras varía en forma considerable, siendo el microorganismo más virulento *Candida albicans*, especie del género capaz de generar con mayor frecuencia enfermedad mortal en seres humanos. *C. tropicalis* es la segunda levadura de importancia en cuanto a su patogenicidad. *C. parapsilosis* también aparece con cierto grado de virulencia, asociada a micosis oportunistas. Por otra parte, no todas las cepas de una misma especie presentan igual capacidad patogénica. Otras especies de *Candida* causan algunas infecciones, pero la debilidad del huésped debe ser muy marcada para permitir que estos microorganismos menos virulentos lo invadan. En el sentido más estricto de la palabra, no existen levaduras patógenas por naturaleza; las que están relacionadas con enfermedad en el hombre o animales, son

incapaces de producir infección en un individuo sano. Se deben presentar algunas alteraciones en las defensas celulares del hospedero, en la fisiología, o en la composición de la flora normal para que pueda producirse la colonización, infección y la enfermedad por levaduras (Kriznik *et al.*, 2005).

La candidiasis es una infección primaria o secundaria por un miembro del género *Candida*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variadas, desde aguda, subaguda y crónica a episódica. La afección puede localizarse en boca, garganta, piel, cuero cabelludo, vagina, dedos, uñas, bronquios, pulmones o tubo gastrointestinal, o se vuelve generalizada, como en caso de septicemia, endocarditis y meningitis (Rippon, 1990).

C. albicans es el agente etiológico más frecuente para la candidiasis y es capaz de causar cualquier micosis clínica. Normalmente es una infección superficial molesta que puede ocurrir en áreas intertiginosas, uñas con tejidos adyacentes, mucosas bucales, faringe y vagina. Bajo ciertas condiciones, *C. albicans* puede infectar también el sistema bronquiopulmonar, riñón y el corazón. La candidiasis congénita cutánea normalmente se caracteriza en varias manifestaciones superficiales, pero una rara investigación reveló que un infante prematuro desarrolló distrofia de todas las 20 uñas de aproximadamente de un mes de edad y el organismo causante, establecido por el cultivo de las uñas fue *C. albicans*. Los resultados demuestran que el aceite de eucalipto y el timol tenía fuerte actividad fúngica más que otros. Evidencia experimental reveló el valor potencial del aceite de limón para los tratamientos de candidiasis oral y vaginal. La actividad fungicida *in vitro* del aceite esencial

de *Ocimum gratissimum* fue probada contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicales* para transmisión y escaneo en microscopio electrónico y tinción negativa en microscopio óptico (Dutta *et al.*, 2007).

El aceite del árbol de té ha sido usado medicinalmente en Australia por más de 80 años, relacionado con usos principalmente por sus propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias. El aceite es obtenido por destilación de vapor de la planta nativa de Australia *Melaleuca alternifolia* y contiene 100 componentes que son principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y alcoholes relacionados. El aceite del árbol de té promete mostrarse como un típico agente fungicida, con datos clínicos recientes indican eficacia en el tratamiento de caspa y candidiasis oral. El dato de un modelo animal indica también que puede ser efectivo en el tratamiento de candidiasis vaginal (Hammer *et al.*, 2004). Algunos componentes volátiles de aceites esenciales de frutas cítricas muestran un alto grado de inhibición fúngica (Guynot *et al.*, 2003).

La candidiasis vaginal es una enfermedad comúnmente extendida afectando una de cada tres mujeres a lo largo de toda su vida. Acerca del 5 % de estas mujeres son sujetos recurrentes al ataque de la enfermedad. La candidiasis vaginal es a menudo asociada con condiciones tales como diabetes mellitus, antibioticoterapia, corticoterapia y embarazo, aunque en muchos casos estos no predisponen factores claros. El efecto fungicida de los aceites esenciales ha sido notado en varios estudios. Los mejores compuestos fenólicos de los aceites esenciales tienen potencial actividad fungicida *in vitro*.

carvacrol y eugenol son los mejores componentes fenólicos de los aceites de orégano y clavo respectivamente (Chami *et al.*, 2004).

Especies como *Lippia multiflora* Moldenke, *L. palmeri* S. Wats. Var *palmeri* y *L. sidoides* Cham exhibe una actividad fungicida *in vitro* (Pascual *et al.*, 2001).

3.14.1 Clasificación taxonómica de *Candida spp.*

Clase: *Deuteromycetes*

Subclase: *Blastomycetidia*

Orden: *Cryptococcal* Familia:

Cryptocaceae Género:

Candida

Especie: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guillermondii*, *C. famata* y *C. zeylanoides* (Rippon, 1990).

3.14.2 Distribución, habitat y fuente de infección de *Candida spp.*

La candidiasis es una enfermedad cosmopolita y sin duda alguna es la micosis que más se presenta en todo el mundo. El **habitat** de las diversas especies de *Candida* es el humano y algunos animales homeotérmicos y puede afectar a ambos sexos por igual, únicamente los casos de genitales son más

frecuente en la mujer por las condiciones anatómicas propias de la vagina (Bonifaz, 1900).

3.14.3 Importancia de *Candida spp.*

Si bien la lista de hongos oportunistas que causan infecciones serias que ponen en peligro la vida aumenta cada año, sin duda la causa única más importante de micosis oportunistas en todo el mundo sigue siendo la de las especies de *Candida* (Pfaller *et al.*, 1998).

Uno de los mejores indicadores de la importancia que están adquiriendo las micosis, principalmente las infecciones invasoras, es la continua e imparable notificación de su incremento clínico (Quindos, 2002).

IV.- Materiales y Métodos

4.1 Aceite esencial

El aceite esencial de orégano *Lippia graveolens* H. B. K. se obtuvo en el ejido El Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila; México latitud Norte 25° 00', longitud oeste 103° 14' y 1320 msnm.

4.2 Caracterización del aceite esencial de *Lippia graveolens* H.B.K.

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 hidrogeno 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 rampa de 3 °C por minuto y terminar a 220 °C con una rampa de 25 °C, manteniéndose por 10 minutos, con un tiempo total de 27.06 minutos. Las cantidades relativas de los porcentajes se calcularon para el total de iones del cromatógrafo, y para los compuestos separados eran calculados del cromatógrama del ion total por una computadora integrada.

4.3 Cepas

En este estudio se utilizaron 61 cepas aisladas de pacientes atendidos en laboratorio de análisis clínico del Centro Médico Nacional del Noreste Unidad Médica de Alta Especialidad No. 71 del IMSS. De las cuales 28 son *C. albicans*, 12 *C. krusei*, 12 *C. tropicalis*, 6 *C. parapsilopsis*, 2 *C. glabrata* y 1 *C. zeylanoides*, e identificadas con CHROM - agar (Giusiano y Mangiaterra, 1998).

4.4 Preparación del inóculo

Todas las cepas de *Candida spp.* usadas en este estudio se desarrollaron a 37 ° C por 24 h en una incubadora usando el medio Sabouraud Dextrosa (Sigma-Aldrich), posteriormente las levaduras fueron suspendidas en agua destilada estéril y usadas inmediatamente. El número de cepas fue determinado usando la cámara de Neubauer ajustando la muestra a 5×10^6 ufe mi ml^{-1} .

4.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

La CMI, es la concentración más baja del aceite esencial a la que los microorganismos probaron no mostrar cambios en el crecimiento visible y se llevo a cabo por el método de difusión en discos.

Las cajas petri fueron preparadas con Agar Sabouraud 4 % glucosa (Sigma-Aldrich) y sembrados con 5×10^6 ufe ml⁻¹ usando los inóculos de las muestras de *Candida* preparados anteriormente.

Asépticamente, 5 ul⁻¹ de aceite vegetal fue depositado en un disco de papel filtro estériles (Whatman No. 1) de 6 mm de diámetro, utilizando las diluciones 0.50, 0.30, 0.25, 0.20 y 0.15 ul/ml⁻¹. El diluyente utilizado fue tween 20. Posteriormente estos discos fueron transferidos a las cajas Petri con inoculo. Se realizaron tres repeticiones e incubados a 37 ° C. El diámetro de la zona de inhibición fue medido después de 48 h de incubación con ayuda del vernier. Para el testigo se aplicaron 5 ul⁻¹ de tween 20 en un disco de 6 mm de diámetro estéril (Whatman No. 1) y se colocó en la caja Petri con inoculo.

V. - Resultados

5.1. Caracterización del aceite esencial de *L. graveolens* H. B. K.

Los datos obtenidos de la caracterización de los aceites a través del análisis de cromatografía de gases se muestran en el cuadro 2 donde se observa que para el aceite esencial de *Lippia graveolens* el carvacrol es el componente con mayor porcentaje con un 95.86 %, seguido por el eucaliptol con 3.06 %, en esta muestra el timol esta presente con 1.08 %, el precursor del carvacrol (p-cimeno) no esta presente.

Cuadro 2.- Principales componentes del aceite esencial de *L. graveolens* H.B.K.

Componentes	Porcentaje (%)
Carvacrol	95.86
Eucaliptol	3.06
Timol	1.08
p-cimeno	0

Cuadro 3.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de (*L. graveolens* HBK) en *C. albicans*.

No de muestra	ul/ml
1	0.20
2	0.20
3	0.20
4	0.20
5	0.20
6	0.20
7	0.20
8	0.15
9	0.20
10	0.25
11	0.20
12	0.20
13	0.20
14	0.20
15	0.15
16	0.20
17	0.20
18	0.20
19	0.15
20	0.20
21	0.15
22	0.15
23	0.20
24	0.20
25	0.20
26	0.20
27	0.20
28	0.20

Cuadro 4.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de (*L. graveolens* HBK) en *C. krusei*.

No de muestra ul/ml	
29	0.20
30	0.50
31	0.15
32	0.25
33	0.25
34	0.20
35	0.20
36	0.20
37	0.20
38	0.20
39	0.20
40	0.25

Cuadro 5.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de (*L. graveolens* HBK) en *C. tropicalis*.

No. de muestra ul/ml	
~41	0.20
42	0.25
43	0.25
44	0.15
45	0.15
46	0.15
47	0.20
48	0.25
49	0.20
50	0.20
51	0.25

Cuadro 6.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de (*L. graveolens* HBK) en *C. parapsilopsis*.

No. de muestra	ul/ml
53	0.20
54	0.20
55	0.25
56	0.25
57	0.20
58	0.25

Cuadro 7.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de (*L. graveolens* HBK) en *C. glabrata*.

No. de muestra	ul/ml
59	0.25
60	0.20

Cuadro 8.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de (*L. graveolens* HBK) en *C. zeylanoides*.

No. de muestra	ul/ml
61	0.30

C. albicans C. krusei C. tropeáis C. parapsbpsís Cejábala Conoides Figura 4.

Cepas de nativas de *Candida spp.*

CMI DE ACEITE ESENCIAL DE *L. graveolens* HBK EN *Candida spp.*

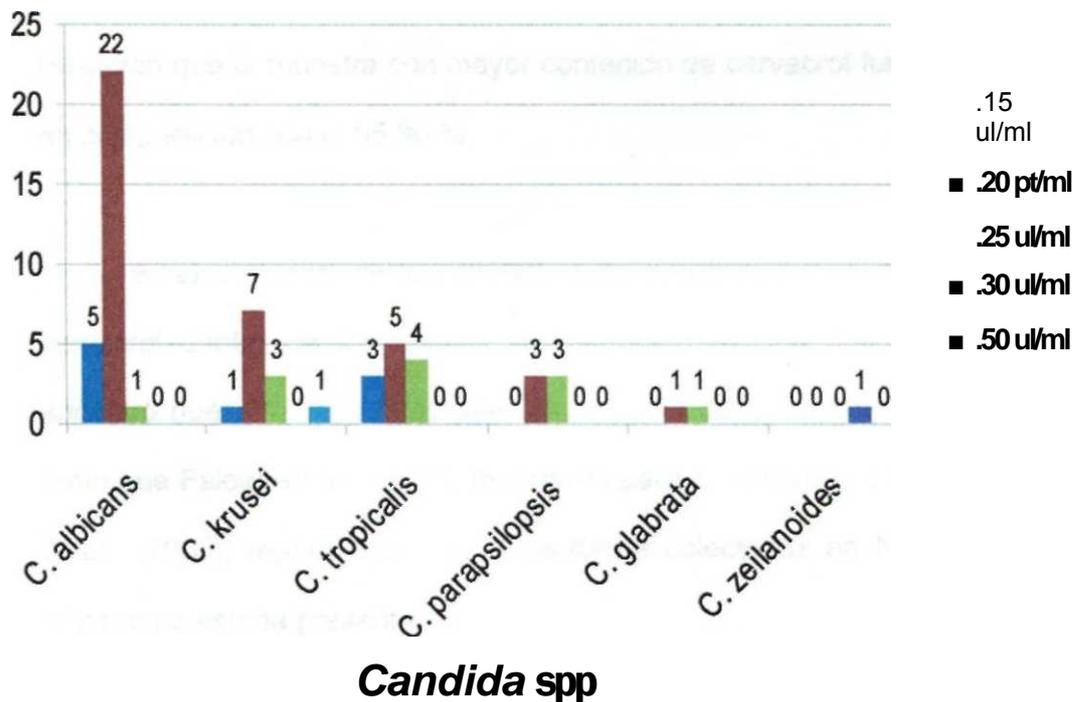


Figura 5. CMI del aceite esencial de orégano (*L. graveolens* HBK) en *Candida spp.*

VI. DISCUSIÓN

6.1.- Caracterización del aceite esencial de *L. graveolens* H.B.K.

Devkatte *et al.*, (2005), evaluaron la actividad anti-candida de varios aceites esenciales obtenidos de diversas plantas que se han sugerido en la medicina alternativa en contra infecciones microbianas.

La caracterización del aceite esencial de *Lippia graveolens* del ejido Barrial de Guadalupe municipio de Torreón, Coahuila demostró que este aceite posee el mayor contenido de carvacrol en comparación con los aceites de la misma especie igual a lo reportado por Salgueiro en 2003, que utiliza dos muestras de *L. graveolens* colectadas en Guatemala donde los resultados revelaron que la muestra con mayor contenido de carvacrol fue de 44.8 % bajo en comparación con el 95.86 %.

Baranauskiene *et al.*, (2003), hizo comparaciones del contenido de carvacrol dentro de los aceites obtenidos de plantas del mismo género y encontró que en *Lippia chevalieri* el contenido de carvacrol fue de 4.0 %, en tanto que Faleiro *et al.*, (2003) reportaron para *L. sidoides* 1.81% y Oladimeji *et al.*, (2000), reportó que en *L. multiflora* colectadas en Nigeria que este terpeno no estaba presente.

Existen aceites esenciales de plantas que no son de la familia *Verbenacea* que contiene carvacrol (Salgueiro *et al.*, 2003). Las plantas de la familia *Laminaceae* presentan carvacrol en sus aceites esenciales un ejemplo es *Origanum virens* que presenta 68.1% de carvacrol en muestras colectadas en Portugal (Salgueiro *et al.*, 2003). Para *Thymus vulgaris* se ha reportado 3.9 % de carvacrol en muestras colectadas en Croacia y para *Thymus eigii* colectadas en Turquía el porcentaje fue de 26.1 % de carvacrol (Salgueiro *et al.*, 2003). Por lo cual el aceite esencial obtenido de las plantas colectadas del ejido el Barrial de Guadalupe Municipio de Torreón, Coahuila mostraron el más alto contenido de carvacrol.

El porcentaje de carvacrol contenido en los aceites esenciales es importante debido a que se le atribuyen efectos antimicóticos (Salgueiro *et al.*, 2003).

La variabilidad del porcentaje de terpenos presentes en los aceites esenciales puede ser debido a las diferentes condiciones de desarrollo de la planta de donde se obtuvieron como son la duración de luz diurna, temperatura, estrés hídrico además de la etapa fenológica en la que se encontraba al momento de cortar la planta Turgut y Silva, 2005; Horvath *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003). Otros autores reportan que la variación se debe a diferentes quimiotipos cuando se habla de los mismos componentes de los aceites esenciales de la misma especie vegetal (Bode y Muller, 2003; Viljoen *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2004). Estas diferencias son importantes en los estudios de las actividades biológicas y farmacológicas de los aceites

esenciales por lo cual al evaluar alguna actividad debe de estar acompañada con la caracterización del aceite que se utiliza (Burt, 2004).

6.2 Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *L. graveolens*

La actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales ha sido demostrada por Salgueiro *et al.*, en 2003 y por Cavaleiro *et al.*, en 2006. Varios aceites esenciales de plantas se han usado en la medicina alternativa contra infecciones microbianas como candidiasis. En este trabajo se examinaron los efectos del aceite esencial de *Lippia graveolens* sobre seis especies de *Candida spp* en un total de 61 muestras.

Salgueiro *et al.*, en 2003, evaluaron la actividad fungicida con aceite esencial de *Origanum virens* contra *Candida spp* en las cuales las CMI estuvieron por arriba de los resultados obtenidos en este estudio: cabe mencionar que Salgueiro., *et al* en 2003 utilizo cepas ATCC y para este estudio se utilizaron cepas nativas.

Cavaleiro *et al.*, (2006), reportó la CMI para el aceite esencial obtenido de las hojas de *Juniperus oxycedrus* con ocho diferentes muestras de *Candida* de cinco especies distintas, *C. albicans* D5, *C. krusei* D39 y *C. krusei* 6258 las concentraciones más bajas estuvieron en un rango de 0.32-0.64 $\mu\text{l/ml}^{-1}$. Al compararlos con los resultados obtenidos en el presente trabajo para *C. krusei* (0.15-0.50 $\mu\text{l/ml}^{-1}$) y *C. albicans* (0.15 a 0.25 $\mu\text{l/ml}^{-1}$). Se observa que los valores obtenidos de las CMIs para las distintas especies de *Candida spp*

utilizando *Juniperus turbinata* fueron de 5 a 8 veces más altos que los que se obtuvieron en este trabajo. Lo cual habla de la buena calidad antimicótica del aceite esencial probado en este trabajo.

Por otro lado, Bagamboula *et al.*, (2004), investigó la CMI sobre *Candida albicans* utilizando compuestos puros de carvacrol, eugenol y un antimicótico químico llamado Nistatina, el resultado obtenido con el carvacrol puro fue de 0.033 $\mu\text{l/ml}^{-1}$, el cual fue 4.5 veces menor a los obtenidos en este trabajo. Cabe hacer mención que la CMI con Nistatina utilizando la misma especie fue 6.6 veces mayor a los resultados obtenidos en este trabajo. Lo cual indica que el aceite esencial de *L. graveolens* tiene mayor efectividad antimicótica que la Nistatina.

VII. Conclusión

De acuerdo con el objetivo planteado para la caracterización del aceite esencial de *L. graveolens* obtenido del ejido Barrial de Guadalupe, municipio de Torreón, Coahuila, México se puede afirmar que el aceite esencial de *L. graveolens* tiene un alto contenido de carvacrol por lo que se puede afirmar su alta calidad.

En cuanto a su potencial fungicida, el aceite esencial de *L. graveolens* presentó buenas cualidades para inhibir el crecimiento de las levaduras a bajas concentraciones en las diferentes cepas utilizadas en este estudio las cuales fueron *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *C. glabrata* y *C. zeylanoides*.

El resultado de esta investigación apoya el hecho de que los aceites esenciales o que algunos de sus constituyentes pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas y avala la utilización de esta planta en la medicina tradicional.

Las perspectivas para próximas investigaciones pueden estar dirigidas a determinar la razón de la variación de los componentes de los aceites esenciales, así como estudios *in vivo* de la utilización del aceite. También es importante probar el aceite con una mayor variedad de levaduras y mohos.

Literatura citada

- Arcila-Lozano, C. C, G. Loarca-Pina, S. Lecona-Uribe, y E. González de Mejia. 2004. orégano: Properties, composition and biological activity. Arch Latinoam Nutr 54: 100-111.
- 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.
- 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: 6756-6761.
- Bonifaz, A. 1900. Candidosis Micología medica básica. P. 277:301, México, D. F.
- Brown, M. J., D. E. Henderson, y C. Hunt. 2006. Comparison of antioxidant properties of supercritical fluid extracts of herbs and the confirmation of pinocembrin as a principle antioxidant in Mexican orégano (*Lippia graveolens*). EJEAFChe 5: 1265:1277.

- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223-253.
- Canales, M. *et al.* 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael coxcatlan, Puebla, México. *J Ethnopharmacol* 97: 429-439.
- Cavaleiro, C, E. Pinto, M. J. Goncalves, y L. Salgueiro. 2006. Antifungal activity of juniperus essential oils against dermatophyte, aspergillus and candida strains. *J Appl Microbiol* 100: 1333-1338.
- Chami, F., N. Chami, S. Bennis, J. Trouillas, y A. Remmal. 2004. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother* 54: 909-914.
- Combrinck, S., G. W. Du Plooy, R. I. McChndle, and B. M. Botha. 2007. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (*Verbenaceae*). *Ann Bot (Lond)* 99: 1111-1119.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.
- Devkatte, A. N., G. B. Zore y S. M. Karuppayil (2005). Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Res* 5(9): 867-73.
- Dormán, H. J., y S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308-316.
- Duarte, M. C, G. M. Figueira, A. Sartoratto, V. L. Rehder, y C. Delarmelina. 2005. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 97: 305-311.

- Dudareva, N., E. Pichersky, y J. Gershenzon. 2004. Biochemistry of plant volátiles. *Plant Physiol* 135: 1893-1902.
- Dutta, B. K., S. Karmakar, A. Naglot, J. C. Aich y M. Begam. 2007. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. *Mycoses* 50: 121-124.
- Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother Res.* 15 (2): 1-16.
- 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.
- Giusiano, G. E. y M. L. Mangiaterra (1998). Rapid differentiation and presumptive identificaiton of yeasts using Candida CHROM-agar médium. *Rev Argent Microbiol* 30(2): 100-3.
- Gutierrez-Alcala, G. *et al.* 2000. Glutathione biosynthesis in arabidopsis trichome cells. *Proc Nati Acad Sci U S A* 97: 11108-11113.
- Guynot, M. E. ef *al.* 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *J Appl Microbiol* 94: 893-899.
- Hammer, K. A., C. F. Carson, y T. V. Riley. 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother* 53: 1081-1085.

- Hamza, O. J. *et al.* 2006. Antifungal activity of some tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *J Ethnopharmacol* 101: 1-9.
- Hellion-Ibarrola, M. C. *et al.* 2006. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (griseb.) moldenke (*Verbenaceae*) in mice. *J Ethnopharmacol* 105: 400-408.
- Hernández, T. *et al.* 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of zapotitlan de las salinas, Puebla (México). *J Ethnopharmacol* 88: 181-188.
- Horváth, G., B. Kocsis, L. Botz, J. Németh y L. Szabó (2002). Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography. *Acta Biológica Szegediensis* 46(3-4): 145-146.
- Kalemba, D., y A. Kunicka. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 10: 813-829.
- 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.
- Kolb, D., y M. Muller. 2004. Light conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of cucúrbita pepo subsp. Pepo var. Styriaca and histochemistry of glandular secretory products. *Ann Bot (Lond)* 94: 515-526.
- Kriznik, A., M. Bouillot, J. Coulon, y F. Gaboriaud. 2005. Morphological specificity of yeast and filamentous *Candida albicans* forms on surface properties. *C R Biol* 328: 928-935.

- 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.
- Lange, B. M. *et al.* 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: 2934-2939.
- Manohar, V., C. Ingram, J. Gray, N. Talpur y W. Echard (2007). Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol* 99(1): 153-6.
- Mueller, M., A. de la Pena y H. Derendorf (2004). Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother* 48(2): 369-77.
- 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.
- 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.
- Oropeza, O. J. 2006. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens* H. B. K.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L) *in vitro.*, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila.
- Pascual, M. E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata, y A. Villar. 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J Ethnopharmacol* 76: 201-214.

- Pfaller, M. A., S. Arikan, M. Lozano-Chiu, Y. Chen, S. Coffman, S. A. Messer, R. Rennie, C. Sand, T. Heffner, J. H. Rex, J. Wang y N. Yamane (1998). Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 36(9): 2609-12.
- Quindos, G. 2002. Mycoses at dawn of xxi century. *Rev Iberoam Micol* 19: 1-4.
- 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: 529-541.
- Rastrelli, L, A. Caceres, C. Morales, F. De Simone, y R. Aquino. 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49: 1829-1832.
- Rippon, J. W. 1990. Candidiasis y levaduras patógenas. In: M.-. Hill (ed.) *Tratado de micología médica*, p 574:628, México, D. F.
- Rojas, G., J. Levaro, J. Tortoriello, y V. Navarro. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharmacol* 74: 97-101.
- 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: 4300-4306.
- 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 Med* 69: 80-83.
- Schellmann, S., y M. Hulskamp. 2005. Epidermal differentiation: Trichomes in arabidopsis as a model system. *Int J Dev Biol* 49: 579-584.

- Schiestl, F. P. *et al.* 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: 567-574.
- Schwab, B., U. Folkers, H. Ilgenfritz, y M. Hulskamp. 2000. Trichome morphogenesis in *arabidopsis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 879-883.
- 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.
- Suzuki, N. (2004). Complementary and Alternative Medicine: a Japanese Perspective. *Evid Based Complement Alternat Med* 1(2): 113-118.
- Tognolini, M. *er al.* 2006. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci* 78: 1419-1432.
- Turgut, D. N. y V. R. Silva (2005). Effect of water stress on plant growth and thymol and caevacrol concentrations in Mexican orégano grown under controlled conditions. *J of Applied Horticulture* 7 (1): 20-2.
- Turner, G. W., J. Gershenzon, y R. B. Croteau. 2000. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol* 124: 655-664.
- Ultee, A., L. G. Gorris y E. J. Smid (1998). Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol* 85(2): 211-8.

- 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.
- 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: 643-655.
- Viljoen, A., S. van Vuuren, E. Ernst, M. Klepser, B. Demirci, H. Baser y B. E. van Wyk (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (*Asteraceae*) the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *J Ethnopharmacol* 88(2-3): 137-43.