

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTO ETANÓLICO Y DE
UNA FRACCIÓN POLIFENÓLICA DE *Lippia graveolens* SOBRE *Penicillium* sp.**

TESIS POR:

José Antonio Moreno Zuccolotto

Presentado como requisito parcial para obtener el título profesional de Ingeniero en Ciencia
y Tecnología de Alimentos.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Abril 2010.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TEGNOLOGIA DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTO ETANÓLICO Y DE
UNA FRACCIÓN POLIFENÓLICA DE *Lippia graveolens* SOBRE *Penicillium* sp.

TESIS

Presentada por:

JOSÉ ANTONIO MORENO ZUCCOLOTTO

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial

para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

APROBADA

Comité de Evaluación

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

Presidente

Dra. Diana Jasso Cantú

Co asesor

MC. Juan Alberto Ascacio Valdés

Vocal

Ing. José Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Universidad Autónoma Agraria
“ANTONIO NARRO”



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Abril del 2010

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme primero el derecho de nacer y realizar una vida de bien, y poder dar un paso mas en el trayecto de mi vida, le agradezco por ponerme dentro de la gran familia que tengo.

A mi “**Alma Terra Mater**” porque me dio una oportunidad de cambiar mi vida, gracias a ella tuve la grandiosa experiencia de formarme como profesionista y de vivir momentos inolvidables, deo sus aulas pero me llevo la sabiduría que en mi forjó.

A la **Dra. Diana Jasso Cantú** por su asesoría en este interesante trabajo de investigación, por la planeación del mismo y por haber logrado el apoyo del CONACYT para la aprobación del proyecto y la realización de este trabajo, que ha sido la base para mi tesis de licenciatura.

Al **Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó** por su amistad, total apoyo y valiosa colaboración, sobre todo por haber depositado su confianza en mí para el desarrollo de este proyecto, gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted y aprender de su sabiduría tanto en clases como en este trabajo.

Al **MC. Luis Eligio Moreno Zuccolotto**, por su valiosa colaboración en la elaboración de este proyecto ya que sus consejos, técnicas, tiempo y paciencia nos llevó a una acertada finalización.

Al **MC. Juan Alberto Ascacio Valdés, TA. Guadalupe Moreno Esquivel, TA. Edith E. Chaires Colunga, Cristina Sánchez**, por brindarme todo el apoyo, técnicas y material necesario así como su tiempo para la elaboración de este proyecto.

A los maestros que contribuyeron en mi formación profesional: **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara, M. Ed. María De Lourdes Morales Caballero, MC. María del Carmen Julia**

García, MC. María Hernández González, Dr. Heliodoro de la Garza Toledo, MC. Oscar Noé Reboloso Padilla, MC. Xochilt Rúelas Chacón, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, MC. Gerardo Sánchez Martínez, Ing. Gerardo Rodríguez, Ing. José Reyes Vaquera, Dr. Álvaro Fernando Rodríguez, a todos ellos gracias por sus experiencias, conocimientos y amistad otorgadas.

Gracias a **Mildred, Laurita y Carlitos** por su gran apoyo, orientación, y consejos que me facilitaron mi estancia en esta universidad, así como el de haberme obsequiado lo más valioso de la vida su amistad, gracias por su tiempo y comprensión.

A la *Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UA de C)*, por la facilitación de sus instalaciones del laboratorio de microbiología y biología molecular donde se realizaron las extracciones pertinentes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a quien le ofrezco mi más grande reconocimiento por el apoyo económico otorgado a través del proyecto: “Estudio de la actividad antifúngica de *Lippia graveolens* en hongos de poscosecha que atacan cultivos de interés comercial y aislamiento de metabolitos que le confieren actividad biológica”, No. de proyecto: 020302037020. Con el apoyo recibido fue posible llevar a cabo la investigación de mi tesis de licenciatura.

DEDICATORIAS

A mi padre **Luis Moreno Valencia** (QEPD) por darme la oportunidad de ser tu hijo y aunque ya no estés con nosotros nunca dejaré de agradecerte y dedicarte todos mis triunfos. Esta es una pequeña semilla que tú sembraste y hoy empieza a dar frutos.

A mi Madre **Celia Zuccolotto Ramírez** por ser además de madre una gran amiga y un gran ejemplo, eres mi más grande tesoro, lo único que tengo en esta vida, gracias por tu confianza. Hoy emprendo un nuevo camino del cual siempre iré de tu mano como la gran inspiración que siempre has sido en mi vida.

A mis hermanos **Luis Eligio, Braulio y Saulo** (QEPD), los quiero, por siempre juntos como hermanos, amigos y confidentes hoy este logro no es solo mío si no de los 4, Saulo te nos adelantaste en el camino pero algún día estaremos juntos y volveremos a ser los inseparables como desde niños.

A mis compañeros y amigos, **Adolfo, Antonio, Juan José, Donaldo, Rosemberg, Agustín, Humberto, Bonifacio, Pedro, Ricardo, Luis Alberto, Eli Obed, Daniel Fernando, Francisco Javier, Freddy Enrique, José Alfredo, José Francisco, Josué, Isaac, Jesús, Ismael Eden, Jorge, Francisco Virgilio, Gary, Guadalupe, Ruth Nayeli, Cristina, Cecilia, Thelma Anahi, Brenda Monserrat, María de Jesús, Dolores, Nayeli, Esmeralda, Belén Azucena, Monserrat, Kenia, Aglael, Marilú, Maira, Teresa, Ventura, Amira Azucena, Clelita, Amalia, Leticia, Alma Delia**. A todos ellos y los que me faltaron mil gracias.

A la **MC. María del Socorro Villarreal** por darme el apoyo que siempre necesité, cada vez que caía en desanimo, con tan solo escucharla me sentía de nuevo en acción, gracias por sus porras maestra Coquí, nunca la olvidaré.

Con un cariño muy especial a alguien que ya ocupa un lugar dentro de mi vida **Mabeth Hernández Ramírez**, gracias por darme tu cariño y comprensión.

A los señores: **Alberto Ortiz García, Hugo Frías Farías, Roberto Rodríguez León y Miguel de León Zúñiga**, y a todos mis compañeros de trabajo por darme la oportunidad de laborar todo este tiempo con ustedes y enseñarme los valores de la vida a través del trabajo y honestidad.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	1
DEDICATORIA.....	3
ÍNDICE GENERAL.....	4
1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivos generales.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. HIPOTESIS.....	16
5. ANTECEDENTES.....	16
5.1. Generalidades del orégano mexicano.....	16
5.2. Taxonomía de <i>Lippia graveolens</i>	17
5.3. Distribución de <i>L. graveolens</i>	19
5.4. Características generales de <i>Lippia graveolens</i>	19
5.5. Usos y aplicaciones.....	21
5.6. Industria alimentaria.....	22
5.7. Potencial de los compuestos naturales.....	22
5.8. Importancia económica.....	23
5.9. Propiedades y actividad biológica de los componentes del orégano mexicano.....	24
5.9.1. Antioxidante.....	24
5.9.2. Potencial antimicrobiano.....	28

5.9.3. Efecto antiparasítico.....	30
5.9.4. Acción estrogénica.....	31
5.9.5. Actividad insecticida.....	32
5.9.6. Actividad antigenotóxica.....	33
5.10. Características fitoquímicas del orégano mexicano.....	35
5.11. Estructura química de los principales componentes en el orégano mexicano.....	36
5.12. Polifenoles.....	38
5.12.1. Cuantificación de compuestos polifenólicos.....	38
5.12.2. Antecedentes polifenólicos.....	38
5.13. Cromatografía en columna.....	39
5.13.1. Definición de cromatografía en columna.....	40
5.13.2. Propiedades de la amberlita.....	40
5.13.3. Obtención de fracciones acuosas y etanolicas.....	41
5.14. Antecedentes del <i>Penicillium</i> sp.....	42
5.14.1. Características del <i>Penicillium</i> sp.....	43
5.14.2. Ecología.....	44
5.14.3. Valor económico.....	44
6. METODOLOGÍA.....	45
6.1. Recolección y tratamiento de la planta.....	45
6.2. Conservación del material vegetal.....	45
6.3. Obtención y determinación de rendimiento del extracto etanólico de <i>L. graveolen</i> ..	46
6.4. Obtención del microorganismo aislado.....	47

6.5. Propagación del microorganismo aislado.....	49
6.5.1. Bioensayos del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i>	50
6.5.2. Efecto del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i> en la inhibición micelial y esporulación.....	51
6.6. Activación de la amberlita.....	51
6.7. Obtención de azúcares y polifenoles hidrosolubles.....	52
6.7.1. Cuantificación de la fracción polifenólica.....	53
6.7.2. Cuantificación de azúcares totales.....	54
6.8. Liofilización de las fracciones polifenólicas.....	54
6.9. Bioensayos del extracto polifenólico.....	55
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
7.1. Resultados del rendimiento obtenido de extracto etanólico de <i>L. graveolens</i>	55
7.2. Resultados del efecto del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i> en el desarrollo del micelio y esporas.....	56
7.3. Resultados obtenidos de las fracciones polifenólicas (rica y pobre) después de extraer el solvente.....	58
7.4. Rendimiento obtenido en la liofilización de las fracciones polifenólicas y cuantificación de polifenoles.....	59
7.5. Actividad antifúngica de los polifenoles hidrosolubles del extracto etanólico de <i>L.</i> <i>graveolens</i> sobre <i>Penicillium</i> sp.....	59
7.6. Resultados del efecto del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i> en la esporulación.....	61
7.7. Cuantificación de polifenoles hidrosolubles y azúcares totales.....	62

7.7.1. Obtención y cuantificación de azúcares totales.....	62
7.7.2. Cuantificación de polifenóles.....	64
7.8. Extracción de polifenóles.....	66
8. CONCLUSIONES.....	66
9. BIBLIOGRAFÍA.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Distribución geográfica del orégano mexicano.....	20
2. Estructura química de los principales componentes del orégano.....	36
3. Estructura química de los principales flavonoides en el orégano.....	37
4. Estructura química del polímero absorbente de amberlita XAD16.....	41
5. Planta de orégano (<i>L. graveolens</i>) en floración.....	45
6. Proceso de agitación.....	46
7. Rotavapor en la extracción de etanol.....	46
8. Estufa de secado para el secado total de residuos etanólicos.....	47
9. Proceso de desinfección a través de lavado con agua clorada.....	48
10. Dilución de esporas de <i>Penicillium</i> sp. 1:1 hasta 1:5.....	48
11. Identificación del hongo <i>Penicillium</i> sp.....	49
12. Mezcla de PDA y extracto.....	50
13. Cajas Petri con medio PDA envenenado con diferentes dosis de extracto etanólico de <i>L. graveolens</i> e inoculados con discos de micelio de <i>Penicillium</i> sp.....	50
14. Obtención de azúcares y polifenoles hidrosolubles en columna de amberlita.....	53
15. Efecto del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Penicillium</i> sp.....	57
16. Resultado micelial polifenólico.....	60
17. Efecto antifúngico de la fracción polifenólica del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i>	60

18. Cuantificación de azúcares totales.....	64
19. Cuantificación de polifenoles hidrosolubles.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

1. Taxonomía del orégano mexicano.....	17
2. Clasificación científica de <i>Penicillium</i> sp.....	43
3. Diferencias de medias del crecimiento radial del micelio de <i>Penicillium</i> sp. por efecto de inhibición del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i> . Tukey 0.05%.....	57
4. ANVA elaborado con los datos de crecimiento del radio micelial del extracto etanólico de <i>L. graveolens</i>	57
5. ANVA elaborado con los datos de crecimiento del radio micelial de <i>Penicillium</i> sp. con polifenóles de extracto etanólico de <i>L. graveolens</i>	61
6. Diferencia de medias del crecimiento micelial de <i>Penicillium</i> sp. por efecto de los polifenóles de extracto etanólico de <i>L. graveolens</i>	61
7. Promedio de azúcares totales.....	63
8. Con dilución (1:80); Absorvancia.....	63
9. Sin dilución; Absorvancia.....	63
10. Promedio de polifenoles hidrosolubles según Makkar <i>et al.</i> (1993).....	64
11. Promedio de la muestra rica en polifenóles hidrosolubles según Makkar <i>et al.</i> (1993).....	65
12. Promedio de la muestra pobre en polifenóles según Makkar <i>et al.</i> (1993).....	65

EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTO ETANÓLICO Y DE UNA FRACCIÓN POLIFENÓLICA DE *Lippia graveolens* SOBRE *Penicillium* sp.

1. RESUMEN

El presente trabajo se realizó en dos etapas, la primera consistió en la obtención del extracto, la determinación de su rendimiento y la prueba de inhibición *in vitro* contra *Penicillium* sp., hongo causante de pudriciones de frutos en postcosecha. En la segunda etapa se realizó la obtención y cuantificación de polifenoles hidrosolubles del extracto etanólico, la cuantificación de azúcares totales (resultado de la fracción polifenólica) y la prueba antifúngica *in vitro* contra *Penicillium* sp.

Las hojas de *Lippia graveolens* colectadas en el Desierto Chihuahuense, en el Sureste del Estado de Coahuila, fueron deshidratadas y trituradas para ser agregadas en etanol como solvente para obtener el extracto. En la primera etapa, este extracto fue mezclado en medio PDA en dosis de 0, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 ppm, y vaciado en cajas Petri, para después ser inoculadas con cepas monospóricas de *Penicillium* sp. Las variables evaluadas fueron: crecimiento micelial y producción de esporas, el extracto etanólico de *L. graveolens* obteniendo los resultados de inhibición al 100 %, en el desarrollo del micelio de *Penicillium* sp. en 3000 ppm y a las esporas en 2000 ppm.

En la segunda etapa se realizó la obtención de la fracción polifenólica, la cuantificación de polifenoles y azúcares totales, así como la evaluación antifúngica de la fracción polifenólica (polifenoles hidrosolubles) del extracto etanólico de *L. graveolens*, siguiendo el mismo procedimiento que en la prueba anterior, utilizando etanol como solvente. La fracción polifenólica se mezcló en medio PDA en dosis de 0, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000 y 50000 ppm y se vació en cajas Petri, para después ser inoculadas con cepas monospóricas de *Penicillium* sp. Las variables evaluadas fueron: crecimiento micelial y producción de esporas, obteniendo resultados de inhibición al 100 % en el desarrollo del micelio de *Penicillium* sp. en 20000 ppm y las esporas en 10000 ppm.

Las cantidades obtenidas de polifenoles hidrosolubles fue de 13.54 mg/ml y de azúcares totales con dilución de 1:80 fue de 1.259 mg/ml.

Los resultados de crecimiento micelial y producción de esporas, el extracto etanólico de *L. graveolens* obteniendo los resultados de inhibición al 100 %, en el desarrollo del micelio de *Penicillium* sp. en 3000 ppm y a las esporas en 2000 ppm, en la primera. Y crecimiento micelial y producción de esporas, obteniendo resultados de inhibición al 100 % en el desarrollo del micelio de *Penicillium* sp. en 20000 ppm y las esporas en 10000 ppm en la segunda etapa.

Palabras clave: *Lippia graveolens*, *Penicillium* sp., extracto etanólico, polifenoles hidrosolubles.

2. INTRODUCCIÓN

El orégano *Lippia graveolens* es comúnmente usado para fines culinarios y medicinales, obteniéndose en forma frecuente de poblaciones silvestres. Esta especie en el mercado mundial es conocida como orégano mexicano, de muy buena aceptación tanto para condimento como por sus aceites esenciales, ya que su aroma y sabor es similar con el orégano europeo *Origanum vulgare* L (Paludosi, 1997). Existe muy poca información acerca de la agrotecnología de *Lippia graveolens* lo que ha limitado cultivarla con mayor extensividad para aprovechar sus propiedades (Ronquillo, 1988).

El Desierto Chihuahuense se extiende desde la parte norte-centro de México y centro-sur de Estados Unidos de América (Schmidt, 1979), en él existen especies naturales adaptadas a este tipo de condición climática, las cuales están sujetas a altas presiones de pastoreo y cuya explotación no controlada contribuye a desestabilizar el entorno ecológico (Lal, 2001). Dentro de estas especies vegetales, especialmente en la parte sur del desierto, sobresale el Orégano mexicano (*Lippia graveolens*) como una planta de importancia, por sus múltiples usos culinarios, medicinales e industriales.

En la actualidad la sociedad mundial demanda más atención al cuidado del medio ambiente y mayor producción de alimentos libres de residuos tóxicos. Por lo que se han realizado muchas investigaciones acerca del uso de extractos de plantas con potencial plaguicida, tales como la inhibición del desarrollo de enfermedades causadas por hongos (Chapagain *et al.*, 2007; Jasso *et al.*, 2007; Macarena *et al.*, 2008).

En esta investigación se colectó *Lippia graveolens*, planta originaria de el semi-desierto Chihuahuense, se obtuvo extracto etanólico, se evaluó el rendimiento del extracto y su actividad antifúngica *in vitro* sobre hongos que causan infecciones en frutos, principalmente en postcosecha.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad antifúngica del extracto etanólico y la fracción polifenólica del extracto etanólico de *Lippia graveolens* así como sus rendimientos.

3.2. Objetivos Específicos

- Obtener extracto etanólico de *L. graveolens* (orégano mexicano)
- Obtener y cuantificar la fracción polifenólica y azúcares totales del extracto de *L. graveolens*.
- Aislar el microorganismo fitopatógeno alterante de frutos de la región manzanera de Arteaga Coahuila.
- Evaluar la actividad antifúngica de un extracto etanólico y la fracción polifenólica de *L. graveolens* contra *Penicillium* sp.

4. HIPOTESIS

- El extracto etanólico de *Lippia graveolens* aplicado en dosis bajas *in vitro*, inhibe el crecimiento de *Penicillium* sp.
- La fracción polifenólica del extracto etanólico de *L. graveolens* inhibirá *in vitro* el desarrollo de *Penicillium* sp. en alguna de las dosis utilizadas.

5. ANTECEDENTES

5.1. Generalidades del orégano mexicano (*L. graveolens*)

El orégano mexicano no está relacionado con el genero *Origanum* y sus especies que se encuentran en otros continentes. En México crecen de forma silvestre dos variedades de *Lippia* con las especies *graveolens* y *palmeri* que son conocidas como el orégano mexicano y se distribuyen ampliamente en el país.

Lippia graveolens es sin duda la especie más comercializada por sus características aromáticas y la concentración de los componentes del aceite. En esta investigación, se colectaron especímenes de orégano mexicano en la zona conocida como la Laguna, cerca de la ciudad de Torreón, Coahuila.

5.2. Taxonomía de *Lippia graveolens*

Se conocen con el nombre de orégano dos grandes grupos de plantas aromáticas: el orégano mediterráneo o europeo y el mexicano. El primero proviene de diversas especies del genero *Origanum vulgare* subs. *Hirtum* (orégano griego) y *O. vulgare* subs.

Gracite (orégano turco). El orégano mexicano proviene de dos especies de la Familia Verbenaceae: *Lippia palmeri* y principalmente de *L. graveolens* (Huerta, 1997). En el Cuadro 1 se menciona la taxonomía del orégano mexicano.

Cuadro 1: La taxonomía del orégano mexicano (Semarnat 2001):

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Orden	Lámiales
Familia	Verbenaceae
Genero	Lippia
Variedad	Graveolens, Palmeri

Esta planta es un arbusto caducifolio muy ramificado, que llega a alcanzar hasta 2.50 m, de altura y 1.20 m, de diámetro de cobertura foliar; aunque en la generalidad de los casos, las poblaciones silvestres de bajo aprovechamiento miden de 0.70 a 1.20 m, de altura y de 0.30 a 0.80 m, de diámetro de cobertura, esto dependiendo de las condiciones específicas de desarrollo y de la edad de la planta (Martínez *et al.*, 1984).

Raíz. La temperatura óptima de nodulación es de 25 °C, dando lugar a la formación de microorganismos que provocan la formación de nódulos en la raíz, por medio de las cuales se realiza el proceso de nitrificación, los primeros nódulos se forman 9 días después de la germinación y a los 3 semana empieza la fijación del nitrógeno atmosférico.

Tallo. La longitud de los tallos es variable, dependiendo de la edad y de las condiciones del hábitat, principalmente de la distribución y cantidad de lluvia a lo largo del año. La velocidad de crecimiento en altura de los tallos, es menor que la velocidad de crecimiento de los brotes anuales; quienes dan origen a ramas, hojas, flores y frutos.

Hojas. La producción de follaje de las poblaciones naturales de orégano, se inicia dos semanas después de presentarse las primeras lluvias de temporal, concluyendo la formación total de follaje unas seis semanas después de haberse iniciado los brotes vegetativos (Martínez, 1990).

Flores. La floración se inicia unas 7 semanas después de haberse iniciado la formación del follaje, produciéndose una excesiva cantidad de flores, de las cuales solamente llegan a la madurez el 65 %. Dentro de las condiciones normales de crecimiento, sus flores tienen la característica de presentar el fenómeno de autopolinización, en el cual el polen cae sobre el estigma produciéndose la fertilización. La floración está regulada por el fotoperiodo, la temperatura, los elementos nutritivos, las condiciones físicas del suelo y el agua.

Fruto. La cápsula se empieza a formar de 15 a 20 días después de la floración, posteriormente se madura coincidiendo esta con el amarillamiento y caída de las hojas, por lo que la cápsula se abre y expulsa la semilla, variando el período de acuerdo a la zona ecológica.

5.3. Distribución de *L. graveolens*

El orégano presenta una amplia distribución, principalmente en las zonas centrales, occidentales y norte del país (Ruiz, 1985). Los datos específicos del inventario sobre potencial existente por región se desconocen prácticamente en su totalidad, esto debido a la falta de metodología para su evaluación; sólo se cuenta con información preliminar sobre su distribución a nivel de regiones. Así se tiene que Martínez (1959), proporciona datos muy generales de la distribución del género *Lippia* spp; menciona que *Lippia berlandieri* Shower existe de Jalisco a Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca y Sinaloa; *Lippia palmeri* Wast, en Baja California, Sonora y Sinaloa; también reporta la existencia de *Lippia germinuta* H.B.K, en Sinaloa, Tamaulipas y Oaxaca en la Figura 1 se presenta la distribución geográfica actual del orégano mexicano según la Semarnat (2005), los estado de la República en los que se encuentran: Chihuahua, Durango, Coahuila, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Hidalgo, Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Yucatán y Campeche.

5.4. Características generales de *Lippia graveolens*

El orégano habita en climas secos y semisecos. Sobre lomeríos rocosos, valles, arroyos, en chaparrales, en matorrales desérticos y mesas. Se distribuye desde Texas a Nuevo México en los Estados Unidos, así como en México y Centro América (Correl y Johnston, 1970; Martín y Hutchings, 1981).

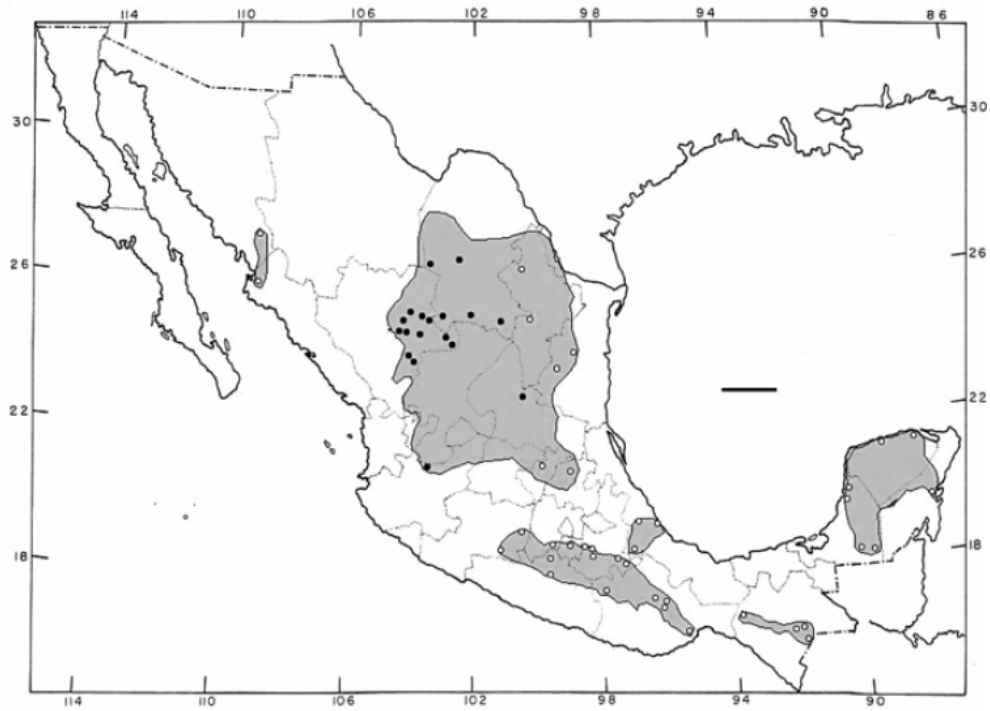


Figura 1. Distribución geográfica del orégano mexicano.

Los sitios donde se encuentra el orégano presentan las siguientes características: el suelo tiene de 5 a 35cm de profundidad con una textura franco arenosa (50-60 %, 20-30 % de limo, 10-20 % de arcilla), el pH varía de 5.8 a 6.5, la conductividad eléctrica de 0.3 a 0.4 mmhos/cm (Cavazos, 1991).

Según García (1973), el orégano se encuentra en altitudes de 1400 a 1600 msnm, en suelos de superficie pedregosa, delgados fértiles, ligeramente alcalinos con un pH de 7.3 a 7.6; con clima seco semicálido y precipitaciones no mayores a los 300 mm de promedio anual en verano; con heladas que ocurren con mas frecuencia de entre mediados de octubre a marzo.

5.5. Usos y aplicaciones

La mayoría de las especies de orégano poseen notables propiedades medicinales, que se explican por la extraordinaria y compleja composición química que tienen estas plantas. En la práctica terapéutica (herbolaria) las especies de orégano europeas (*Origanum* spp.) y las mexicanas (*Lippia* spp.) se administran para los mismos problemas de salud (Huerta, 2006).

En base a sus propiedades, en México se usa además de condimento de alimentos, en medicina popular, en forma de infusiones para tos, cólicos, padecimientos de los riñones, fiebre y enfermedades de las vías respiratorias (Martínez, 1959; Ramayo y Herrera, 1976 y CONASUPO, 1985).

5.6. Industria alimentaria

La principal fuente de distribución del orégano en la industria alimentaria es en presentación deshidratada, en bolsas plásticas, molido en envases listos para espolvorear sobre los alimentos y en forma concentrada como aceite.

El orégano se utiliza en la preparación de alimentos frescos como: guisados (adobo, pipían), sopas, estofados de carnes, platillos típicos (pozole, menudo, chilpozonte, callos, barbacoa, etc.), pizzas y otras comidas italianas, fabada asturiana, caldo gallego, etc. A la mezcla del orégano con laurel y tomillo se le conoce popularmente como "hierbas de olor", y se incorpora a infinidad de platillos. En alimentos enlatados el orégano se utiliza en productos como el salmón, atún, sardinas, abulón, etc. También se añade industrialmente a salsas, aderezos, aceitunas, encurtidos, chiles en escabeche, polvos y pastas para sazonar,

quesos, sopas precocidas, frijoles envasados, moles para rehidratar, etc. (José- Gaspar, 2008).

5.7. Potencial de los compuestos naturales

La humanidad ha utilizado productos de las plantas para el control de insectos por varios siglos. Los insecticidas botánicos son productos derivados de vegetales, es decir, que no son sintetizados químicamente, sino que mediante ciertos procedimientos son extraídos de las plantas. Dentro de este grupo se tienen las piretrinas y alcaloides, entre otros (Vázquez, 1996).

Abou-jawdah (2007), menciona en su investigación que las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas para controlar diferentes enfermedades en productos hortofrutícolas. La obtención de los extractos vegetales y el estudio de los componentes activos propician su empleo contra diferentes fitopatógenos. En condiciones *in vitro* los extractos inhiben el crecimiento del patógeno, así como la esporulación y germinación de esporas, de modo que ayudan a controlar las enfermedades de frutos y hortalizas.

Se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. El proceso para obtener metabolitos secundarios en los extractos es muy variable se pueden obtener extractos líquidos y en polvo o también utilizando otros disolventes para así obtener otros diferentes compuestos.

Se han realizado algunas investigaciones sobre el potencial de los extractos de *Lippia graveolens* para algunas actividades biológicas como su capacidad antioxidante, antimicrobiana, insecticida, antimutagénica.

5.8. Importancia económica

Las perspectivas económicas de este recurso, a través de su proceso agroindustrial, son muy promisorias, siempre y cuando se pueda garantizar una producción uniforme del orégano, tanto en calidad como en volumen. Dado que el orégano es un recurso silvestre de zonas con alto grado de marginación, es necesario que se realice un manejo adecuado de este recurso, para garantizar un desarrollo sustentable en las regiones donde se produce. Así como asegurar que se eleve el nivel socioeconómico de importantes núcleos de población cuyos ingresos actuales son escasos e irregulares (Huerta, 2005).

El fomento de un recurso forestal renovable tan importante como el orégano debe estar apoyado en normas o recomendaciones como, por ejemplo, aplicar oportunamente las normas técnicas que permitan el óptimo aprovechamiento y conservación del recurso; prevenir la incidencia de incendios y sobre pastoreo en sus hábitat, ya que en las áreas donde se desarrolla el orégano, la cubierta vegetal es escasa y por lo tanto puede ser fácilmente destruida por la erosión, cuando queda al descubierto la delgada capa de suelo (Huerta, 2005).

Así mismo, es necesario organizar a recolectores y acopiadores para la recolección de semillas para el establecimiento de viveros y promover la reforestación o regeneración de áreas que, actualmente, tengan en producción o se encuentren sobreexplotadas.

También resulta importante capacitar permanentemente a los productores en el manejo de técnicas de aprovechamiento (recolección, beneficio), así como en la identificación de los canales de comercialización que les reporten mayores beneficios. Además, es imprescindible impulsar la investigación de métodos o técnicas de propagación de estas plantas (Huerta, 2005).

5.9. Propiedades y actividad biológica de los componentes del orégano mexicano.

Es importante mencionar que los usos tradicionales del orégano permitieron estudiar esta planta desde el punto de vista de los principios activos, que promueven efectos benéficos para prevenir o aliviar ciertos padecimientos o enfermedades, por lo que se la atribuyen propiedades biológicas importantes que se describen a continuación.

5.9.1. Capacidad antioxidante

Una de las principales actividades biológicas del orégano es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Origanum* (Baricevik *et al.*, 2002). La función antioxidante de diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención

en relación con el papel que tienen en la dieta en la prevención de enfermedades (Kahkoren *et al.*, 1999).

Los compuestos antioxidantes son importantes porque poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, enfermedad cardiovascular y diabetes. Los antioxidantes como los tocoferoles, los carotenoides, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos se consumen a través de los alimentos. En algunos estudios de especias se han aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos (Azuma *et al.*, 1999).

El efecto antioxidante de las plantas aromáticas se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (Shaidi *et al.*, 1992).

El potencial antioxidante de los extractos de orégano ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilo, con los métodos de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, atrapamiento de HOCl y por la prueba de la rancidez. En todas estas pruebas, los extractos de orégano han mostrado ser efectivos, en algunos casos a niveles superiores a los exhibidos por el propil galato, BHT (butil hidroxil tolueno) y BHA (butil hidroxil-anisol (Martínez-Tome *et al.*, 2001).

Sin embargo, sus aplicaciones industriales son limitadas debido al aroma y sabor que pueden conferir a los alimentos donde se aplicarían, por lo que se requiere de investigación en procesos de deodorización (Moure *et al.*, 2001).

La actividad antioxidante depende del tipo y polaridad del solvente extractante; por ejemplo, los antioxidantes obtenidos con agentes lipofílicos son más efectivos en emulsiones (Moure *et al.*, 2001). El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol (Deighton *et al.*, 1993). Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. mejorana*) (Baricevik *et al.*, 2002; Baratta *et al.*, 1998). Se ha evaluado el potencial antioxidante del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) obtenido de hojas secadas a la sombra y al sol.

La mejor actividad antioxidante, con el método del β -caroteno, se obtuvo en el aceite que proviene de las hojas de orégano secadas a la sombra, siendo ésta dosis dependiente y mayor que el BHT (butil hidroxil tolueno), (Lecona-Urbe *et al.*, 2003).

Otros métodos que han sido empleados para medir el grado de oxidación son la técnica de espectroscopia de resonancia electrónica (se basa en las etapas tempranas del proceso de oxidación); el del radical libre, el cual relaciona el efecto antioxidante en la iniciación del proceso oxidativo; y el de depleción de oxígeno, en el cuál se mide el efecto antioxidante en la etapa de propagación. *O. Vulgare* y *O. onites*, sometidos a esta última

determinación, demostraron alta actividad antioxidante en la etapa de propagación (índice antioxidativo 0.064 y 0.050, respectivamente) (Madsen *et al.*, 1996).

Las hierbas y especias como el orégano son también una fuente potencial de vitamina C y de otros compuestos antioxidantes como los carotenoides. (Calucci *et al.*, 2003).

El efecto antioxidante de los extractos metanólicos del orégano se debe a la presencia de ácido caféico y rosmarínico. Los glicósidos son capaces de liberar compuestos volátiles por hidrólisis ácida o enzimática, por lo que pueden considerarse como precursores de sustancias antioxidantes en las plantas. Los extractos alcohólicos y etéreos del clavo, la salvia, el orégano, el romero y el tomillo mostraron actividad antioxidante en todos los tipos de grasa que se han evaluado (Shahidi *et al.*, 1995).

En el orégano, los compuestos activos, son derivados fenólicos de los ácidos cafeico y romérico (Rajalakshmi *et al.*, 1996). A partir de las hojas secas de orégano (*O. vulgare* L.) se ha identificado como principal antioxidante un glicósido fenólico (Nakatami *et al.*, 1987).

La timoquinona se ha encontrado como la aglicona mayoritaria en *O. vulgare* ssp. *Hirtum*. Las agliconas y el aceite esencial presentaron una actividad antioxidante equivalente e inhibieron la formación del hidroperóxido aún después de 80 días. En infusiones de *L. citriodora*, se ha encontrado actividad para atrapar radicales hidroxilo y ácido hipocloroso, aunque también se ha observado un efecto prooxidante en

concentraciones arriba de 4 mg/ml. Estas infusiones se caracterizan por la presencia de verbascosido, un compuesto fenil- etanoide ampliamente estudiado en cuanto a su actividad antioxidante, cuyo efecto protector se atribuye al residuo cafeoil o a la porción feniletilo (Valentão *et al.*, 2002).

5.9.2. Potencial antimicrobiano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Elgayyar *et al.*, 2001; Aligiannis *et al.*, 2001). Tienen además capacidad anti fúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomonas aeruginosa* (Sivropoulou *et al.*, 1996).

En estudios anteriores se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (Sivropoulou *et al.*, 1996; Elgayyar *et al.*, 2001). Otros compuestos, como el g-terpineno y r-cimeno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas (Aligiannis *et al.*, 2001; Sivropoulou *et al.*, 1996).

Se ha informado que las células que crecen en concentraciones subletales de carvacrol, sintetizan dos fosfolípidos adicionales y omiten uno de los fosfolípidos originales (Burt *et al.*, 2003; Ultee *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que para los aceites de *L. multiflora* y *L. chevalieri*, los valores de CMI y de la concentración mínima bactericida (CMB) son más bajos para inhibir los microorganismos gram negativos (*Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Shigella disentería*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*) que para los gram positivos (*Staphylococcus camorum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*). *L. multiflora* presenta alta actividad antimicrobiana debido a su alto contenido de timol y sus derivados. *L. chevalieri* contiene un alto porcentaje de p-cimeno, el cual ejerce un efecto antagónico con el carvacrol y el timol, lo que explica su baja actividad antimicrobiana (Bassole *et al.*, 2003; cosentino *et al.*, 1999).

El extracto etanólico de una línea clonal de orégano inhibió la acción de *Listeria monocytogenes* en caldo y otros productos de carne (Saederg *et al.*, 2003). También se ha encontrado que el aceite esencial de orégano es muy valioso en la inhibición de *E. coli* O157:H7 (Sagdic *et al.*, 2002). Otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogroup sobria, *Cándida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica* subs. entérica serotype typhimurium, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*, se han logrado

inhibir gracias a la presencia de extractos de orégano (2% v/v) (Hammer, *et al.*, 1999). Estos estudios tienen importantes implicaciones para la industria alimentaria.

5.9.3. Efecto antiparasitario

El aceite esencial de *L. multiflora* es considerado un agente efectivo contra la infestación por piojos (*Pediculus humanus corporis* y *Pediculus humanus capitis*) y por el artrópodo *Sarcoptes scabiei*; incluso en mayor grado que el bencil benzoato, la droga más comúnmente empleada contra estos parásitos. En esta especie de orégano, los componentes mayoritarios en su aceite son el cimeno (8 %), limoneno (15 %), linalol (34 %), geraniol (20 %) y timol (4 %).

Entre los compuestos monoterpénicos volátiles presentes comúnmente en aceites esenciales, es conocida la capacidad del terpinelol y del α - y β -pineno para matar piojos, aunque estos compuestos sólo se encuentran en bajas cantidades en dicho aceite esencial, 3 %, 1 % y 4 % respectivamente (Dladimeji *et al.*, 2000). Los extractos de *L. berlandieri* poseen actividad anti-giardia elevada, con una mortalidad de los trofozoitos del 90 %, mayor que la causada por timidazol (79 %), la droga típica usada para el tratamiento de la giardiasis (Ponce-Macotella *et al.*, 1994).

5.9.4. Acción Estrogénica

Los flavonoides son un grupo de fitoquímicos que poseen actividad hormonal. La habilidad de proteger contra la osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, acciones atribuidas a estrógenos endógenos como el 17β -estradiol, ha fundamentado la acción estrogénica de los flavonoides. Por otro lado, algunos de ellos presentan actividad antiestrogénica pues han demostrado prevenir la formación de tumores de mama (Frigo *et al.*, 2002).

Se ha encontrado que algunos alimentos, hierbas y especias contienen una gran cantidad de sustancias con actividad estrogénica. (Zava *et al.*, 1998) demostraron que el orégano (*O. vulgare*) es una de las seis especias con más alta capacidad para ligar progesterona, junto con la verbena, la cúrcuma, el tomillo, el trébol rojo y la damiana.

Además se cree que el orégano puede poseer una ligera actividad estrogénica *in vivo* cuando es consumido a través de los alimentos (Zava *et al.*, 1998; Howes *et al.*, 2002). Sin embargo, se requiere más investigación para determinar con exactitud si los componentes del orégano poseen actividad estrogénica.

5.9.5. Actividad insecticida

Los aceites esenciales de plantas representan una alternativa para la protección de los cultivos contra plagas (Isman *et al.*, 2000). Algunos aceites esenciales y sus componentes poseen un amplio espectro de actividad contra insectos, ácaros, hongos y nemátodos, tales como *Rhizopertha dominica*, *Tribolium castaneum*, y *Sitophilus oryzae*, plagas que atacan granos almacenados y contra Mosca domestica (Isman *et al.*, 2000; Prates *et al.*, 1998).

El aceite esencial de *O. syriacum* contiene un alto nivel de carvacrol (61 %), el cual posee una concentración letal media (LC50) = 37.6 mg/L, seguido del timol (21.8 %) con un LC50= 36 mg/L contra larvas del mosquito *Culex pipiens molestus*. Entre otros compuestos activos se tiene a la mentona, el 1,8-cineol, el linalol y el terpinelol (Traboulsi *et al.*, 2002). Los aceites esenciales de *O. mejorana* y *O. compactum* poseen una alta actividad insecticida contra huevos y adultos de *Mayetiola destructor* (Lamiri *et al.*, 2001).

5.9.6. Capacidad antigenotóxica

La dieta es una fuente potencial de sustancias carcinogénicas a las que se exponen los humanos. Esto ha provocado un gran interés en buscar fuentes de nutrientes y de no nutrientes que ayuden a prevenir o contrarrestar el efecto adverso que pudiesen ocasionar los aditivos sintéticos, tóxicos naturales, las sustancias generadas durante el procesamiento

y los contaminantes accidentales. Se ha encontrado que algunos monoterpenos presentes en los aceites esenciales son inhibidores efectivos de la carcinogénesis. El aceite esencial de orégano tiene la capacidad de inducir un incremento en la actividad de la enzima detoxificante glutatión S-transferasa (GST) cuando se administra oralmente, lo cual sugiere un potencial anticarcinogénico (Lam *et al.*, 1991).

Los monoterpenos con diferentes grupos funcionales tales como hidrocarburos, aldehídos y cetonas son inhibidores *in vitro* de las monooxigenasas CYP2B1, por lo que pueden alterar la biotransformación de sustancias tóxicas (De-olivera *et al.*, 1999).

Algunos modelos animales para cáncer han demostrado que varios monoterpenos poseen propiedades anticarcinogénicas actuando a diferentes niveles moleculares y celulares (Loza-Travera *et al.*, 1999). Por ejemplo el carvacrol (50 y 100mM) reduce en 25 y 35 %, respectivamente, el número de células de melanoma murino (B16F10), línea celular con un potencial metastásico elevado (He *et al.*, 1997).

Los extractos acuosos de *O. vulgare* y *O. mejorana* presentan importantes efectos antimutagénicos (Veda *et al.*, 1991; Nakate *et al.*, 1989). La galangina y la quercetina, obtenidas de extractos metanólicos de hojas de orégano (*O. vulgare*), son flavonoides con actividad antimutagénica contra sustancias encontradas comúnmente en los alimentos (Kanazawa *et al.*, 1995). Por ejemplo, han encontrado un efecto protector del aceite esencial de orégano mexicano (*L. graveolens*) en la cepa TA98 de *S. typhimurium*, contra 1-nitropireno, con una reducción de la mutagenicidad del 46% a una dilución de 1.25×10^{-5} (Arcila *et al.*, 2003). La cantidad de galangina y quercetina requerida para inhibir el 50 %

de la mutagenicidad de 20 mg del carcinógeno Trp-P-2 fue de 0.12 y de 0.81 mg, respectivamente, mientras que los extractos de hexano, cloruro de metilo y acetato de etilo de orégano presentaron la mayor actividad inhibitoria (68-72 %) (Kanazawa *et al.*, 1989).

El tectol y la lipidoquinona presentes en *L. sidoides* mostraron inhibición *in vitro* contra células humanas de leucemia promielocítica (HL60) y leucemia linfoblástica aguda (CEM) (Costa *et al.*, 2001). El aceite de *O. vulgare* (dilución hasta 1:10000) presentó altos niveles de citotoxicidad contra células de cáncer ovárico humano (Sivropoulous *et al.*, 1996; He *et al.*, 1997).

También *O. mejorana* presenta actividad antitumoral y citotóxica contra líneas tumorales (Assaf *et al.*, 1987; Okuyama *et al.*, 1995; Hirobe *et al.*, 1998).

Por otro lado, varios estudios clínicos han demostrado que *Orégano spp* presenta alergenidad, por lo que se debe evitar el consumo excesivo de *O vulgare* y *O. mejorana* durante el embarazo además de sus propiedades abortivas (Brinker *et al.*, 1998).

Las propiedades biológicas están íntimamente relacionadas con las fitoquímicos del orégano mexicano.

5.10. Características fitoquímicas del orégano mexicano

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, de extractos acuosos y aceites esenciales (Pascual *et al.*, 2001). Se ha identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Justasen y Knuthsen, 2001).

En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina. También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina (Wagner y Elmadfa, 2003; Hutchings y van Staden, 1994; Pascual *et al.*, 2001).

Las hojas y los tallos del orégano contiene aceite esencial, sustancias tónicas, un principio amargo, goma-resina, entre otras; la esencia tiene como componentes principal, el carvacrol, timol, alfafineno, cimeno, levógiro, terpenos, principalmente. Estos elementos le dan propiedades tónicas: amargo-excitante, antisépticas, expectorantes, diuréticas y sudoríficas; también se le considera un producto duradero de consumo final, ya que una vez deshidratado conserva sus propiedades y no sufre descomposición (Martínez, 1959; Ramayo y Herrera, 1976 y CONASUPO, 1985).

Estudios realizados a los extractos de *L. graveolens* han encontrado fenoles, flavonoides, ácido Rosmarínico y Naringenina, (Martínez *et al.*, 2008), en los aceites esenciales fueron encontrados: monoterpenos, carvacrol, timol, p-cimeno (Salgueiro *et al.*, 2003), y dos isómeros inusuales, 2-isopropil-4-metilfenol y 4-isopropil-2-metilfenol, (Vernin *et al.*, 2001).

5.11. Estructura química de los principales componentes en el orégano

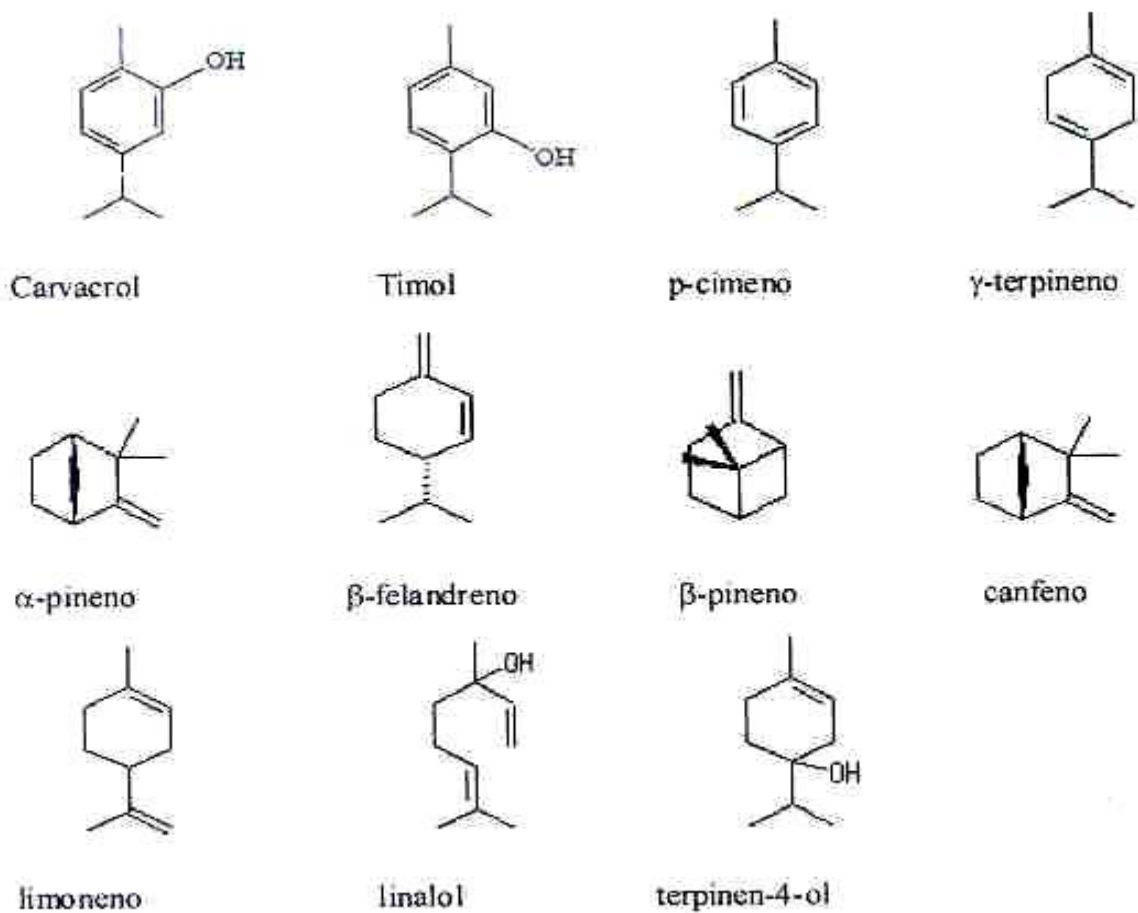
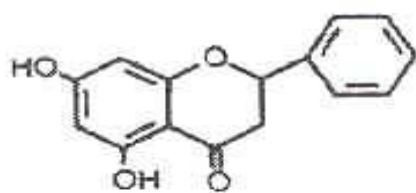
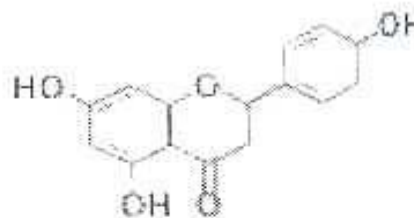


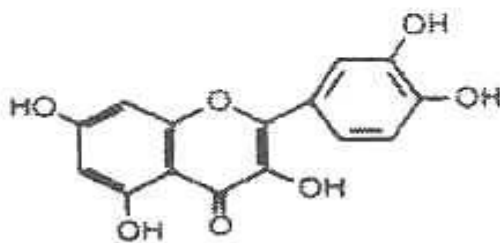
Figura 2. Estructura química de los principales componentes en el orégano (Ávila- Sosa *et al.*, 2002).



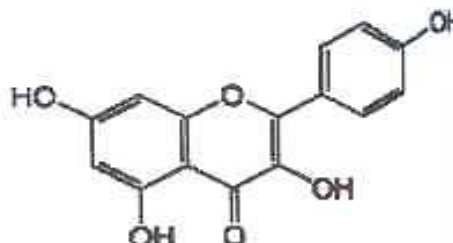
Pinocembrina



Naringenina



Quercetina



Kaempferol

Figura 3. Estructura química de los principales flavonoides en el orégano (Baricevik *et al.*, 2002).

5.12. Polifenoles

Los compuestos polifenólicos son un grupo muy amplio de moléculas relacionadas principalmente con el grupo de los taninos, sin embargo, existen muchas otras que entran en esta categoría, cuando no se describe en el sentido estricto de la estructura molecular, los principales grupos de taninos son las galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y los taninos condensados (flavonoles) (kanbabaee y Ree, 2001)

5.12.1. Cuantificación de compuestos fenólicos

Las primeras técnicas desarrolladas fueron técnicas espectrofotométricas, que si bien tienen interés desde el punto de vista del control de calidad, no aportan la suficiente información desde un punto de vista nutricional, por lo que ha sido necesario recurrir a técnicas más precisas, como las cromatográficas, que permitan la identificación individualizada de cada uno de los polifenoles de interés nutricional. (Ascacio, 2005).

La cuantificación e identificación de los componentes polifenólicos de los vegetales ha despertado un gran interés por su importancia, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de los vegetales. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación.

5.12.2. Antecedentes polifenólicos

La tendencia general con respecto al empleo de medicina tradicional o alternativa en el mundo se encuentra en aumento; en México, las plantas de semidesierto mexicano han sido empleadas en esta clase de medicina alternativa por presentar un efecto biológico amplio y precios más accesibles comparados con los fármacos de marcas registradas fabricados bajo rigurosos estándares de calidad que proveen entre otras cosas información

sobre el modo de empleo, la dosis recomendada y los efectos secundarios posibles.

Estas plantas son fuentes ricas en compuestos polifenólicos, los cuales según fuentes bibliográficas, tienen efectos nutraceuticos y curativos, sin embargo, hay dos aspectos importantes que deben considerarse en el estudio de dichas plantas:

- 1) La actividad biológica de los compuestos fenólicos se ve reducida y su toxicidad aumenta, conforme se incrementa su peso molecular.
- 2) En la actualidad se cuenta con muy poca información sobre el tipo de compuestos biológicamente activos que se encuentran presente en las plantas, por lo tanto es necesario caracterizar el tipo de fenoles propios de ellas. (Sobrevilla, 2007).

5.13. Cromatografía en columna

La cromatografía es una técnica que ha sufrido de muchas modificaciones tecnológicas desde su aparición, desde la cromatografía en capa fina conocida como thin layer, TLC por sus siglas en ingles hasta los actuales cartuchos cromatográficos específicos para determinados compuestos, además de la cromatografía de gases y de líquidos, que ayudan a la cuantificación de este tipo de moléculas, a continuación se describe la técnica cromatográfica en rellenos empacados en columna.

5.13.1. Definición de cromatografía en columna

La primera cromatografía líquida fue realizada en 1906, por el biólogo ruso Mikhail Tswett. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria se empaca dentro de un tubo estrecho generalmente de vidrio y a través de él se eluye la fase móvil por presión o al vacío (Skoog *et al.*, 2001).

5.13.2. Propiedades de la amberlita

Es un polímero en forma de cuentas blancas, aniónico, hidrofóbico de gran área superficial lo que le confiere propiedades adsorbentes (Figura 4). Este polímero adsorbe moléculas hidrofóbicas de solventes polares y compuestos volátiles orgánicos de mezclas gaseosas. Los compuestos a adsorber deben ser de peso molecular bajo a mediano.

Dentro de sus propiedades se sabe que: es un polímero de entrecruzamiento alifático microreticular; presenta una capacidad de retención de agua entre 62 a 70 %; una gravedad específica alrededor de 1.015 a 1.025; tamaño de partícula oscilante entre 0.56-0.71 mm; coeficiente de uniformidad ≤ 2.0 ; área de superficie $\geq 800 \text{ m}^2/\text{g}$; porosidad $\geq 0.55 \text{ ml/ml}$; rango de pH de 0-14 y temperatura máxima de 300 °F. Como dato adicional está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration).

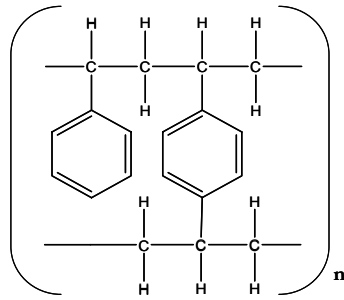


Figura 4: Estructura química del polímero adsorbente Amberlita XAD16. (http://www.advancedbiosciences.com/Bioprocessing_doc/english/xad16.PDF, 2007).

5.13.3. Obtención de fracciones acuosas y etanólicas

Para obtener las fracciones acuosas y etanólicas se emplea una columna con relleno de amberlita XAD-16 (ROHM and HAAS). La amberlita es lavada con etanol y equilibrada con agua desionizada al menos 12 h antes de su uso.

La resina equilibrada se empaca dentro de una columna al vacío, posteriormente el filtrado es adsorbido en la columna que se eluyó con agua desionizada hasta que el líquido eluído sea incoloro (aproximadamente 50 ml), de manera siguiente, el agua es sustituida con etanol absoluto grado industrial como eluente hasta obtener nuevamente un líquido incoloro.

En caso de las fracciones etanolicas es necesario remover el solvente, esto se logra con la ayuda de un vaporizador (Reacti-Vap) con el cual se hace pasar corrientes de Helio sobre la superficie de las fracciones mediante agujas que se mantienen cercanas al borde del líquido sin hacer contacto directo con éste; para acelerar el proceso de evaporación los tubos con las fracciones se mantiene dentro de un baño con agua a una temperatura no mayor a 60 °C. Después de la eliminación del etanol, las muestras son resuspendidas en agua y mediante el procedimiento anteriormente mencionado se liofilizan. De igual manera que a los liofilizados crudos, las fracciones liofilizadas se resuspenden en agua para la determinación de su contenido de azúcares, galotaninos y taninos condensados. (Sobrevilla, 2007)

5.14. Antecedentes de *Penicillium* sp.

Penicillium sp. es un género de hongos ascomicetos de gran importancia en el medio ambiente, la alimentación y la producción de drogas. Que produce [la penicilina](#), una molécula que se utiliza como un antibiótico que mata o detiene el crecimiento de ciertos tipos de bacterias dentro del cuerpo (Harshberger, 1917).

Cuadro 2: Clasificación científica de *Penicillium* sp.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Eucosmyetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Genero	Penicillium Link, 1809

5.14.1. Características del *Penicillium* sp.

El micelio normalmente consiste en una red muy ramificada de multinucleadas, septadas, las hifas generalmente incolora. Muchos conidióforos ramificados brotar en el micelio, teniendo conidiosporas individual restringido. La conidiosporas, son la ruta de dispersión principales de los hongos, y, a menudo de color verde.

La reproducción sexual implica la producción de [ascosporas](#), que comienza con la fusión de una ascogonium y un [anteridio](#), con participación de los núcleos. El [ascos](#) irregularly distribuidos contienen ocho ascosporas unicelulares cada uno (Harshberger, 1917).

5.14.2. Ecología

Las especies de *Penicillium* son hongos del suelo en todas partes prefieren los climas frescos y moderados, comúnmente presente allí donde la materia orgánica disponible. Especies saprofíticos de *Penicillium* y *Aspergillus* son algunos de los representantes más conocidos de la Eurotiales y viven principalmente en sustancias orgánicas biodegradables. Ellos son comúnmente conocidos como moldes y se encuentran entre las principales causas de deterioro de los alimentos. Muchas especies producen micotoxinas altamente tóxicos. Algunas especies tienen un color azul, cada vez más comúnmente en el pan viejo y darle una textura difusa azul (Harshberger, 1917).

5.14.3. Valor Económico

Varias especies de *Penicillium* desempeñan un papel central en la producción de queso y de productos cárnicos diversos. Camembert *Penicillium* y *Penicillium* Roquefort son los moldes de Camembert, Brie, Roquefort y de muchos otros quesos. Nalgiovense *Penicillium* se utiliza para mejorar el sabor de los embutidos y jamones y para prevenir la colonización por otros mohos y bacterias (Harshberger, 1917).

Además de su importancia en la industria alimentaria, las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* sirven en la producción de un número de enzimas producidas biotecnológicamente y otras macromoléculas, como el glucónico, ácido tartárico y cítrico, así como varios pectinasas, lipasas, amilasas, celulasas y proteasas (Harshberger, 1917).

6. METODOLOGIA

6.1. Recolección y tratamiento de la planta

L. graveolens fue colectada durante septiembre a noviembre del 2007, en el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila, coordenadas 25° 00' 00.11" N, 103° 14' 33.54" O, elevación 1320 msnm.



Figura 5: Planta de orégano (*Lippia graveolens*) en floración.

(www.thedauphins.net/rgv_native_trees_shrubs.html)

6.2. Conservación del material vegetal

Las hojas de *L. graveolens*, se colocaron en una hielera para darle condiciones adecuadas para ser transportadas al laboratorio de fitoquímica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en donde se colocaron en un cuarto frío y se prepararon para la obtención de extractos.

6.3. Obtención y determinación de rendimiento del extracto etanólico de *L. graveolens*.

Para la obtención del extracto etanólico se empleó el procedimiento reportado por Jasso *et al.*, (2007). Los extractos crudos fueron proporcionados por el laboratorio de fitoquímica, a partir de extractos obtenidos para una tesis de maestría en ciencias.

6.4. Obtención del microorganismo alterante de frutos

Penicillium sp. fue colectado de frutos de manzana, que presentaba síntomas característicos causados por hongos de postcosecha, tales como: necrosamiento, antracnosis y pudriciones. Se realizaron cortes pequeños en el área de avance de la enfermedad de los frutos. Los cortes se desinfectaron en solución de cloro al 3 % por 3 min, se enjuagaron tres veces con agua esterilizada y se secaron en papel estéril; después se sembraron en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Una vez que se observó crecimiento de algún hongo, éste fue inoculado en una nueva caja Petri con medio PDA, para ser identificados (Barnett y Hunter, 1972; Agrios, 2004).



Figura 9: Proceso de desinfección a través de lavado con agua clorada

Se hicieron diluciones con una suspensión de esporas o puntas de hifa (1:1 hasta 1:5) para obtener cultivos monospóricos (Fig. 10).



Figura 10: Dilución de esporas de *Penicillium* sp. 1:1 hasta 1:5

La identificación del hongo se realizó con la ayuda de la descripción de microorganismos en *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, Third Edition. (Barnett y Hunter, 1972), y la información fue actualizada con el libro *fitopatología G. N. Agrios* segunda edición, (Agrios, 2004).



Figura 11: Identificación del hongo *Penicillium* sp.

6.5. Propagación del microorganismo aislado

Para el aislamiento de los hongos patógenos se usó el medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA). La técnica de preparado de las cajas Petri con PDA consiste en poner 39 g de PDA a un matraz Erlen-Meyer de 2 l y posteriormente agregar 1 l los resultados de crecimiento micelial y producción de esporas, el extracto etanólico de *L. graveolens* obteniendo los resultados de inhibición al 100 %, en el desarrollo del micelio de *Penicillium* sp. en 3000 ppm y a las esporas en 2000 ppm, en la primera. Y crecimiento micelial y producción de esporas, obteniendo resultados de inhibición al 100 % en el desarrollo del micelio de *Penicillium* sp. en 20000 ppm y las esporas en 10000 ppm en la segunda etapa.

Tomar 1 l de agua destilada y poner a hervir en una estufa eléctrica para que se disuelva completamente el agar en el agua.

Posteriormente el matraz con el medio de cultivo se esterilizó a 15 libras de presión durante 20 min en una autoclave. Finalmente el medio de cultivo se dejó enfriar y se vació en cajas Petri. Se colocaron discos de micelio en la parte central de la caja con PDA y se dejaron en incubación a 28 °C por una semana.

6.5.1. Bioensayos del extracto etanólico de *L. graveolens*

La efectividad del extracto en la inhibición del crecimiento micelial y esporulación fue probada a diferentes concentraciones: 0, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ppm.

Los extractos en las diferentes dosis fueron agregados en el medio PDA (aún líquido), y perfectamente mezclados se vaciaron en cajas Petri, con 4 repeticiones por cada dosis (Figura 12).



Figura 12: Mezcla de PDA y extracto

Se colocaron los explantes con el hongo en el centro de la caja Petri con el medio de cultivo y extracto, donde se tomaron datos de crecimiento radial del micelio y observación de desarrollo de esporas.

6.5.2. Efecto del extracto etanólico de *L. graveolens* en la inhibición micelial y esporulación

En este trabajo se consideró el crecimiento micelial que fue medido en su radio y en 4 repeticiones por tratamiento, los resultados fueron analizados para construir gráficas y para realizar el ANVA y el coeficiente de variación.

6.6. Activación de la amberlita

1. Para el lavado de la amberlita se utilizó etanol para eliminar las resinas presentes, se adicionó etanol a un volumen superior a los 5 cm por encima de la amberlita, se agitó y se dejó reposar por 15 min.
2. La separación del etanol fue por el método de decantación para liberar la amberlita de este solvente.
3. En el lavado de la amberlita se le adicionó agua desionizada hasta 2.5 cm por encima de la amberlita y se agitó de 5-10 min.
4. Se preparó la columna adicionando agua desionizada y manteniendo húmeda la superficie.
5. Se deslizó la amberlita poco a poco en la columna permitiendo que se empacara uniformemente.
6. Se mantuvo con agua el vaso las veces que fue necesario para no permitir que se secase la resina.
7. Después de activada la amberlita, la columna fue llenada con la amberlita en agua, eliminando el aire atrapado en la misma.

6.7. Obtención de azúcares y polifenoles hidrosolubles

Para este procedimiento se requirió un total de 107.974 g de extracto etanólico de *L. graveolens*.

Con los cuales se siguió el procedimiento que a continuación se menciona:

1. Se adicionó un promedio de 1.661 g de extracto etanólico de *L. graveolens* en 100 ml de agua desionizada.
2. Se deslizó por las orillas de la columna obteniendo 3 fracciones diferentes: azúcares totales, fracción rica en polifenoles y fracción pobre en polifenoles (desechos etanólicos) (Figura 14).
3. El etanol se removió de la fracción polifenólica con un rotavapor a una temperatura de 55 °C. Esto se llevo a cabo con 1000 ml de muestra rica y otra de 1560 ml de muestra pobre en polifenoles.
4. Se procedió a liofilizar la muestra para obtener los cristales de polifenoles.
5. El polvo obtenido se aplicó en hongos para ver su acción antifúngica en aplicaciones de 0, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000 y 50000 ppm, con 4 repeticiones cada uno.



Figura 14: obtención de azúcares y polifenoles hidrosolubles en columna de amberlita

6.7.1. Cuantificación de la fracción polifenólica

Siguiendo el procedimiento propuesto por Makkar *et al.* (1993), sobre la cuantificación de fenoles hidrosolubles, Se preparó una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico 10 ml a 500 ppm, después se tomó 1 ml de la solución, se pasó a 4 ml (100 ppm) de agua filtrada por 0.45 μ l, y se empleó una muestra de 400 μ l, se agregó solución de Folin- Cicalteu 400 μ l, se agitó y reposó por 5 min a temperatura ambiente.

Después se anexó Na_2CO_3 0.01m 400 μ l, se agitó y reposó durante 1 min a temperatura ambiente. Siguiendo con agua destilada 2 ml, se leyó en un espectrofotómetro (thermo spectronic) a 750 nm. Esta prueba se hizo por triplicado y se procedió igual con la curva.

6.7.2. Cuantificación de azúcares totales

El método utilizado para la cuantificación de azúcares fue el propuesto por Dubois *et al.* (1956) en el cual se utilizó los siguientes reactivos: Glucosa 200 ppm (control para la cura patrón), H₂SO₄ concentrado, Fenol 5 % (2.5 g de fenol en 50 ml de agua).

Preparación de la glucosa: Se pesaron 2 mg de glucosa y se vació a una probeta de 10ml y se aforo con agua y se aforo hasta 10 ml, se mantuvo la solución en refrigeración.

Procedimiento: Se utilizó 240 ml de muestra, agregándole: Fenol 5 % 250 ml, Baño de hielo por 5 m, H₂SO₄ concentrado 1000 µl o 1 ml, se la solución en un baño con agua en ebullición por 5 min, se agitó y colocó en baño de hielo por 5 min, se enfrió y leyó en un espectrofotómetro a 488 nm.

Los azúcares totales fueron cuantificados por el método de Dubois *et al.* (1956) que nos dice que la absorbancia esta relacionado con las concentraciones por el cual se hizo un cuadro de calibración

6.8. Liofilización de las fracciones polifenólicas

Los compuestos polifenólicos hidrosolubles (fracción rica y pobre) fueron congelados a -20 °C y deshidratados en un liofilizador durante 7 días hasta que se dejó de observar humedad en la muestra y así obtener los cristales polifenólicos. Para este proyecto se utilizó un liofilizador marca Labconco con una capacidad de 4.5 l. Y 10 micras de vacío con una temperatura de hasta -50°C.

6.9. Bioensayos de la fracción polifenólica

La efectividad de la fracción polifenólica en la inhibición del crecimiento micelial y esporulación fue probado a diferentes concentraciones: 0, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000 ppm.

Los cristales en las diferentes dosis fueron agregados en el medio PDA (aun liquido) y perfectamente mezclados se vaciaron en cajas Petri, con 4 repeticiones por cada dosis, para luego ser inoculados con *Penicillium* sp. el radio de crecimiento fue medido con una regla y la observación de la producción de esporas.

La actividad biológica de los polifenoles sobre *Penicillium* sp. fue observada durante 20 d para confirmar el potencial antifúngico, los datos obtenidos fueron evaluados (Tukey 0.05 %)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Resultados del rendimiento obtenido de extracto etanólico de *L. graveolens*

El rendimiento de extracto etanólico de *L. graveolens* fue de 5.44 %.

Este resultado contrasta con los encontrados por Morales (2004) y Del Cid (2005), que obtuvieron un rendimiento de extracto etanólico del *L. graveolens* de 9.20 y 20.10 %, probablemente estas diferencias son debido a la metodología de extracción, ya que ellos utilizaron percoladores y una mezcla de etanol con diferentes grados de polaridad.

7.2. Resultados del efecto del extracto etanólico de *Lippia graveolens* en el desarrollo del micelio y esporas

El ANVA mostró diferencia altamente significativa entre los tratamientos ($P < 0.01$) (Cuadro 4). El crecimiento micelial fue inhibido en diferentes porcentajes con las dosis evaluadas, pero en la comparación de medias del crecimiento micelial las dosis de 2000 a 5000 ppm, donde el crecimiento micelial fue inhibido al 100 %, fueron estadísticamente iguales (Cuadro 3). La dosis menor de 500 ppm inhibió a *Penicillium* sp. en 52 %, seguida de la dosis de 1000 ppm que inhibió el 76 %, pero la inhibición del 100 % fue a partir de la dosis de 2000 hasta 5000 ppm (Figura 15). En cuanto al desarrollo de esporas la inhibición total se presentó desde 2000 ppm.

En el presente trabajo *L. graveolens* mostró la capacidad antifúngica de esta especie sobre *Penicillium* sp., hongo causante de pudriciones en frutos en postcosecha, la inhibición del crecimiento del micelio se atribuye al contenido de timol y carvacrol que son

compuestos naturales de esta planta con actividad antimicrobial (Salgueiro *et al.*, 2003). Por otra parte, otros investigadores confirman el potencial antifúngico de esta planta como Obledo (2002) que encontró actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, y Hernández (2008) que reportó inhibición micelial contra *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *F. sporotrichum* y *Rhizoctonia solani*.

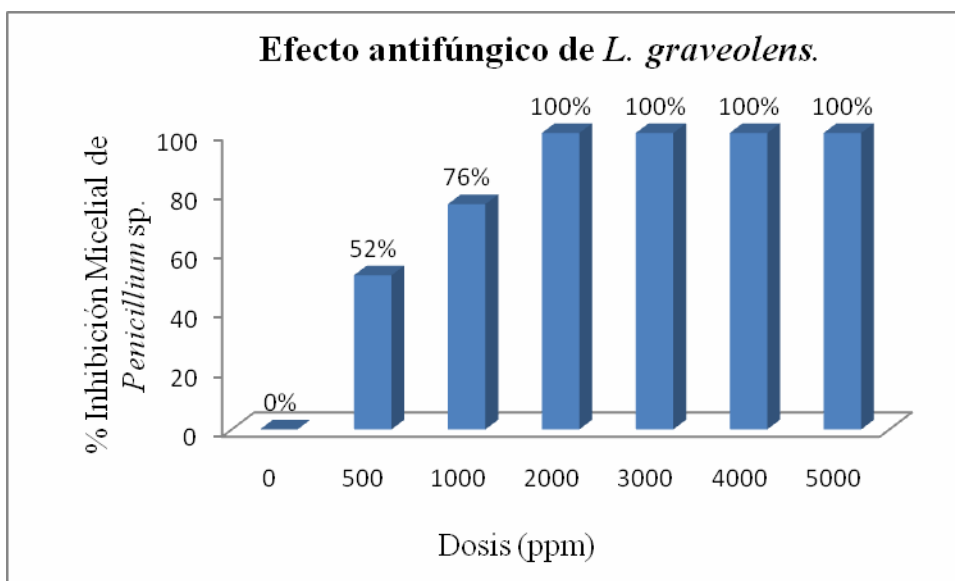


Figura 15. Efecto del extracto etanólico de *L. graveolens* sobre el crecimiento micelial de *Penicillium* sp.

Cuadro 3. Diferencia de medias del crecimiento radial del micelio de *Penicillium* sp. por efecto de inhibición del extracto etanólico de *L. graveolens*. Tukey 0.05 %.

Diferencia de medias	Crecimiento Radial del Micelio de <i>Penicillium</i> sp (cm)	Tratamientos (ppm)
A	2.50	0
B	1.05	500
C	0.62	1000
D	0.00	2000
D	0.00	3000
D	0.00	4000
D	0.00	5000

Cuadro 4. ANVA elaborado con los datos de crecimiento del radio micelial de extracto etanólico de *L. graveolens*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F calculada	Pr > F
Modelo	6	21.01	3.50 **	247.20	<.0001
Error	21	0.29	0.01		
Total corregido	27	21.30			
Coefficiente de variación	19.95 %				

** Diferencia altamente significativa con un nivel de probabilidad de 0.05%.

7.3. Resultados obtenidos de las fracciones polifenólicas (rica y pobre) después de extraer el solvente

En la extracción etanólica con rotavapor se obtuvo un residual polifenólico (muestra rica y pobre) de 480 y 90 ml.

7.4. Rendimiento obtenido en la liofilización de las fracciones polifenólicas y cuantificación de polifenoles

Los rendimientos de las fracciones polifenólicas fueron en promedio de 11.20 mg/ml en la rica y 2.33 mg/ml en la pobre con una dilución de 1: 80, mostrando diferencia en la intensidad del color característico, amarillo y un desecho resinoso con color café.

7.5. Actividad antifúngica de los polifenoles hidrosolubles del extracto etanólico de *L. graveolens* sobre *Penicillium* sp.

En la prueba antifúngica de polifenoles hidrosolubles se obtuvo que la diferencia entre tratamientos fue altamente significativa ($P < 0.01$) (Cuadro 5) y que las dosis de 20000 a 50000 ppm fueron estadísticamente iguales (Tukey 0.05 %) (Cuadro 6).

La presencia de micelio y esporas se presentaron en diferentes días después de la inoculación; en el primer día la presencia de micelio y esporas se presentaron en el tratamiento testigo (0 ppm), mientras que en los tratamientos con polifenoles mostraron crecimiento más tarde (Figura 16); en el segundo día el tratamiento de 5000 ppm tuvo

crecimiento micelial y esporulación y en la dosis de 10000 ppm mostró desarrollo micelial pero no esporulación y la inhibición total del desarrollo de *Penicillium* sp. fue a partir de la dosis de 20000 hasta la dosis de 50000 ppm (Figura 17).



Figura 16. Resultado micelial polifenólico

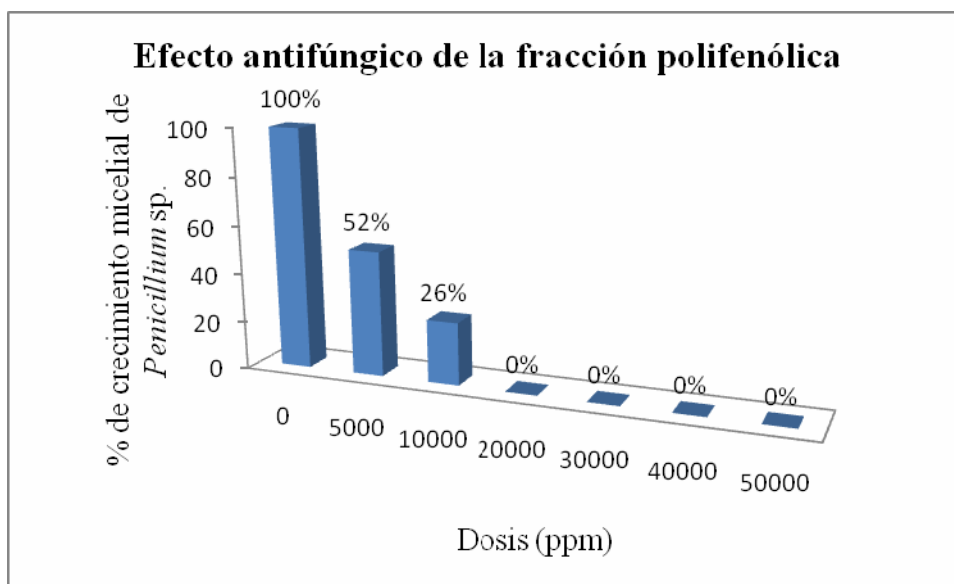


Figura 17. Efecto antifúngico de la fracción polifenólica del extracto etanólico de *L. graveoles*.

Cuadro 5. ANVA elaborado con los datos de crecimiento del radio micelial de *Penicillium* sp. con polifenoles de extracto etanólico de *L. graveolens*.

Fuentes	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F calculada	Pr >F
Tratamiento	6	22.13	3.68	55.73	<.0001
Error	21	1.39	0.06		
Total corregido	27	23.52			
C. V.	40.4 %				

El nivel de probabilidad se manejo a 0.0001 porque la diferencia de los tratamientos es altamente significativa. El coeficiente de variación es aceptable debido a que un análisis estadístico no debe ser mayor a 40%.

Cuadro 6. Diferencia de medias del crecimiento micelial de *Penicillium* sp. por efecto de los polifenoles de extracto etanólico de *L. graveolens*.

Diferencia de medias	Crecimiento Micelial de <i>Penicillium</i> sp. (cm)	Tratamiento
A	2.5000	0
B	1.3000	5000
C	0.6500	10000
D	0.0000	20000
D	0.0000	30000
D	0.0000	40000
D	0.0000	50000

7.6. Resultados del efecto del extracto etanólico de *L. graveolens* en la esporulación

El efecto del extracto sobre la capacidad de esporulación del hongo utilizado en este trabajo esta muy relacionada con el la inhibición micelial, Pero existen algunos casos donde el crecimiento micelial no fue inhibido y la esporulación si.

7.7. Cuantificación de polifenoles hidrosolubles y azúcares totales

7.7.1. Obtención y cuantificación de azúcares totales

Los azúcares totales se obtuvieron a través del primer filtrado del extracto etanólico en el tubo de amberlita el cual fué diluido con agua, una vez obtenido este filtrado se obtuvo un líquido de color turbio intenso.

En la curva de calibración se manejó con cantidades conocidas de 0 a 200 ppm (Cuadro 7). Con los datos obtenidos de la absorbancia de calibración se procedió a cuantificar los azúcares el cual resultó un promedio de 1.22 mg. sin dilución (Cuadro 9) y 1.26 mg. con dilución 1:80 (Cuadro 8).

Cuadro 7. promedio de azúcares totales

Ppm	Absorbancia
0	0
25	0.25
50	0.509
100	0.856
150	1.189
200	1.543

Cuadro 8. Cuantificación de azúcares totales con dilución (1:80); absorbancia

Muestras	Absorbancia	Promedio de azúcares totales (ppm)	Dilución 1:80	mg/ml	Promedio
m1	0.13	9.78	782.93	0.78	1.25
m2	0.19	17.12	1369.60	1.36	
m3	0.21	20.32	1625.60	1.62	

Cuadro 9. Cuantificación de azúcares totales sin dilución; absorbancia

Muestras	Absorbancia	Promedio de azúcares totales (ppm)	mg/ml	Promedio
m1	0.53	63.12	6.31	12.23
m2	0.49	57.25	5.72	
m3	1.91	246.45	24.64	

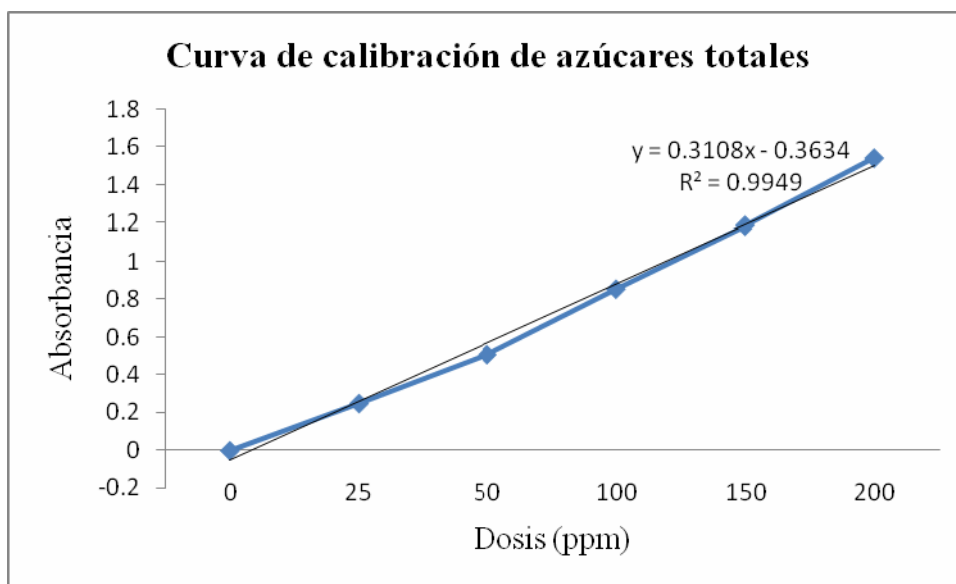


Figura 18. Cuantificación de azúcares totales

7.7.2. Cuantificación de polifenoles

Cuadro 10. Promedio de polifenoles totales según, Makkar *et al.* (1993)

Ppm	Absorbancia
0	0
100	0.15
200	0.57
300	0.83
400	1.19
500	1.41

Cuadro 11. Promedio de la muestra rica en polifenoles totales según Makkar, *et al.* (1993)

M Rica polifenoles	Absorbancia	Promedio de polifenoles hidrosolubles (ppm)	1:80 dilución	mg/ml	Promedio
m1	0.28	113.43	9074.66	9.07	11.20
m2	0.37	143.76	11501.33	11.50	
m3	0.43	163.10	13048.00	13.04	

Cuadro 12. Promedio de la muestra pobre en polifenoles hidrosolubles con dilución 1:80 según Makkar, *et al.* (1993).

M Pobre polifenoles	Absorbancia	Promedio de polifenoles hidrosolubles (ppm)	1:80 dilución	mg/ml	promedio
M1	0.03	30.93	2474.66	2.47	2.33
M2	0.03	28.60	2288.00	2.28	
M3	0.03	27.93	2234.66	2.23	

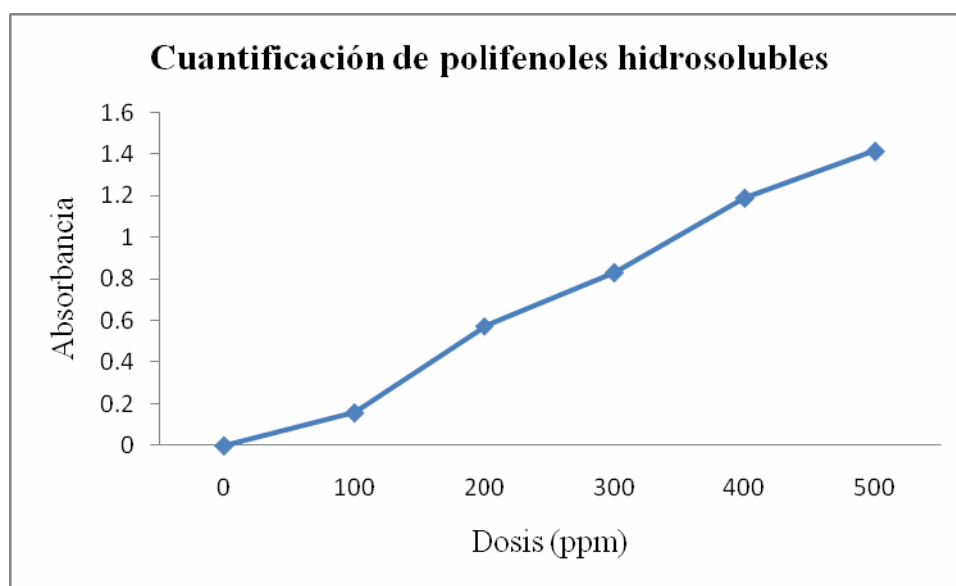


Figura 19. Cuantificación de polifenoles hidrosolubles

7.8. Extracción de Polifenoles

En este procedimiento se obtuvo un total de 17.39 g de polifenoles totales hidrosolubles liofilizados.

8. CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de *L. graveolens* mostraron inhibición en el desarrollo de *Penicillium* sp. en dosis bajas por lo que se puede concluir que su capacidad antifúngica contra este hongo es de una alta eficiencia para el tratamiento de este patógeno que causa enfermedades en frutos postcosecha.

Los polifenoles hidrosolubles obtenidos demostraron tener actividad antifúngica muy eficiente en las dosis utilizadas, mostrando que en las dosis utilizadas la inhibición del hongo fue total por lo que se puede concluir que este tipo de polifenoles puedan ser utilizada en tratamientos de frutos de postcosecha y así evitar enfermedades y pudriciones.

Este es el primer reporte de la actividad antifúngica de polifenoles hidrosolubles obtenidos del extracto etanólico de *L. graveolens* por lo que esta investigación contribuye al conocimiento científico de esta planta nativa del desierto Chihuahuense de México.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbassy Moustafa A., Abdelgaleil Samir A. M., Belal Abdel- Salam H., Abdel Rasoul A.A., 2007. Insecticidal, antifeedant and antifungal activities of two glucosides isolated from the seeds of *Simmondsia chinensis*. Industrial Corps and Products. Pp. 26, 345-350.
2. Agrios George N., 2004. Fitopatología. Departamento de Fitopatología, Universidad de Massachusetts. Segunda Edición.
3. Alcalá de Marcano D., Vargas N., Pire A., 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Revista de la Facultad de Agronomía 22. Pp. 4.
4. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 2001; 49. Pp. 4168-4170.

5. Amzad Hossain M., Ismail Zhari, Rahman Atiqur, Chul Kang Sun. 2008. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth Industrial Crops and Products. Pp. 27, 328-334.

6. Assaf MH, Ali AA, Makboul MA, Beck JP, Anton R. Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorama*, quantitative estimation of arbutin cytotoxicity activity of hydroquinone. *Planta-Medica* 1987; 53 (4). Pp. 343-345.

7. Arcila C, Loarca-Piña G, Lecona-Uribe S, González de Mejía E. Biological activity and composition of essential oil from Mexican oregano. *Botanical and Dietary Supplements for Woman's Health: Frontiers in Research. Functional Foods for Health Program 12th Annual Conference, July 9-11 2003; Schaumburg, IL.*

8. Ascacio-Valdéz Juan Alberto. Obtencion de acido elagico de Fuentes no convencionales, 2007. Pp. 25.

9. Ávila-Sosa R, Ávila-Camacho A, Torres-Muñoz JV, Gastélum-Franco MG, Nevárez-Moorillón GV. Antioxidant and antimicrobial capacity of Mexican Orégano. IFT Annual Meeting, 2002. Pp. 46C-32.

10. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipids bilayers, J. Sci. Food and Agric. 1999. Pp. 2010-2016.

11. Bajpai Vivek K., Rahman Atiqur, Chul Kang Sun, 2007. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu., Industrial Crops and Products. Pp. 26, 28-35.

12. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SJ, Biondi DM, Ruberto G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. J. Essent. Oil Res. 1998. Pp. 618-627.

13. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragrance J.* 1998. Pp. 235-244.
14. Baricevik D, Bartol T. In: *Oregano. The genera Origanum and Lippia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles.* Edited by Spiridon E. Kintzios, Athens, Greece. Taylor and Francis. London and New York. 2002. Pp. 177-213.
15. Barnett H.L., Barry B. Hunter, 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi.* Third Edition.
16. Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore SA. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochem.* 2003. Pp. 209-212.
17. Burt SA, Reinders RD, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Applied Microbiol.* 2003. Pp. 162-167.

18. Brinker F. Herb contraindications and drug interactions. Eclectic Medical Publ. Sandy, Oregon 1998. Pp. 263.

19. Calucci L, Pinzino C, Zandomenoghi M, Capocchi A, Ghiringhelli S, Saviozzi F, Tozzi S, Galleschi L. Effects of g-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. J. Agric. Food Chem. 2003. Pp. 927-934.

20. Chapagain Bishnu P., Zeev Wiesmanand Leah Tsrer (Lahkim), 2007 *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. Industrial Crops and Products. Pp. 26, 109-115.

21. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palma, F. *In vitro* antimicrobial activity and composition of Sardinian Thymus essential oils. Lett. Appl. Microbiol. 1999. Pp. 130-135.

22. Costa SMO, Lemos TLG, Pessoa OD., Pessoa C, Montenegro RC. Braz-Filho R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. J. Nat. Prod. 2001. Pp. 792-795.
23. De-Oliveira ACAX, Ribeiro-Pinto LF, Paumgartten FJR. *In vitro* inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpene compound. Tox Lett. 1999. Pp. 39-46.
24. Deighton N, Gridewell S M, Deans S J, Groodman B A. Identification by EPR spectroscopy of Carvacrol and Thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. J. Sci. Food Agric. 1993. Pp. 221-225.
25. Del Cid Aldana E., 2005. Actividad de 17 extractos de 12 plantas nativas guatemaltecas contra *fonsecaea pedrosoi*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Pp. 13-15.

26. Dubois, M., Guilles, K. A. Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F, 1956.
“Colorimetric Method For Determination of Sugar and Related Substances”.
Chemical Analysis. Pp.530.
27. Elgayyar M, Draughon F., Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of
essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic
microorganisms. J. Food Protect. 2001. Pp.1019-1024.
28. Frigo DE, Duong BN, Melnik LI, Schief LS, Collins-Burow BM, Pace DK,
McLachlan JA, Burow ME. Flavonoid phytochemicals regulate activator protein-1
signal transduction pathways in endometrial and kidney stable cell lines. Am Soc.
Nutr. Sci. 2002. Pp. 1848-1853.
29. Gloria-Hernández Gilberto, Pérez-Romero Luis, López-González Juan J., Martínez-
Rocha Ariadna, Puga Rosa, Hernández-Sandoval Luis, Loarca-Piña, Guadalupe,
Mendoza Sandra. 2008. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican
Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Plant Foods Hum Nutr. 63, 1-5.

30. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999. Pp. 985-990.
31. Harshberger, JW *A Text-Book of Mycology and Plant Pathology.* Hershberger, JW un libro de texto de Micología y Patología Vegetal. Churchill Livingstone 1917.
32. He L, Mo H, Hadisusilo S, Quresh, AA, Elson CE. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. *Am Soc Nutr Sci.* 1997. Pp. 668-673.
33. Hirobe C, Qiao ZS, Takeya K, Ibokawa H. Cytotoxic principles from *Majorama Syriaca*. *Nat. Med.* 1998. Pp. 74-77.
34. Howes M-JR, Houghton PJ, Barlow DJ, Pocock VJ, Milligan SR, Assessment of estrogenic activity in some common essential oil constituents. *J. Pharmacy Pharmacol.* 2002. Pp. 1521-1528.

35. **Huerta, C.** 2005. Orégano Mexicano: oro vegetal. Conabio.

Disponible en:

http://www.conabio.gob.mx/institución/conabio_espanol/doctos/indice15.html

36. Hutchings A, van Staden J. Plants for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: Plants used for headaches. J. Ethnopharmacol. 1994. Pp. 89-124.

37. Isman M. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. 2000. Pp. 603-608.

38. Jasso de Rodríguez D., Hernández- Castillo D., Angulo-Sánchez J.L., Rodríguez- García R., Villarreal- Quintanilla J.A., Lira-Saldivar R.H., 2007. Antifungal activity *in vitro* of Flourensia spp. Extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. Industrial Crops and Products. Pp. 111-116.

39. Kanazawa K, Kawasaki H, Samejima K, Ashida H, Danno G. Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against a dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 1995. Pp. 404-409.
40. Kahkoren MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J-P, Pihlaja, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1999. Pp. 3954-3962.
41. Ku-Ucan José Gaspar. 2008. Actividad antimicrobiana de extractos de oregano (*Lippa graveolens*) contra microorganismos fitopatógenos. Pp. 5
42. Kuskoski Eugenia, Roseane Fettl, García A. Agustín, Troncoso G. *Ana*, 2005.
43. Lam LKT, Zheng B. Effects of essential oils on Glutathione S-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.* 1991. Pp. 660-662.
44. Lamiri A, Lhaloui S, Benjilali B, Berrada M. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.* 2001. Pp. 9-15.

45. Lecona-Uribe S, Loarca-Piña F G, Arcila-Lozano C, Díaz-Moscoso C, Ocampo R. Nutraceutical potential of Mexican oregano (*Lippia graveolens* K). IFT Annual Meeting, 2003. Pp. 14-28.
46. Loza-Tavera H. Monoterpenes in essential oils. Biosynthesis and properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999. Pp. 49-62.
47. Macarena-Stuardo Ricardo, San Martín, 2008. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*. Pp. 296-302.
48. Madsen HL, Rud Nielsen B, Bertelsen G, Skibsted LH. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chem.* 1996. Pp. 331-337.
49. Martínez-Domínguez M. Detección y evaluación de orégano (*Lippia berlandieri* Shawer) en las zonas del norte de Jalisco y suroeste de Zacatecas. Universidad

Autónoma Chapingo, Chapingo (México). División de Ciencias Forestales. 1990.
Pp. 145 (Tesis)

50. Martínez-Rocha, A., Puga, R., Hernández-Sandoval, A., Loarca-Piña, F., Mendoza, S., 2008. Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Plant Foods for Human Nutrition. Pp. 1-5.

51. Martínez-Tomé M, Jiménez AM, Ruggieri S, Frega N, Strabbioli R, Murcia MA. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. J. Food Protect. 2001. Pp. 1412-1419.

52. Moure A, Cruz J M, Franco D, Domínguez J M, Sineiro J, Domínguez H, Núñez M J and Parajó J C. Natural antioxidants from residual sources. Food Chem. 2001. Pp. 145-171.

53. Morales-Medina Aide. Studio farmacologico de los extractos etanolicos, hexanicos, cloroformico, acetate de etilo y acuoso de las hojas del oregano (*L. graveolens HBK*). 2004. Pp. 8-9.

54. Nakatani N, Kikuzaki H. A new antioxidative glycoside isolates from oregano. Agric. Biol. Chem. 1987. Pp. 2727.
55. Nakate M, Kanazawa K, Mizuno M, Ueno N, Kobayashi T, Danno G, Minamoto S. Herb-water extracts markedly suppress the mutagenicity of Try-P-2. Agric. Biol. Chem. 1989. Pp. 1423-1425.
56. Okuyama T, Matsuda M, Masuda Y, Baba M, Masubuchi H, Adachi M, Okada Y, Hashimoto T, Zou LB, Nishino H. Studies on cancer bio-chemoprevention of natural resources. X. Inhibitory effect of species on TPA-enhanced 3H-choline incorporation in phospholipids of C3H 10T ½ cells and TPA-induced mouse ear edema. Clin. Pharm. J. 1995. Pp. 421-430.
57. Oladimeji FA, Orafidiya OO, Ogunniyi TAB, Adewunmi TA. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. J. Ethnopharmacol. 2000. Pp. 305-311.

58. Paludosi, S. 1997. Orégano: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. In IPCRI International workshop on orégano. Proceedings. Rome, Italia, CIHFAM. Pp. 176.
59. Pascual M, Retardando K, Carretero E, Sanchez MD, Villar, A. 2001. Lippia: Los usos tradicionales, química y la farmacología: Una revisión. J Ethnopharmacol. Pp. 201 - 214.
60. Pinto Eugenia, Ribeiro-Salgueiro Lígia, Cavaleiro Carlos, Palmeira Ana, Gonçalves María José, 2007. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. Industrial Crops and Products. Pp. 26, 135-141.
61. Ponce-Macotela M, Navarro-Alegria I, Martinez-Gordillo MN, Alvarez-Chacon R. *in vitro* effect against *Giardia* of 14 plant extracts. Rev. Invest. Clin. 1994. Pp. 343-347.

62. Prates HT, Santos JP, Waquil JM, Fabris JD, Oliveira AB, Foster JE. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbs). J. Stored Prod. Res. 1998. Pp. 243-249.
63. Rajalakshmi D, Narasimhan S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D.K. (eds). Food Antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives. Marcel Dekker, Inc. 1996. Pp. 65-157.
64. Rivas Zulay, Márquez Rómulo, Troncone Federico, Sánchez José, Colina Marinela, Hernández Paola, 2005. Contribución de principales ríos tributarios a la contaminación y eutrofización del Lago de Maracaibo. Ciencia. Pp. 13, 68-77.
65. Ronquillo B, FA. 1998. Plantas de uso actual y potencial en alimentación y medicinas de las zonas semiáridas del nor- oriente de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. Pp 115.
66. Saeberg AC, Labbe RG, Shetty K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by elite clonal extracts of oregano (*Origanum vulgare*). Food Biotechnol. 2003. Pp. 129-149.

67. Sagdic O, Kuscu A, Ozcan M, Ozcelik S. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiol. 2002. Pp. 473-480.
68. Salgueiro, L.R., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Cunha, A.P. da, 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. Planta Medica. Pp. 69, 80-83.
69. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic Antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1992. Pp. 67-103.
70. Shahidi F, Naczk M. Antioxidant properties of food phenolics. In: Food phenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Technomic. Pub, Co., Inc., 1995. Pp. 267.
71. Sivropoulos A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. J.Agric. Food Chem. 1996. Pp. 1202-1205.

72. Skoog, A. D., Holler, F. J., Holler, T. A. (2001). Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. Mc Graw Hill Interamericana.
73. Traboulsi AF, Taoubi K, El-Haj S, Bessiere JM, Rammal S, Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). Pest Management Sci. 2002. Pp. 491-495.
74. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch. Microbiol. 2000. Pp. 233-238.
75. Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos M de L. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol. Pharm. Bull. 2002. Pp. 1324-1327.
76. Veda S, Kuwabara Y, Hirai N, Sasaki H, Sugahara T. Antimutagenic capacities of different kinds of vegetables and mushrooms. J. Japn Soc. Food Sci. Technol. 1991. Pp. 507-514.

77. Ventura-Sobrevilla, J. M. (2007). Biodegradación de Taninos Presentes en Extractos de Gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.) y Hojasen (*Fluorencia cernua* D.C.) mediante Fermentación en Estado Sólido usando *Aspergillus niger* PSH. Tesis nivel licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila.
78. Vernin, G., Lageot, C., Gaydou, E.M., Parkanyi, C., 2001. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. *Flavour and Fragrance. Journal.* 16. Pp. 219-226.
79. Wagner KH, Elmadfa I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann. Nutr. Metabol.* 2003. Pp. 95-106.
80. Zava DT, Dollbaum CM, Blen M. Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs and spices. *Soc. Exp. Biol. Med.* 1998. Pp. 369-378.