



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Bursera schlechtendalii* Engler

TESIS:

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

Presenta:

Espinosa Espinosa Lesslie

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Méx

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. César Mateo Ortiz Flores

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

M. en C. Ángel Durán Díaz.

Biol. Luis Barbo Hernández Portilla.

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

UNAM PAPIIT IN218511-3

Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán
(MGU/Useful Plants Project México)

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por haberme dado la oportunidad de estar dentro de sus instalaciones y lograr una meta más en mi vida.

A la FESI por aceptarme y dejar que me desarrolle académicamente en una de sus licenciaturas que me ha llenado plenamente durante estos años.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Ma. Margarita Canales por creer en mí y lograr así que crea en mí misma, por todo su apoyo, cariño, sus consejos y los buenos y malos momentos por los que hemos pasado este tiempo, pero aprendiendo sabiamente de los mismos, tanto dentro como fuera de las instalaciones académicas.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por su, cariño, apoyo y por los buenos momentos en donde me ha demostrado que más que un profesor es una excelente persona y compañero de confianza.

Al Dr. César Mateo Ortiz Flores, al M. en C. Ángel Durán Díaz y al Biol. Luis Barbo Hernández Portilla, por sus acertadas observaciones, sin las cuáles no hubiese sido posible la finalización de este proyecto, muchas gracias.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este escrito a:

Mis padres, **Ma. Eugenia y Manuel Espinosa**, que me han apoyado a pesar de las decisiones que he tomado en mi vida, por todos las pláticas amenas de sus experiencias que más que eso han sido consejos sabios de sus vidas para la mía, por todo el gran amor que me han demostrado y por una lista sin fin de la cual jamás sabré como pagárselo y deseando seguir siendo la familia que somos hasta ahora... los amo papás.

Ilich Espinosa, por ser mi hermano mayor y comportarte como tal, por siempre estar a mi lado sin importar la circunstancia... simple y sencillamente por ser mi persona favorita.

Carlos Maya por ser mi compañero fiel en esta etapa de mi vida y deseando así que la magia siga hasta el final de nuestros años... Gracias por todo cariño.

La **Familia Espinosa**, (ya sea con "s" o con "z"), que me han dado la educación moralista, la fuerza y el coraje para llegar hasta donde estoy ahora, por decirme que la clave para triunfar con tu carrera simplemente consiste en enamorarse de ella... los quiero muchísimo.

Mis **amigos**, a mi equipo estrella de toda la carrera, a la familia farmacognosia, a los que están fuera de las instalaciones de la FESI así como de la UNAM, gracias por todo y este trabajo no solo es mío sino de todos Uds.... deseando así que cada paso en su vida este lleno de éxito. Gracias por todo, los valoro y aprecio mucho.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
• Colecta de material:.....	13
• Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor.	13
• Análisis de la composición química del aceite esencial.	13
• Evaluación de la actividad antibacteriana.	14
• Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.	14
• Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.	14
• Evaluación de la actividad antifúngica:.....	15
• Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.	15
• Pruebas estadísticas:	16
RESULTADOS.....	17
• Colecta del material vegetal	17
• Composición química de los aceites esenciales de <i>B. schlechtendalii</i>	18
• Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i>	22
• Pruebas cualitativas.....	22
• Pruebas cuantitativas	24
• Actividad antifúngica	26
• Pruebas cualitativas.....	26
• Pruebas cuantitativas	27

DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES.....	35
PERSPECTIVAS.....	35

ÍNDICE DE APÉNDICES

APÉNDICE 1 FAMILIA BURSERACEAE (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992)	36
APÉNDICE 2: Estudios realizados acerca del género <i>Bursera</i>	37
APÉNDICE 3 <i>Bursera schlechtendalii</i> (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992)	39
APÉNDICE 4 ZONA DE COLECTA	41
APÉNDICE 5 Método de Arrastre de vapor (Domínguez, 1973).....	45
APÉNDICE 6 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY-BAÜER.	46
APÉNDICE 7 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO (Koneman, 1985).....	48
APÉNDICE 8 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL (Wang y Bun, 2002).....	50
APÉNDICE 9 DATOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B.schelechtendalii</i>	51
APENDICE 10 Cromatograma de los aceites esenciales de diferentes colectas de <i>B. schlechtendalii</i>	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de caja de la actividad antibacterial de <i>B. schlechtendalii</i>	23
Figura 2. Diagrama de caja de la actividad antibacterial del aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i> en los tipos bacterianos.	24
Figura 3 Diagrama de caja de la actividad antifúngica del aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i>	27
Figura 4. Distribución geográfica de <i>B. schlechtendalii</i> . Los estados de color es donde se distribuye esta especie.....	40
Figura 5 Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos generales de <i>B. schlechtendalii</i>	17
Cuadro 2. Rendimiento y densidad de los aceites obtenidos en las diferentes colectas	18
Cuadro 3 Estructura química de los compuestos que tuvieron mayor proporción en los aceites esenciales de <i>B.schlechtendalii</i>	19
Cuadro 4 Porcentaje de los compuestos de mayor proporción en cada una de las muestras de aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i>	21
Cuadro 5. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición obtenidos por el efecto del aceite esencial de <i>B. schlechtendalii sobre bacterias</i>	22
Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima de las cepas bacterianas más sensibles y las colectas más representativas del aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i>	25
Cuadro 7. Grado de inhibición del aceite esencial de <i>B. schlechtendalii</i>	26

Resumen

Los aceites esenciales son compuestos volátiles, naturales, caracterizados por tener un fuerte aroma y sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios, conocidos por sus actividades antisépticas, como antimicrobianos y como remedios anestésicos locales. Dichas sustancias representan una parte importante en la farmacopea tradicional de nuestro país y la herbolaria que se ha impulsado, ha estado sujeta a la investigación y validación de la medicina hegemónica a través de estudios de laboratorio. Como es el caso de algunos compuestos fitoquímicos del género *Bursera*, del que se ha reportado que presenta propiedades antimicrobianas. Sin embargo, en *B. schlechtendalii* no se han realizado estudios relevantes con el fin de saber si tiene alguna propiedad similar, por lo cual, su aceite esencial es un buen candidato para ser estudiado. La planta fue colectada en San Rafael, Coxcatlán, Puebla y la composición química del aceite esencial de los tallos de *B. schlechtendalii* mostró tener mayor proporción de terpenos como α felandreno, camfeno, α pineno y de un alcano, nonano. El aceite esencial de la colecta de abril 2010, fue el que tuvo mayor rendimiento, es por ello que fue el primer aceite que se probó contra una batería de bacterias Gram positivas y Gram negativas, a partir de estos resultados se seleccionaron las bacterias más sensibles y se sometieron a la prueba cualitativa de actividad antimicrobiana. Los resultados de esta evaluación mostraron que los aceites esenciales de las colectas de marzo, abril y agosto de 2010, tuvieron mayor efecto sobre las bacterias, *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli* 53228 obteniendo una CMI = 0.25 mg/mL, ambas del aceite de la colecta de agosto 2010. Los hongos levaduriformes como *C. glabrata*¹ y *C. albicans*¹ si fueron sensibles al aceite de la colecta del mes de abril, sin embargo los hongos filamentosos no fueron inhibidos por dicho aceite.

Palabras clave: *Bursera schlechtendalii*, *Bursera*, aceite esencial, plantas medicinales, composición química, antibacteriano.

Introducción

La historia de la medicina se inició como una actividad instintiva en los animales y después como una función imitativa por parte del “hombre-medicina” de todas las sociedades primitivas. Sus métodos 100% empíricos incluían la utilización de sustancias vegetales cuya fuente podría ser absolutamente disímil pero cuyo principio activo era compartido por numerosas sociedades arcaicas (Ocampo y Jiménez, 1993).

El conocimiento de los antiguos pobladores puede servir de antecedente para el conocimiento científico, que de esas mismas plantas medicinales se puede tener y desarrollar actualmente (Araujo y Salas, 2008). Sin embargo, para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional alternativa o complementaria es la suma total de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas que se utilizan para mantener la salud, prevenir, diagnosticar y mejorar o tratar trastornos físicos o mentales. En los cuales los especialistas son terapeutas, parteras, promotores, sobadores, que poseen sus propios métodos de diagnóstico y tratamientos, además de sus propios recursos terapéuticos, como lo son las plantas medicinales (OMS, 2002).

Aproximadamente, el 60% de la población mundial utiliza plantas y productos derivados de ellas en su medicación. Estos productos naturales hoy en día son considerados como una de las medicinas de gran importancia por su efectividad terapéutica (Araujo y Salas, 2008).

México tiene una gran riqueza cultural como vegetal, lo que da como resultado un amplio uso de la plantas, utilizando más de 7,000 especies dentro de un total de casi 22,000 (Martínez et al., 2006).

Es evidente que la principal razón de la riqueza florística de México reside en su amplia variedad de condiciones fisiográficas y climáticas. Por otra parte, la flora de México presenta un significativo porcentaje de endemismos que le confieren un sello particular. Los géneros restringidos en la distribución del territorio del país constituyen aproximadamente 11% de su número total en la flora. En las regiones de clima caliente y húmedo, la proporción de elementos de distribución restringida es ordinariamente baja, pero en la península de Yucatán y en otros sitios caracterizados por el bosque tropical caducifolio, al menos a nivel de especie, los endemismos cobran mucha importancia, como es el caso del género *Bursera* que se ubica en la familia Burseraceae (Rzedowski, 1981).

Desde la época prehispánica en las regiones “cálidas y secas” eran explotados los árboles de la familia Burseraceae (Apéndice 1), para el uso de extracción de resinas (copal) que tenía gran relevancia social, económica, religiosa-ceremonial y en la vida cotidiana (Linares y Bye., 2008).

El género *Bursera* está constituido por un poco más de 100 especies. De ellas más del 70% se distribuyen en México, principalmente en el bosque caducifolio y es ahí donde más del 50% son especies de distribución limitada (Rzedowski et al., 2005; Andrés y Espinosa, 2002).

Muchas especies que pertenecen a dicho género han sido estudiadas por presentar diversos metabolitos secundarios, resinas y aceites esenciales (Maldini et al., 2009). Estos últimos pueden ser sintetizados por todos los órganos de las plantas (Bakkali et al., 2008), siendo los responsables de los olores y sabores característicos de ciertas especies, desempeñando diferentes papeles como, repelentes de insectos, defensa para evitar la herbivoría, ejercer atracción para los insectos polinizadores, entre muchos otros (Avalos y

Pérez, 2009; Kuklinski, 2000; Harborne y Tomas-Barberan, 1991; Becerra y Lawrence, 1990).

En la actualidad, los aceites esenciales y sus componentes están ganando un creciente interés debido a su prestigio relativamente seguro, su amplia aceptación por los consumidores y su aprovechamiento multifuncional (Sacchetti et al., 2005). Se utilizan tanto en la industria alimentaria, en la perfumería, en las industrias de productos de limpieza, así como en la farmacéutica, ya que sus acciones farmacológicas son muy variadas (Kuklinski, 2000). De hecho muchos autores han reportado que los aceites esenciales tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias, etc. (Bakkali et al., 2008; Sacchetti et al., 2005; Martínez et al., 2003; Alzamora et al., 2001)

Se ha encontrado que muchas de las especies que pertenecen al género *Bursera* presentan componentes en sus aceites que son buenos candidatos para inducir una amplia gama de efectos biológicos, como antioxidantes, antiplaquetarios, antivirales, antibacteriales, insecticidas y fungistáticos (Apéndice 2).

Sin embargo, sobre *B. schlechtendalii* en particular se tienen muy pocos estudios (Apéndice 3), en 1992 Rzedowski y Guevara-Féfer, describieron diversas especies del género *Bursera*, entre ellas *B. schlechtendalii*. Por otro lado Rzedowski et al., (1988), realizaron un estudio quimiotaxonómico, con el aceite extraído de la corteza, para identificar una especie de origen híbrido entre *B. morelensis* y *B. schlechtendalii*, reconociendo la presencia de entre 14 y 16 terpenoides, de ocho individuos de *B. schlechtendalii*, sin especificar más información sobre estos compuestos. Becerra y Lawrence (1990), estudiaron dos métodos de defensa de dicha planta para evitar la herbivoría por escarabajos de la familia Chrysomelidae. Evans et al., (2000), completaron

el estudio antes mencionado y determinaron algunos terpenos de dicha especie, para contrarrestar la herbivoría.

B. schlechtendalii es una de las plantas que no ha sido ampliamente estudiada y que es utilizada en algunos poblados del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla para aliviar síntomas como congestión nasal y cicatrizante de heridas superficiales (Téllez et al., 2008). Por lo cual, se ha decidido realizar esta investigación para conocer las propiedades medicinales del aceite esencial y sus componentes por lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivos

■ Objetivo general:

Realizar un análisis comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii*.

■ Objetivos Particulares:

- Obtener el aceite esencial de *B. schlechtendalii* de las diferentes colectas por el método de arrastre de vapor.
- Determinar la composición química del aceite esencial, aplicando una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de forma cualitativa (método de difusión en agar Kirby-Bäuer para bacterias y levaduras; inhibición del crecimiento radial para hongos filamentosos).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de forma cuantitativa (método de microdilución).

Materiales y métodos

Colecta de material:

El material vegetal necesario de *B. schlechtendalii* fue colectado en los meses de Marzo, Abril, Mayo, Agosto, Septiembre de 2010 y en Marzo y Abril de 2011 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 3).

Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor.

El aceite esencial se obtuvo de la parte aérea (ramas) mediante la técnica de arrastre de vapor (Domínguez, 1973) (Apéndice 4). Después se evaluó la densidad y el rendimiento del aceite esencial obtenido.

Análisis de la composición química del aceite esencial.

El análisis del aceite esencial de *B. schlechtendalii* mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) se realizó en un Cromatógrafo modelo 6850 acoplado a un Espectrómetro de masas modelo 5975C, marca Agilent Technologies. El análisis se realizó utilizando una columna HP-5MS de marca Agilent Technologies, de 30 metros de longitud, 0.25 mm diámetro interno y película de 0.25 μm , el tipo de inyección fue *Split*, y la cantidad de muestra empleada fue 1 μL . Las condiciones de separación fueron a una temperatura inicial de 70°C durante dos minutos aumentando con dos rampas de calentamiento, la primera a 20°C por minuto hasta los 230°C; y la segunda, aumentando a 8°C por minuto hasta los 280°C y se mantiene durante cinco minutos, el gas de acarreo fue He. El flujo inicial en la columna fue de 1 mL/min, con una presión de 61.85 Kpa (8.77psi) y una velocidad lineal de 30 cm/s. El tiempo total del análisis fue de 21.25 minutos. El rango de masas detectado fue de 35m/z a 750m/z, la muestra se ionizó por impacto electrónico a 70 eV, la temperatura alcanzada de la fuente de ionización fue de 230°C, y el cuádrupolo de 150°C. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST Versión 8.0.

 Evaluación de la actividad antibacteriana.

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

■ Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Streptococcus pneumoniae* aisladas de casos clínicos donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano). *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermis* y *Bacillus subtilis* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán y *Micrococcus luteus*.

■ Gram-negativas: *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa* donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala. *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Vibrio cholerae* CDC V12. *Escherichia coli* ATCC 53228 y *Escherichia coli* ATCC 53218 aisladas de casos clínicos donadas por el Hospital los Ángeles. *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurum*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* fueron donadas por la M. en C. María de Jesús Sánchez Onofre de la FES Cuautitlán.

 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 5). Se utilizó en primera instancia el aceite de la colecta del mes de Abril (puesto que presentó el mayor rendimiento en el año 2010) y a partir de los resultados de éste se repitió el ensayo con las demás muestras de aceites. Como control positivo se utilizaron sensibilizadores impregnados con Cloranfenicol (25 µg por disco). Los discos se impregnaron con 5 µL del aceite esencial. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

 Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.

Los aceites esenciales que tuvieron mayor efecto en la prueba cualitativa, fueron seleccionados para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). Utilizando la técnica de microdilución en caldo

modificado (Koneman, 1985) (Apéndice 6). Las concentraciones que se aplicaron para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 4000, 3000, 2000, 1000, 500, 250 µg/mL. El bioensayo de cada concentración se realizó por triplicado.

 Evaluación de la actividad antifúngica:

■ Hongos filamentosos: *Aspergillus niger* CDBB-H-179, *Aspergillus* sp. donada por el Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, laboratorio de Microbiología UBIPRO, FES-I, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112 (CINVESTAV), *Fusarium sporotrichoides* ATCC NRLL3299, *Fusarium moniliforme* donadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala y *Rhizoctonia lilacina* CDBB-h-306 (CINVESTAV).

■ Levaduras: *Candida albicans* ATCC 10231 donadas por el laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM. Dr. Rubén López Martínez (responsable) Dra. Patricia Manzano Gayoso. *Candida albicans* aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala. *Candida albicans*¹, *Candida glabrata*¹ y *Candida albicans*¹ (urocultivo) donadas por la FES Cuautitlán a través de la M. en C María de Jesús Sánchez Onofre (estas cepas bacterianas serán representadas con el super índice 1 durante todo el escrito). *Candida albicans*² (urocultivo), *Candida glabrata*² y *Candida tropicalis*² donadas por el Hospital los Ángeles (estas cepas bacterianas serán representadas con el super índice 2 durante todo el escrito).

 Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.

Para los hongos filamentosos se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 7) usando una concentración de 5 µL por disco del aceite esencial de la colecta del mes de Abril (puesto que presentó el mayor rendimiento en el año 2010). Como control positivo usó Ketoconazol (7 µg/sensidisco) (Wang y Bun, 2002). Cada bioensayo se realizó por triplicado.

La actividad antifúngica sobre levaduras, se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991), utilizando el aceite de la colecta

del mes de Abril. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Nistatina (100 µg por disco). Los discos fueron impregnados con 5 µL del aceite esencial. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.



Pruebas estadísticas:

A los resultados obtenidos en los bioensayos de la actividad antibacteriana y la actividad antifúngica se les realizó un análisis descriptivo por cepa, por concentración y por mes de colecta tomando en cuenta medidas descriptivas como: media, mediana, error estándar, desviación estándar, Q_1 , Q_3 , mínimo y máximo, entre otras. Así mismo se elaboraron diagramas de caja con los cuales se comparan especies, concentración y mes de colecta del aceite esencial.

Posteriormente se realizó un análisis de variación factorial (De dos factores), por especie, concentración y mes de colecta. Para hongos levaduriformes se realizó el análisis de ANOVA (de un factor).

Resultados

☀ Colecta del material vegetal

Se recolectaron en San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla, ramas frescas de *B. schlechtendalii* en los meses del año 2010 (Marzo, Abril, Mayo, Agosto, Septiembre) y en el 2011 (Marzo, Abril). Los datos generales de especie se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Datos generales de *B. schlechtendalii*

Datos etnobotánicos de la especie	
Familia	BURSERACEAE
Nombre científico	<i>Bursera schlechtendalii</i> Engler.
Nombre común en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán	“Copalillo”
Otros nombres comunes fuera de la zona de estudio	“aceitillo”, “palo mulato”, “ulullete”
Parte utilizada	Ramas
Forma de uso	Medicinal: su resina se usa en la nariz como descongestionante; también se usa para cicatrizar heridas superficiales Forrajera: en San Rafael (Téllez et al., 2008)

Se obtuvieron aceites esenciales incoloros, translucidos con un aroma relativamente dulce. El rendimiento y la densidad de cada uno de estos aceites se muestran en el Cuadro 2.

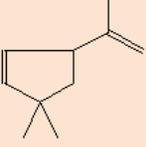
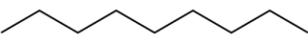
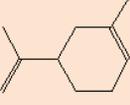
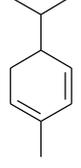
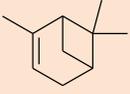
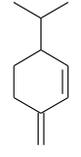
Cuadro 2. Rendimiento y densidad de los aceites obtenidos en las diferentes colectas

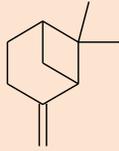
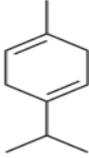
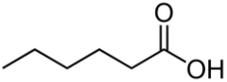
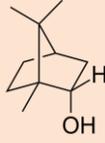
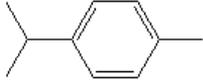
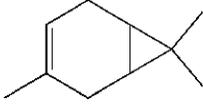
Mes de colecta	Peso de ramas (g)	Rendimiento del aceite (g)	Rendimiento del aceite (%)	Densidad del aceite (g/mL)
Marzo 2010	700	0.4647	0.06	0.60
Abril 2010	100	1.3728	1.3	0.76
Mayo 2010	450	0.8615	0.19	0.62
Agosto 2010	651	0.5637	0.08	0.75
Septiembre 2010	642	0.3512	0.05	0.67
Marzo 2011	1128	0.7033	0.06	0.79
Abril 2011	1236	1.0320	0.08	0.81

✱ **Composición química de los aceites esenciales de *B. schlechtendalii*.**

Las estructuras de los compuestos de mayor proporción se pueden apreciar en el Cuadro 3. Por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se obtuvieron los compuestos de cada una de las muestras, de los cuales se destacan diez por su mayor porcentaje de área en los aceites (Cuadro 4). En base al tiempo de retención y los patrones de fragmentación, se identificaron los compuestos mayoritarios (Apéndice 9). Destacando α -Pineno, α -Felandreno y Nonano que son los compuestos que se presentaron en todas las colectas. Por el contrario hubo compuestos que solo se obtuvieron en una sola colecta como δ -Careno encontrado en la muestra de marzo-2010, Acido hexanóico y Cimeno presentes en el aceite del mes de abril-2010, Silvestreno y Limoneno que se encontró en la muestra de mayo-2010 y Bergamol sólo en el mes de agosto-2010.

Cuadro 3 Estructura química de los compuestos que tuvieron mayor proporción en los aceites esenciales de *B.schlechtendalii*

Compuesto	Estructura química
3 Isopropenil-5,5 dimetilciclopenteno	
Camfeno	
Limoneno	
Nonano	
Silvestreno	
α -felandreno	
α -pineno	
β -felandreno	

β-pineno	
γ-Terpineno	
β-Mirceno	
Acido hexanóico	
Alcanfor	
Bergamol	
Borneol	
Cimeno	
β-Thujeno	
δ-Careno	

Cuadro 4 Porcentaje de los compuestos de mayor proporción en cada una de las muestras de aceite esencial de *B. schelechtendalii*.

	mar-2010	abr-2010	may-2010	ago-2010	sep-2010	mar-2011	abr-2011
Compuesto	% Área						
β-Mirceno	2.62			3.88	7.99	6.51	6.65
5-Isopropenil-3		32.29				35.64	
Acido hexanóico		1.22					
Alcanfor		1.13		2.82	2.67	1.88	1.16
Bergamol				1.43			
Borneol		1.27		2.07	2.82	2.55	1.42
Camfeno	1.54	3.64	2.97	2.88	5.76	5.23	4.08
Cimeno		2.78					
Limoneno			13.27				
Nonano	18.77	5.89	8.63	12.36	5.2	8.79	6.45
Silvestreno			47.47				
α-Felandreno	2.62	20.16	2.92	6.42	18.79	13.43	24.62
α-Pineno	3.8	6.14	5.21	5.65	6.74	6.48	6.47
β-Felandreno	54.73	8.68	4.85	43.74	35.74		
β-Pineno	2.83	2.6	7.39	2.32	3.7	3.51	2.48
β-Thujeno	1.43	5.62			1.02	5.78	4.25
γ-Terpineno	2.91		1.32				35.08
δ-Careno	1.26						

☀ Actividad antibacteriana del aceite esencial de *B. schlechtendalii*.

➤ **Pruebas cualitativas**

Streptococcus pneumoniae fue la bacteria Gram positiva que tuvo mayor inhibición en todos los meses de colecta, así como *Escherichia coli* 53228 para las Gram negativas, excepto con la muestra de aceite del mes de mayo. Sin embargo, el aceite de la colecta del mes de abril-2010 presentó efecto sobre todas las bacterias y el que menos tuvo efecto inhibitorio fue el aceite de mayo-2010 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición obtenidos por el efecto del aceite esencial de *B. schlechtendalii* sobre bacterias

Diámetro de los halos de inhibición (mm)							
Meses de colecta (promedio±desviación estándar)							
Especie	Marzo 2010	Abril 2010	Mayo 2010	Agosto 2010	Septiembre 2010	Marzo 2011	Abril 2011
Sp	9.3±0.5	11±1	7.3±0.5	16±2.6	8	7.6±0.5	10.6±0.5
Sa 29213	-	7.6±0.5	7.3±0.5	7	-	7	-
<i>E. faecalis</i>	7	7.3±0.5	7	7	7	7	7
<i>E. coli</i> (M)	7	6	-	-	-	7	-
<i>E. coli</i> 53228	10.6±1.1	7	-	11.3±2.0	11.6±0.5	7.6±0.5	8.6±0.5
Vch (agua)	-	7.3±0.5	-	7	8.3±0.5	7	-
V ch (Tor)	7	7	-	-	7	-	7

Sp: *Streptococcus pneumoniae*, Sa 29213: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, E faecalis: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, E. coli: *Escherichia coli*, Ec 53228: *Escherichia coli* 53228, Vch (agua): *Vibrio cholerae* INDRE 206 (Aislado de agua), Vch (Tor): *Vibrio cholerae* CDC V12 (El tor), (-): No hay actividad. **Todas las cepas sensibles al cloranfenicol (25µg/sensidisco).**

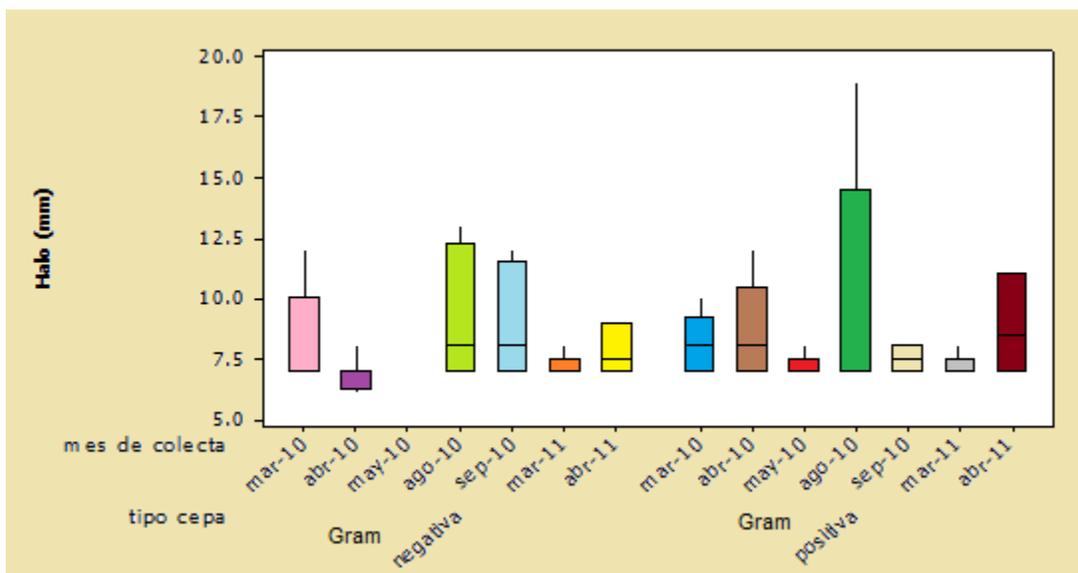


Figura 2. Diagrama de caja de la actividad antibacterial del aceite esencial de *B. schlechtendalii* en los tipos bacterianos.

➤ **Pruebas cuantitativas**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizaron únicamente los aceites de las colectas que tuvieron los halos de inhibición de mayor diámetro en las pruebas cualitativas, así como un mayor rendimiento, encontrando a *S. pneumoniae* como la cepa bacteriana más sensible y la colecta del mes de agosto mostrando mayor sensibilidad en esta última (CMI= 0.25mg/mL) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima de las cepas bacterianas más sensibles y las colectas más representativas del aceite esencial de *B. schlechtendalii*.

Bacterias	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Muestra marzo 2010		
Sp	2	3
<i>E. faecalis</i>	2	>4
<i>E.coli</i> 53228	1	2
V.ch agua	>4	>>4
Muestra abril 2010		
Sp	0.5	>4
<i>E. faecalis</i>	0.5	>4
<i>E. coli</i> 53228	0.5	>4
V.ch agua	0.25	>4
Muestra agosto 2010		
Sp	0.25	0.5
<i>E. faecalis</i>	>4	>>4
<i>E. coli</i> 53228	0.25	0.5
V.ch agua	3	>>4

Sp: *Streptococcus pneumoniae*, *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* 53228: *Escherichia coli* 53228, Vch (agua): *Vibrio cholerae* INDRE 206 (Aislado de agua) (-): No creció la bacteria.

☀ Actividad antifúngica

➤ **Pruebas cualitativas**

Para esta prueba, tanto para hongos filamentosos como levaduriformes se utilizó únicamente el aceite esencial de la colecta del mes de Abril. En el caso de los hongos filamentosos, no tuvieron efecto alguno al ser expuestos al aceite.

En cuanto a las levaduras en el cuadro 7 se puede apreciar que *C. albicans*¹ y *C. glabrata*¹ fueron las levaduras más sensibles al aceite de *B. schlechtendalii*.

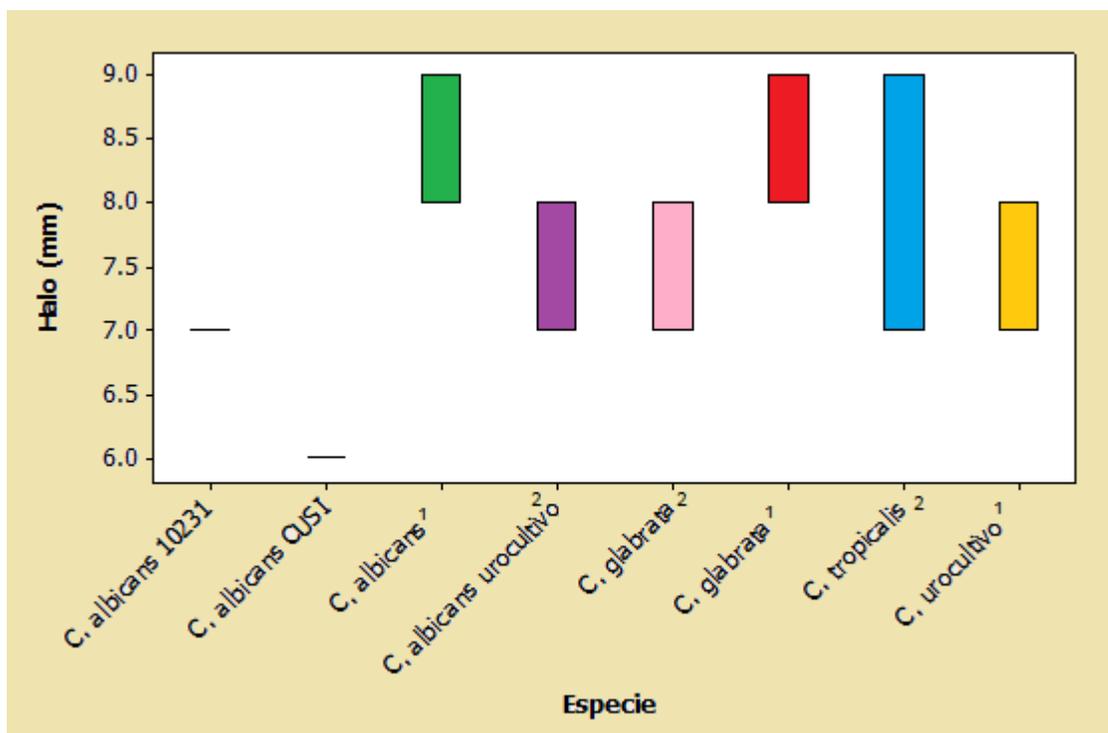
Cuadro 7. Grado de inhibición del aceite esencial de *B. schlechtendalii*

Diámetro de los halos de inhibición (mm)	
Especie	Promedio±desviación estándar
<i>C. albicans</i> 10231	7
<i>C. albicans</i> CUSI	6
<i>C. albicans</i> ¹	8.3±0.5
<i>C. albicans</i> urocultivo ²	7.6±0.5
<i>C. glabrata</i> ²	7.3±0.5
<i>C. glabrata</i> ¹	8.6±0.5
<i>C. tropicalis</i> ²	7.6±1.15
<i>C. urocultivo</i> ¹	7.3±0.5

C. albicans ATTC 10231 donada por el laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM, *C. albicans* CUSI donada por el laboratorio de análisis clínico FES Iztacala. ¹ Cepas donadas por la FES-Cuautitlán. ² Cepas donadas por el Hospital los Ángeles.

➤ **Pruebas cuantitativas**

Por medio del ANOVA de un factor se encontró que existieron diferencias significativas del aceite entre los hongos levaduriformes ($F= 5.33$, $P= 0.003$). Siendo *C. glabrata*¹ y *C. albicans*¹ las que mostraron los halos de inhibición de mayor diámetro y estadísticamente son diferentes a las demás cepas (mediana= 9.00 y mediana= 8.00) respectivamente. Esto se puede apreciar en la Figura 3.



¹Cepas donadas por la FES-Cuautitlán

²Cepas donadas por el Hospital los Ángeles

Figura 3 Diagrama de caja de la actividad antifúngica del aceite esencial de *B. shlechtendalii*

Discusión

El género *Bursera* está constituido por un poco más de 100 especies. De ellas, más de 70 se distribuyen en México. Aunque los árboles de dicho género constituyen un elemento substancial de los bosques tropicales caducifolios, el conocimiento de su identidad deja aún bastante que desear (Rzedowski y Calderon, 2002). Por otro lado, de la especie *Bursera schlechtendalii* se han encontrado estudios acerca de su descripción botánica (Rzedowski, 1992) y de algunos terpenos que evitan su herbivoría (Becerra y Lawrence, 1990), sin embargo ninguno acerca de su composición química y actividad antimicrobiana. De tal forma que este es el primer trabajo sobre estos aspectos.

En el cuadro 2 se muestran los rendimientos obtenidos a partir de las extracciones de los aceites esenciales de *B. schlechtendalii*. En donde se puede apreciar, que el aceite esencial extraído de las colectas de Abril-2010 y 2011 fueron los que presentaron mayor rendimiento. En contraste, el aceite de la colecta del mes de Septiembre fue el que tuvo un rendimiento menor, esto es atribuido a que la temperatura en los meses de Marzo-Abril en San Rafael, son elevadas y en los meses de Agosto-Septiembre es temporada de lluvias. Hernández en 2009, trabajó con el aceite esencial de *C. curassavica*, (colectada en el mismo sitio de estudio en cuestión), obteniendo un mayor rendimiento en época de sequías que en época de lluvias. El producto de extracción puede variar en cantidad, calidad y composición, según el clima, la composición del suelo, el órgano de la planta de donde se extrae, la edad de la planta, la etapa del ciclo vegetativo, incluso la forma de colecta (Angioni et al., 2006; Masotti et al., 2003; Kuklinski, 2000).

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos naturales muy compleja, pueden presentar alrededor de 20-60 compuestos en concentraciones diferentes. Ellos son caracterizados por dos o tres compuestos mayoritarios que están en muy altas concentraciones (20-70%), comparados con otros compuestos que están en trazas (Bakkali

et al., 2008). Los compuestos que constituyen a los aceites esenciales de las diferentes colectas, se obtuvieron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Diez compuestos fueron identificados en el aceite de la colecta del mes de Marzo-2010, representado 92.5% del total de aceite, doce en el mes de Abril-2010, equivalente al 91.42%, nueve del mes de Mayo-2010 que es igual a 94.03%, diez compuestos en Agosto-2010, septiembre-2010, Marzo-2011 y Abril-2011 que representan el 83.57%, 90.43%, 90.80% y 92.66% respectivamente (Apéndice 9). En el Cuadro 4 se puede apreciar que el Camfeno, α -Felandreno y α -Pinenos son monoterpenos que se encontraron en todas las colectas. La presencia de dichos compuestos concuerda con estudios previos realizados con aceites esenciales de diferentes plantas. Sacchetti et al., en el 2005 estudiaron los aceites esenciales de 11 plantas diferentes, encontrando Camfeno en ocho de ellas, así como α -Felandreno en siete y α -Pinenos en diez. Alitonou et al., en 2004 trabajaron con el aceite esencial de *E. tereticornis*, reportando que α -Pinenos, α y β -Felandreno forman parte de su composición química. El aceite esencial de *C. curassavia* de igual manera presentó estos compuestos (Hernández, 2009). Sin embargo, en todos estos estudios los compuestos difieren en porcentaje. Así también lo hace el aceite esencial de *S. cuneifolia* en la que se encontraron compuestos como α -Pinenos (6.9%), Mirceno (3.9%), Limoneno (8.3%) y Alcanfor (1.3%) y en *S. montana* α -Pinenos (1.0%), Mirceno (0.8%), γ -Terpineno (8.1), Limoneno y Alcanfor no estuvieron presentes en esta muestra (Skočibušić y Bezić, 2004). Otro compuesto encontrado en todas las colectas fue el Nonano, que no es un terpeno sino un hidrocarburo, lo que coincide con lo que Evans et al., en el 2000 mencionan en su trabajo, los compuestos volátiles de las hojas y de la resina de *B. schlehtendalii* es una mezcla de monoterpenos hidrocarburos, conteniendo principalmente β -felandreno, Limoneno, β -mirceno, sabineno, α -pineno y Nonano.

La aplicación de los aceites esenciales, y de las esencias en general, son múltiples y variadas. Se utilizan tanto por sus propiedades aromáticas, en la industria alimentaria, en

perfumería, como por sus propiedades farmacológicas, en la industria farmacéutica (Kuklinski, 2000). Entre las varias aplicaciones terapéuticas de los aceites esenciales se incluye la acción antibacteriana puesto que el público hoy en día tiene más problemas con la sobreprescripción y el mal uso de los antibióticos (Araujo y Salas, 2008). De la batería de cepas bacterianas (19 cepas tanto Gram positivas como negativas) que se probaron con el aceite esencial de la colecta del mes Abril-2010, en la prueba cualitativa, *S. pneumoniae*, *S. aureus* 29213, *E. faecalis*, *E. coli* (M), *E. coli* 53228, *V. cholerae* (agua) y *V. cholerae* (Tor), fueron las que presentaron los halos de inhibición de mayor diámetro, (Cuadro 5). A partir de estos resultados se probaron los demás aceites y por medio del ANOVA factorial (2 factores) se determinó si existían diferencias significativas entre los halos de inhibición, la especie bacteriana y las diferentes colectas, obteniendo que *Streptococcus pneumoniae* fue la bacteria que presentó los mayores halos en todas las colectas. Esta bacteria es responsable de una elevada morbilidad y letalidad, ya que es uno de los principales agentes causales de una gran variedad de cuadros clínicos, infecciones benignas como otitis media y sinusitis agudas, e infecciones severas como septicemia, meningitis y neumonía (Prado, 2001). En la figura 1 se puede ver que *E. coli* 53228 fue la cepa con los mayores halos de inhibición de las Gram negativas, coincidiendo estos resultados con otros estudios como el de Tadtong et al., en el 2009 que probaron el aceite esencial de *E. punicea* y Arancibia et al., en el 2010 con el aceite esencial de *S. subpanduratus*, ambos trabajos comprobaron la inhibición de *E.coli* ocasionada por el aceite esencial.

Las diferentes colectas de aceites esenciales tuvieron diferencias significativas en cuanto al diámetro de los halos de inhibición que ocasionaron sobre los tipos de cepas bacterianas (Gram positivas y negativas). En la figura 2 se muestra que el aceite esencial del mes de Agosto-2010 (época de lluvia) fue el que tuvo mayor inhibición y el mes de Mayo-2010 (época de sequía) el que presentó menor efecto sobre los dos tipos de cepas. A diferencia de Hernández, 2009 que trabajó con el aceite esencial de *C. curassavica*,

donde menciona que el aceite de la época de sequía inhibió a 9 de 13 cepas bacterianas y el aceite de la época de lluvia únicamente tuvo efecto sobre 4 cepas.

En la determinación de la CMI y CBM se utilizaron a las bacterias que mostraron los mayores halos de inhibición, los aceites esenciales de las colectas que tuvieron mayor efecto en las pruebas cualitativas y mayor rendimiento (Cuadro 6). En el mes de Marzo-2010, las cepas más sensibles fueron *S. pneumoniae* (CMI=2 mg/mL) y *E. coli* 53228 (CMI=1 mg/mL). En cambio para el aceite de la colecta del mes de Abril-2010 todas las cepas mostraron una CMI=0.5 mg/mL excepto *V. cholerae* (agua) que fue más sensible (CMI=0.25 mg/mL). En la muestra de aceite esencial del mes de Agosto-2010, nuevamente *S. pneumoniae* y *E. coli* 53228 fueron las que tuvieron inhibición de crecimiento a una concentración menor (CMI=0.25 mg/mL). Esto difiere con López, 2011 que trabajó con el aceite esencial de *B. morelensis* colectado en el mes de Octubre y observó que para *S. pneumoniae* tuvo una CMI=0.125 mg/mL así como para *E. coli* 53228. En las colectas de los meses de Marzo y Agosto fue en donde la CMI y CBM fueron menores para *S. pneumoniae* y *E. coli* 53228. Esto se le atribuye a que posiblemente la planta esté en cierto estado de estrés ambiental y produzca metabolitos secundarios más activos, ya que, en San Rafael, la época de sequía empieza en Marzo-Abril y la época de lluvia en Julio-Agosto. Sin embargo del aceite esencial del mes de Agosto se han requerido menores concentraciones para las pruebas antibacterianas, puesto que en el mes de Marzo es cuando comienza la floración de *B. schlechtendalii* (Rzedowski y Guevara-Férfel, 1992) y muy posiblemente algunos metabolitos secundarios se desvíen a esa parte del vegetal, como por ejemplo algunos terpenos son secretados por las plantas para emitir fragancias florales utilizadas como defensa/repelente evitando la herbivoría o como atrayente/simulador para la polinización (Harborne, 1991). Estas dos cepas bacterianas también coinciden con los resultados de las pruebas cualitativas y el compuesto mayoritario de ambas colectas en la composición química (β -felandreno), cabe mencionar

que este monoterpeno se ha encontrado en diversos aceites esenciales de otras plantas como en *E. globulus* con aplicaciones como antiséptico respiratorio, expectorante, mucolítico entre otros (Alitonou et al., 2004; Kuklinski, 2000). Por otro lado, el aceite de la colecta del mes de abril-2010, presenta 2 compuestos diferentes (Acido hexanóico y Cimeno) que no están en las otras muestras, así que es probable que estos compuestos estén relacionados con los resultados obtenidos.

Debido a la gran cantidad de componentes, el aceite esencial no parece tener un blanco específico (Carson et al., 2002). Como típicos lipofílicos, pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, alterando la estructura de las capas de polisacáridos, ácidos grasos, fosfolípidos y su permeabilización. En células eucariotas la permeabilización de la membrana está asociada con la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y el agotamiento del ATP (Di Pasqua et al., 2006; Turina et al., 2006; Ultee et al., 2000, 2002; Helander et al., 1998; Sikkema et al., 1994; Knobloch et al., 1989). El aceite esencial puede coagular el citoplasma (Gustafson et al., 1998). Dañar la pared celular y la membrana puede tener una fuga de macromoléculas provocando el rompimiento de esta (Oussalah et al., 2006; Lambert et al., 2001; Cox et al., 2000; Gustafson et al., 1998; Juven et al., 1994).

En el caso de hongos filamentos el aceite esencial de *B. schlechtendalii* no tuvo ningún efecto. Estos microorganismos se encuentran entre los más resistentes. Un aspecto que ha complicado la situación es el desarrollo de mecanismos de resistencia a los antimicóticos sintéticos por algunas especies, se explica en parte por qué la mayoría de fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, lo cual permite la aparición de clones resistentes (Mesa et al., 2004; Kalemba y Kunicka, 2003). Aunque algunos aceites esenciales demuestran ser altamente efectivos contra algunos de ellos. También cabe señalar que una vez más la composición química

está muy relacionada con los efectos de inhibición, ya que en el 2003, Hernández et al., estudiaron los aceites esenciales de cuatro plantas diferentes provenientes de Cuba, mostrando actividad antidermatofítica y teniendo como compuestos mayoritarios al eugenol, el timol y el safrol. También es el caso de Cano, (2007) que estudio el aceite esencial de *M. mollis* encontrando 4 metabolitos en mayor proporción: Pulegona (36,68%), Mentona (24,24%), Limoneno (0,7699%) y Mentol en trazas, a los que le atribuye una actividad de fungicida-fungistático. En los estudios de las actividades farmacológicas de los aceites esenciales, como ya se mencionó anteriormente, debe tenerse en consideración diferentes factores, los cuales pueden afectar los resultados de estos estudios (especies, factores ecológicos y condiciones ambientales). Así como también: el porcentaje de humedad del material recolectado, y los métodos de extracción han sido identificados como 41 posibles fuentes de variación de la composición química (tanto los compuestos mayoritarios como el sinergismo con los compuestos de menor proporción), toxicidad y bioactividad de los aceites esenciales (Mouhssen, 2004).

En contraste con lo anterior, los hongos levaduriformes si fueron sensibles al aceite esencial de *B. schlectendalii* (cuadro 7). Muchos de los aceites esenciales han mostrado una actividad inhibitoria moderada sobre levaduras (Kulijanabagavad et al., 2010; Sacceti et al., 2005; Skočibušić y Bezić, 2004). Los aceites esenciales son conocidos también por sus propiedades antifúngicas in vitro y/o in vivo. Esta fuerte actividad se le atribuye a algunos compuestos mayoritarios como los terpenos, que han sido descritos en varios estudios (Mondello et al., 2006; Tampieri et al., 2005). Al realizar el análisis estadístico de ANOVA de un factor se determinó que existen diferencias significativas entre especies, destacando dos especies de importancia clínica, *C albicans* (M) y *C glabrata*. *Candida albicans* puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. Sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmunosuprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta

infección. *Candida albicans* es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedero, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade (Aristegui, 2002). Por otro lado, históricamente *Candida glabrata* fue considerado como no patogénico, con el uso de la terapia antifúngica de amplio espectro, la frecuencia de infecciones superficiales y profundas por este agente ha aumentado significativamente en los últimos años, por lo que se considera un patógeno emergente. Es una levadura que no filamenta, lo que conduce a pensar que es menos virulenta, sin embargo, sí produce proteinasas y presenta hidrofobicidad en su superficie celular, similar a *C. albicans*, facilitando su adherencia. Además la alta mortalidad asociada a infecciones por esta levadura y su prevalencia apoyan la idea que este microorganismo sí es patogénico (Tapia, 2008). El posible modo de acción de los aceites esenciales sobre las levaduras, se le atribuye a los terpenos, ya que alteran la permeabilidad de la membrana al penetrar entre las cadenas de ácidos grasos que forman la bicapa lipídica, lo que altera los lípidos y los cambios de fluidez de la membrana (Dalleau et al., 2008). Braga et al., en el 2005, sugieren que este fenómeno dio lugar a alteraciones de mayor superficie y modificaciones morfológicas así como la capacidad de adherencia de *C. albicans*.

Como se puede apreciar, los aceites esenciales han sido estudiados en diversas partes del mundo, ya que muchos de ellos son de gran importancia en la medicina tradicional y en aspectos culturales. Así como lo es el género *Bursera* en nuestro país, que es donde se concentra un gran número de endemismos de este género. Sin embargo, se tienen pocos estudios acerca de sus aceites esenciales y su modo de acción sobre los organismos que afectan a la salud humana, es por ello que se sugiere continuar con su estudio.

Conclusiones

- ◆ En el mes de Abril (de ambos años) es donde presentó mayor rendimiento el aceite esencial de *B. schlechtendalii*.
- ◆ Camfeno, Nonano, α -Felandreno y α -Pinenos son los compuestos que se encontraron en los aceites esenciales de todas las colectas.
- ◆ *Streptococcus pneumoniae* y *E. coli* 53228 fueron las especies bacterianas más sensibles al aceite esencial de *B. schlechtendalii*.
- ◆ Las colectas de aceites de Marzo y Agosto del 2010, tuvieron mayor efecto inhibitorio sobre las especies bacterianas antes mencionadas.
- ◆ El aceite esencial del mes de Abril 2010 de *B. schlechtendalii* no tuvo ningún efecto sobre hongos filamentosos.
- ◆ *C. albicans* (M) y *C. glabrata* fueron las levaduras más sensibles al aceite esencial del mes de Abril 2010 de *B. schlechtendalii*.

Perspectivas

- Realizar estudios de diferentes extractos de la planta para saber si existe alguna actividad antimicrobiana.
- Continuar con las investigaciones del modo de acción del aceite esencial sobre microorganismos.
- Realizar estudios empleando el compuesto Cimeno, Acido hexanóico y Nonano para determinar la actividad antimicrobiana, incluso para determinar si hay sinergismo entre ellos.
- Comparar los aceites esenciales de las diferentes colectas sobre hongos levaduriformes.
- Realizar pruebas cuantitativas para las levaduras.
- Estudiar la resina de *B. schlechtendalii* y comparar los resultados con los obtenidos del aceite esencial.

APÉNDICE 1. FAMILIA BURSERACEAE (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992)

Son árboles o arbustos, provistos de resina y a menudo de aceite esencial; hojas alternas, por lo general imparipinnadas, algunas veces bipinnadas, trifolioladas o reducidas a un solo foliolo, los foliolos laterales opuestos, comúnmente sin estípulas; inflorescencias axilares o terminales, básicamente cimosas, pero a menudo paniculadas, pseudoracimosas o fasciculadas, o bien las flores solitarias; flores casi siempre unisexuales (las plantas suelen ser dioicas o polígamo-dioicas), pequeñas, actinomorfas, 3 a 5 (6)-meras; cáliz más o menos cupuliforme, dividido en 3 a 5 (6) segmentos connados o casi libres, valvados, contortos o abiertos en botón; pétalos 3 a 5 (6), rara vez ausentes, libres o en pocos casos unidos para formar un tubo, contortos o valvados en botón; estambres dispuestos en 1 ó 2 verticilos, del mismo número que las divisiones del cáliz o más frecuentemente dos veces más numerosas, por lo general estériles en las flores femeninas (que a menudo dan la apariencia de ser hermafroditas), filamentos por lo común libres, insertos debajo o rara vez sobre el disco, anteras biloculares, longitudinalmente dehiscentes, disco anular o cupuliforme, a veces inconspicuo; pistilo 1, el ovario súpero, 2 a 5-locular y de otros tantos carpelos, placentación axilar, óvulos 2 por cada lóculo, estilo corto o casi obsoleto, estigma 2 a 5-lobado; fruto más o menos drupáceo, el pericarpo por lo general carnoso, pero a menudo finalmente dehiscente por medio de 2 a 5 valvas, huesos (endocarpios lignificados) 1 a 5, casi siempre monospermos y con frecuencia cubiertos por un pseudoarilo; semillas sin endosperma, embrión por lo común derecho. Familia de unos 20 géneros y más de 600 especies, distribuidas en las regiones calientes del mundo, con mayor diversidad en América tropical, en el norte y en el sur de África y en Malasia.

APÉNDICE 2. Estudios realizados acerca del género *Bursera*

Espece	Parte utilizada	Estudio	Bibliografía
<i>B. aloexylon</i>	Hojas (aceite esencial)	Actividad antimicrobial	Queiroga et al., 2007
<i>B. fagaroides</i>	Corteza de tallo	Actividad in vitro sobre el crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i>	Rosas-Arreguín et al., 2008
<i>B. microphylla</i>	Hojas, tallos y semillas	Relación de: terpenos, morfología y distribución.	Mooney y Emboden, 1968
<i>B. simaruba</i>	Corteza	Actividad antibacterial	Camporese et al., 2003
<i>B. simaruba</i>	Hojas	Actividad antiinflamatoria	Noguera et al., 2004
<i>B. simaruba</i>	Hojas, tallo y ramillas	Actividad antibacterial	Yasunaka et al., 2005
<i>B. simaruba</i>	Hojas	Antiinflamatorio	Carretero et al., 2008

<i>B. simaruba</i>	Corteza	compuestos fenólicos	Maldini et al., 2009
<i>B. tonkinensis</i>	Raíces	Componentes bioactivos	Jutiviboonsuk et al., 2005
<i>B. aptera</i> <i>B. lancifolia</i> <i>B. schlechtendalii</i> <i>B. morelensis</i> <i>B. longipes</i> <i>B. grandifolia</i> <i>B. bicolor</i> <i>B. submoniliformis</i> <i>B. copallifera</i> <i>B. glabrifolia</i>	Semillas y plántula	Morfología de plántulas y sus implicaciones filogenéticas	Andrés y Espinosa, 2002
<i>B. morelensis</i>	Ramas jóvenes	Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial	López, 2011

APÉNDICE 3. *Bursera schlechtendalii* (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992)

Arbusto o a veces árbol, dioico (¿o a veces hermafrodita?), de (0.5) 1 a 3 (10) m de alto, con abundante resina aceitosa de olor fuerte en la corteza y en las partes verdes, glabro, aunque algunas porciones muy tiernas cubiertas con papilas blanquecinas diminutas; tronco hasta de 20 (30) cm de diámetro, su corteza externa roja o roja oscura, exfoliante en tiras grandes y delgadas; hojas simples (o quizá más correctamente unifolioladas), peciolo de 3 a 10 (14) mm de largo, lámina elíptica a oblanceolada u obovada, de 1 a 6 (15) cm de largo y 0.5 a 2.5 (5) cm de ancho, por lo general redondeada u obtusa en el ápice, pero a veces mucronada o apiculada, la base cuneada a obtusa, margen entero, nervaduras secundarias (2) 3 a 9 (11) pares, prominentes en el envés, por lo general distalmente bifurcadas, de textura cartácea; flores por lo común solitarias o a veces en racimos cortos, sobre pedúnculos hasta de 5 mm de largo, las masculinas (4) 5-meras, lóbulos del cáliz triangulares o triangular-oblongos, de 0.4 a 0.7 (1) mm de largo, pétalos triangular-lanceolados, de (2) 2.5 a 3 (3.5) mm de largo, cuculados y con el ápice encorvado, amarillentos o rojizos, estambres todos aproximadamente al mismo nivel, filamentos de ± 1 mm de largo, anteras oblongas, de 1.2 a 1.5 mm de largo; las flores femeninas similares a las masculinas, (uniformemente?) trímeras, estaminodios de ± 1 mm de largo, ovario trilocular, estigma trilobado; pedúnculos fructíferos hasta de 5 mm de largo, notablemente engrosados, “drupas” oblicuamente ovoides, de 4 a 8 mm de largo, trivalvadas, a menudo apiculadas, el hueso recubierto totalmente por un pseudoarilo amarillo o rojo.

B. schlechtendalii forma parte de algunos matorrales xerófilos y del bosque tropical caducifolio de la parte central y nororiental, donde suele habitar sobre empinadas laderas de cerros calizos o constituidos por lutitas, sin ser planta frecuente, aunque en varios

lugares localmente abundante. Altitud. 600-1500 (2000) m. Florece de marzo a junio. Permanece con follaje de (abril) mayo a noviembre. Es de las especies de *Bursera* de distribución geográfica relativamente amplia. Es común en algunas porciones de la cuenca del Balsas y sobre todo en el estado de Oaxaca; en otras partes su papel es cuantitativamente mucho menos importante. Coahuila., Tamaulipas., Zacatecas., San Luis Potosi., Queretaro., Hidalgo., Jalisco., Colima., Morelia., Puebla., Veracruz., Guerrero., Oaxaca. Chiapas., Yucatan (Figura 4).

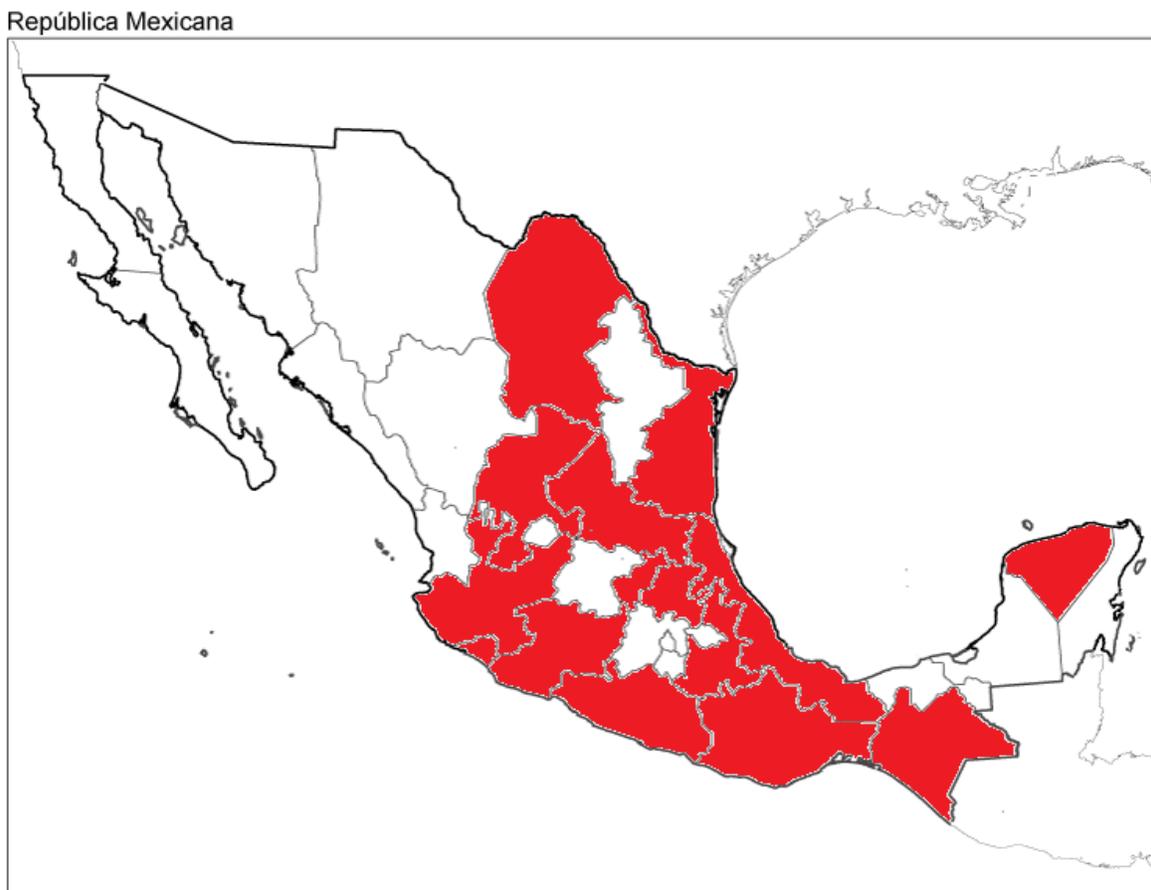


Figura 4. Distribución geográfica de *B. schlechtendalii*. Los estados de color es donde se distribuye esta especie.

APÉNDICE 4. ZONA DE COLECTA

La especie *Bursera schlechtendalii* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste (Figura 5), con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m.

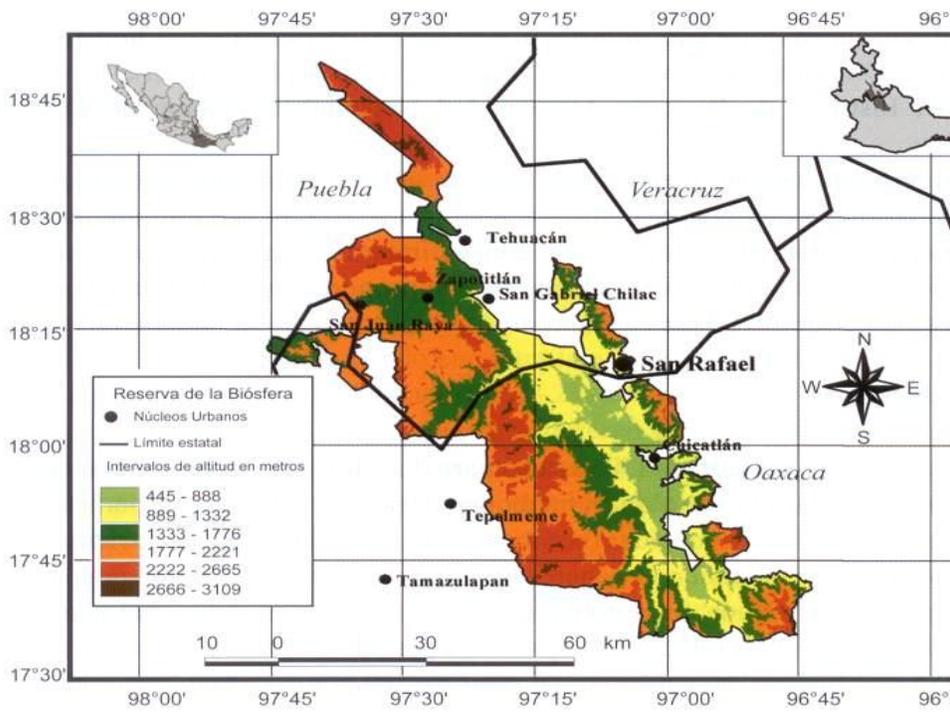


Figura 5 Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla

Clima

El clima es de tipo Bs (h') w'' (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

Edafología

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

Vegetación

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000).

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como *Fouqueiria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368

especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

 La población.

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

APÉNDICE 5 Método de Arrastre de vapor (Domínguez, 1973).

El aceite se obtuvo a partir del material fresco; este método utiliza una de las características de los aceites esenciales que es de presentar bajas presiones de vapor y por tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. Se puede destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500g de la planta fresca.



Después se depositaron en un matraz de fondo redondo de 500mL. El matraz se colocó en una mantilla de calentamiento eléctrica. Se montó el sistema de refrigeración. Se esperó a que hirviera ligeramente y se recolectó el aceite esencial.

APÉNDICE 6 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY-BAÛER.

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

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

-Medio: Para los ensayos con las cepas fúngicas se utilizó como medio de cultivo el agar PDA, para las cepas bacterianas agar Müeller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

-Aplicación de sustancias: Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocaron manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

-Preparación de las muestras: Los sensidiscos se impregnaron con el aceite hasta llegar a la concentración deseada de sustancia (5 µL) por disco. Es importante que la aplicación del aceite se realice después de haber sembrado los microorganismos, para lo cual el sensidisco se colocó sobre el agar e inmediatamente se agregó sobre él los µL de aceite y se presionaron ligeramente sobre el agar para fijarlo.

-Control positivo: Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos para la bacteria con 25 µg de cloranfenicol y para las levaduras con 10 µg de ketoconazol.

-Incubación: Las levaduras y bacterias fueron cultivadas en una caja de Petri con 20 mL de agar, se colocaron en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35°C, sin mayor tensión de CO₂.

APÉNDICE 7 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO (Koneman, 1985).

Determinación de la CMI y CBM.

-Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985)

La técnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de tubos con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se preparó una suspensión microorganismos con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumergió el asa en 10 mL de caldo Müller-Hilton (bacterias), se enjuagó bien el líquido para descargar todo el material y luego se retiró el asa de siembra. Posteriormente se incubó el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio fuera equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 microorganismos/mL. De esta suspensión se tomaron 4.5 μ L y se le adicionaron en los microtubos de centrifuga previamente estériles, y alicuotados con el agar caldo M-H, que contenía el dimetilsulfóxido (DMSO) y el aceite, obteniéndose así una concentración de 10^5 microorganismos/mL.

Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se prepararon diluyendo el aceite en el caldo Müller-Hinton, con ayuda de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 0.1% v/v, según las concentraciones deseadas (250, 500, 1000, 2000, 3000 y 4000 μ g/mL). Previamente el caldo se esterilizó en tubos de ensayo de 27 mL con tapa de rosca o con tapones de algodón. Se colocó el DMSO y luego la cantidad necesaria del aceite para obtener la concentración requerida. Posteriormente se pasaron 450 μ L de este caldo, a microtubos de 0.6 ml previamente estériles y etiquetados, y se les colocó la concentración

de bacteria. De los microtubos de 0.6 ml, se tomaron 150 μ L pasándolo a tubos de microcentrífuga de 0.2 ml, obteniendo tres repeticiones por cada concentración.

Se incubó por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se les agregaron 50 μ l de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08% a cada tubo, se incubaron por 30 min. a 37°C, en los tubos donde se desarrolló el organismo, el colorante fue reducido a formazán de color rojo, produciéndose un botón rojo-morado en el fondo del tubo. Donde no hubo desarrollo de las bacterias, la solución permaneció clara.

APÉNDICE 8. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL (Wang y Bun, 2002).

-Método Cualitativo

El ensayo contra hongos filamentosos se llevo a cabo en cajas petri (100 X 15 mm) que contengan 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculó un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Después que el micelio se desarrolló, se colocaron discos previamente impregnados con el aceite esencial, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Los discos se colocaron a una distancia de 30 mm del límite micelial.

-Incubación: Las placas fueron incubadas a 23 °C hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

-Controles positivos: Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos con 7µg/disco de Ketoconazol.

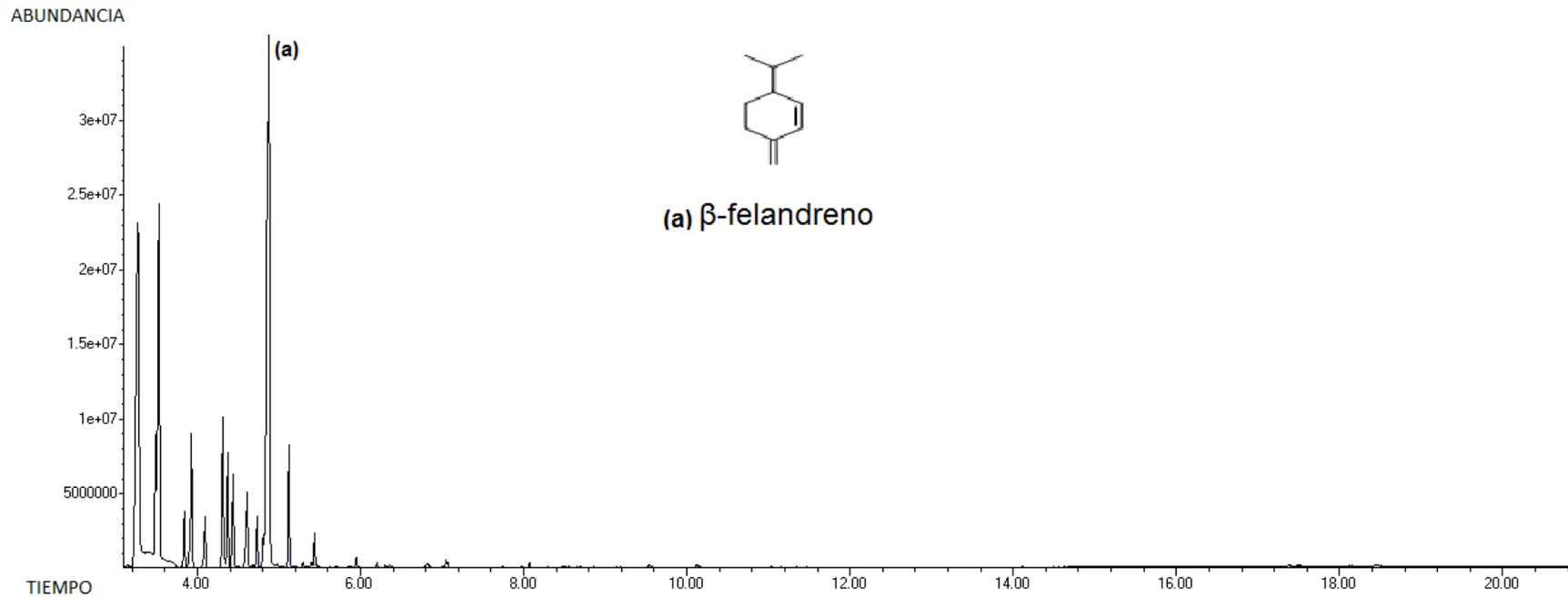
- Interpretación de resultados: En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se realizó por triplicado.

APÉNDICE 9 Datos de la cromatografía de gases del aceite esencial de *B. schelechtendalii*.

Compuesto	Mar-10		Abril-10		Mayo-10		Agosto-10		Sep-10		Mar-11		Abril-11	
	% Área	T.R. min.	% Área	T.R. min.	% Área	T.R. min.	% Área	T.R. min.	% Área	T.R. min.	% Área	T.R. min.	% Área	T.R. min.
β-Mirceno	2.62	4.44	8.68	4.4			3.88	4.4	7.99	4.4	6.51	4.4	6.65	4.43
5-Isopropenil-3			32.29	4.88							35.64	4.8		
Acido hexanóico			1.22	8.32										
Alcanfor			1.13	5.9			2.82	5.95	2.67	5.9	1.88	5.94	1.16	5.94
Bergamol									1.43	5.47				
Borneol			1.27	7.05			2.07	7.05	2.82	7.04	2.55	7	1.42	7.04
Camfeno	1.54	4.09	3.64	4.07	2.97	4.09	2.88	4.1	5.76	4.08	5.23	4	4.08	4.08
Cimeno			2.78	4.8										
Limoneno					13.27	4.83								
Nonano	18.77	3.5	5.89	3.47	8.63	3.52	12.36	3.55	5.2	3.5	8.79	3.5	6.45	3.5
Silvestreno					47.47	4.89								
α-Felandreno	2.62	4.61	20.16	4.62	2.92	4.61	6.42	4.6	18.79	4.63	13.43	4.62	24.62	4.63

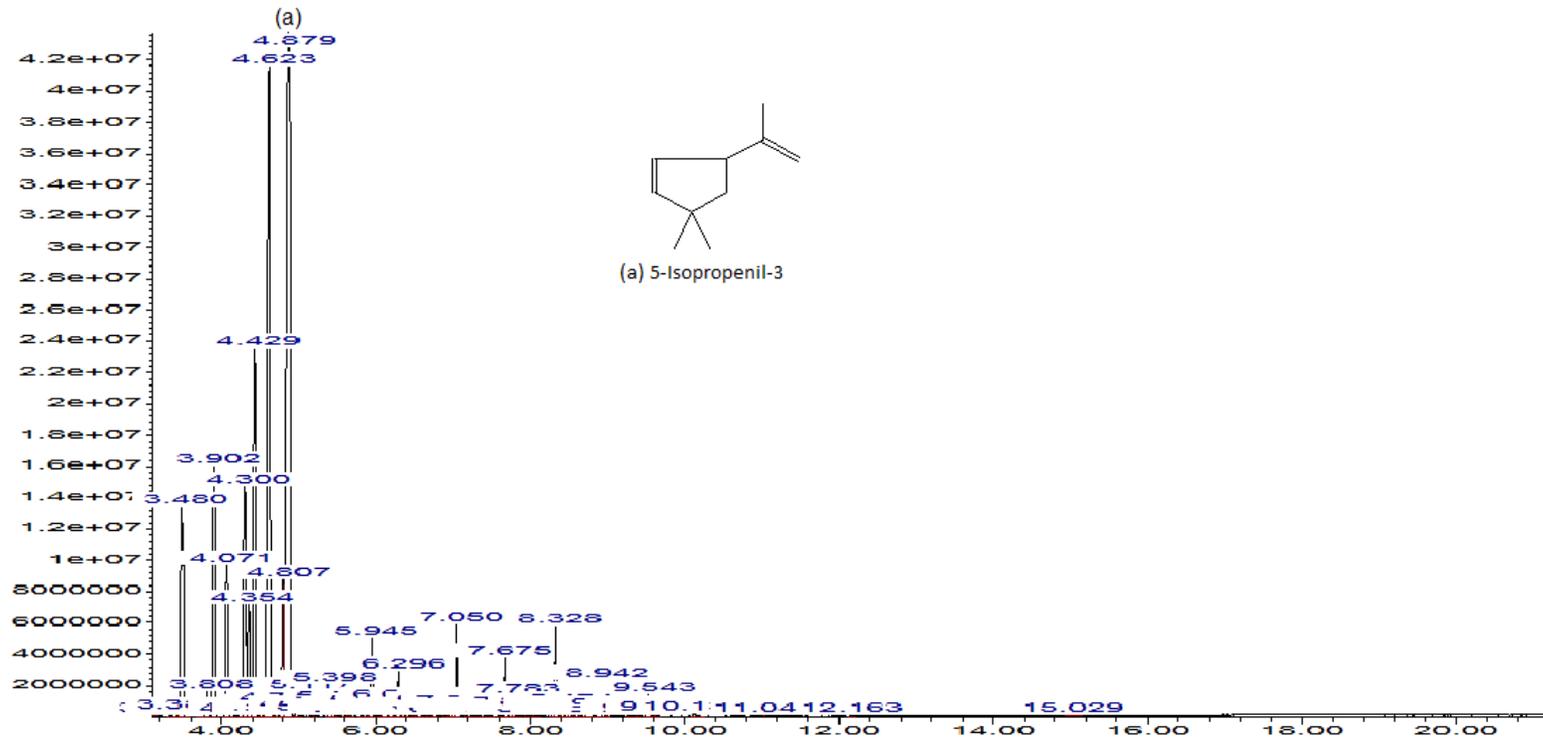
α-Pino	3.8	3.92	6.14	3.9	5.21	3.93	5.65	3.94	6.74	3.9	6.48	3.9	6.47	3.92
β-Felandreno	54.73	4.8			4.85	4.32	43.74	4.9	35.74	4.89				
β-Pino	2.83	4.36	2.6	4.35	7.39	4.4	2.32	4.38	3.7	4.36	3.51	4.3	2.48	4.36
β-Tujeno	1.43	3.84	5.62	4.29					1.02	3.82	5.78	4.3	4.25	4.3
γ-Terpino	2.91	5.12			1.32	5.3							35.08	4.89
δ-Carene	1.26	4.73												
Porcentaje de compuestos identificados	92.51%		91.42%		94.03%		83.57%		90.43%		90.80%		92.66%	

APENDICE 10 Cromatograma de los aceites esenciales de diferentes colectas de *B. schlehtendalii*.



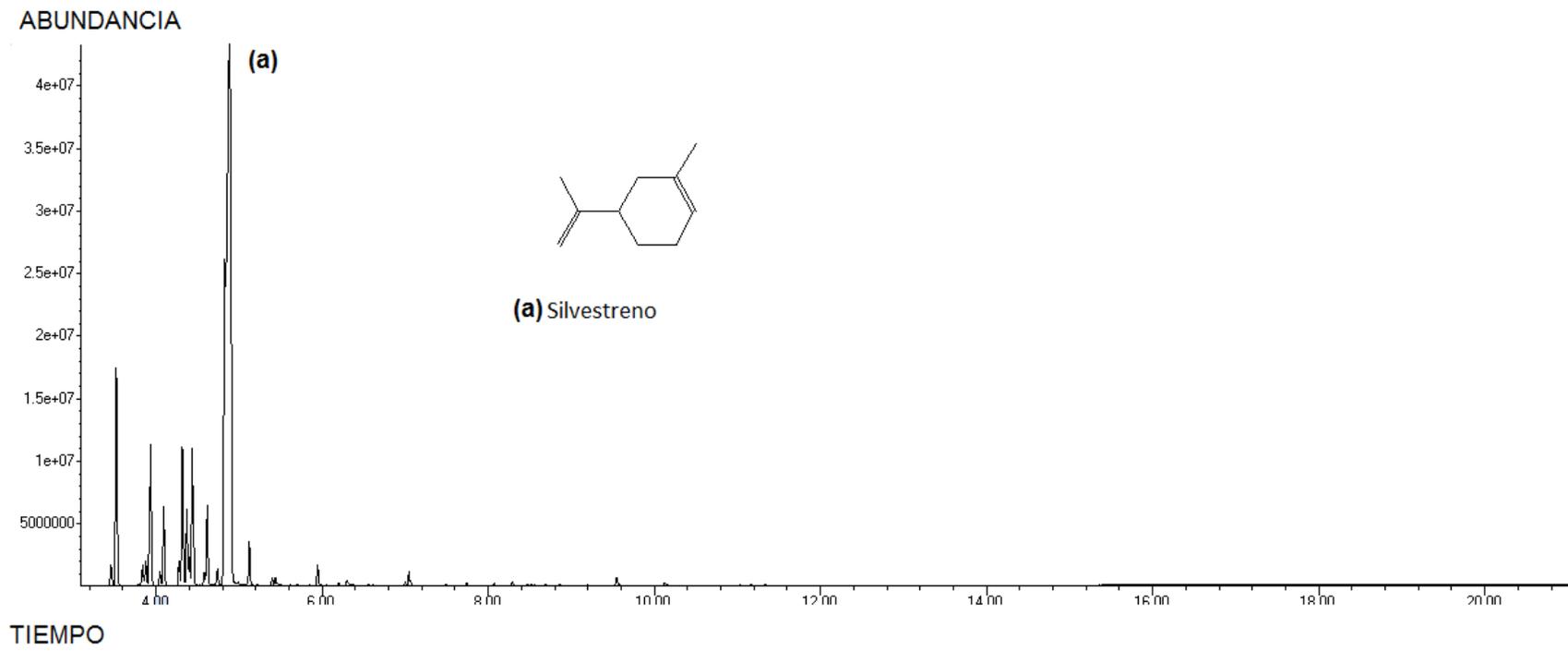
Colecta mes de Marzo 2010.

ABUNDANCIA



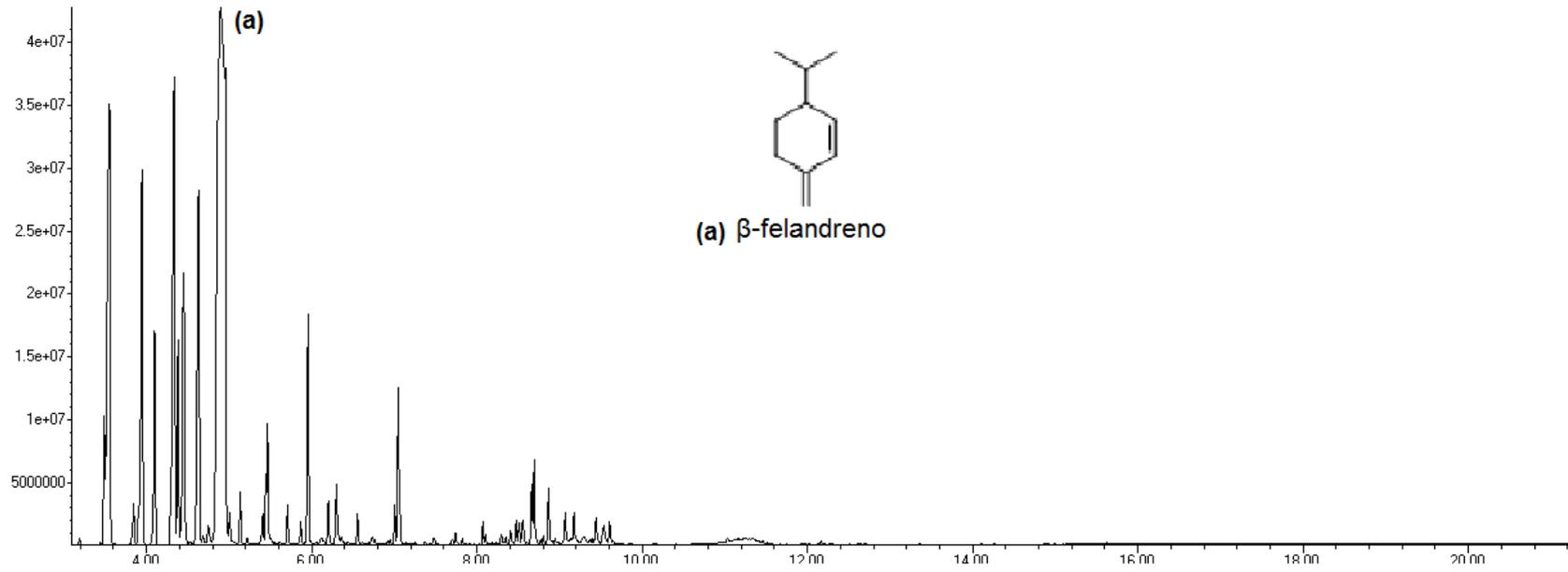
TIEMPO

Colecta mes de Abril 2010.



Colecta mes de Mayo 2010.

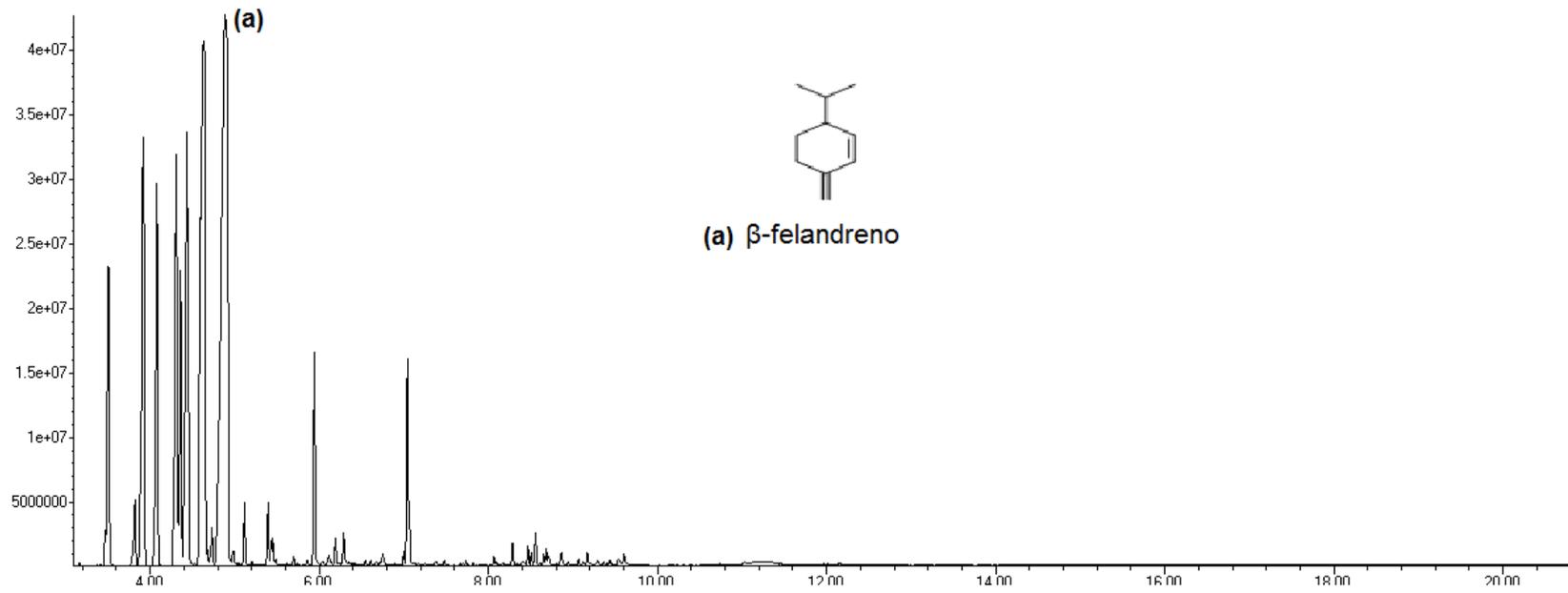
ABUNDANCIA



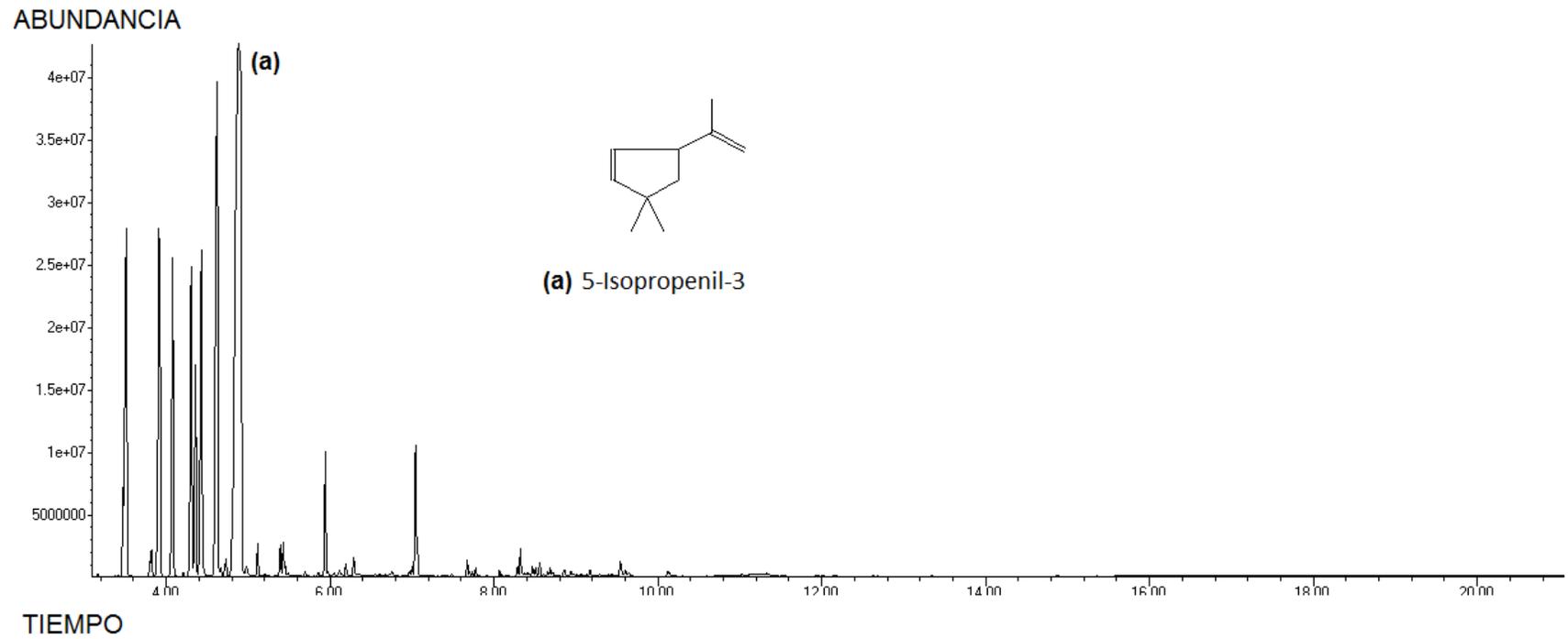
TIEMPO

Colecta mes de Agosto 2010.

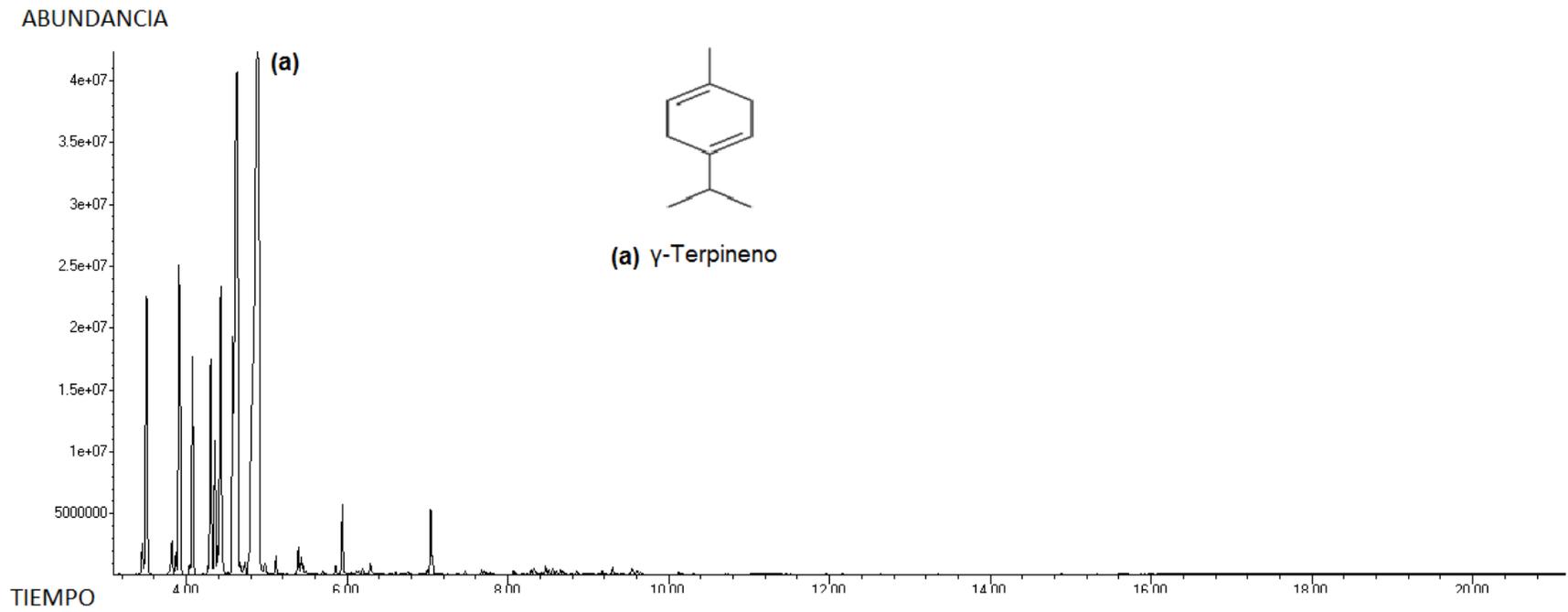
ABUNDANCIA



Colecta mes de Septiembre 2010.



Colecta mes de Marzo 2011.



Colecta mes de Abril 2011.

Literatura citada

- ✿ Alitonou, G., Avlessi, F., Wotto, V.D., Ahoussi, E., Dangou, J., Sohounhloué, D.C.K., 2004. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. Comptes rendus Chimie 7, 1051-1055.

- ✿ Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., Fernandez, G., 2001. Medicina tradicional en El Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 62 (2), 156-161.

- ✿ Andrés, H. A. R., Espinosa, O. D., 2002. Morfología de Plántulas de *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) y sus Implicaciones Filogenéticas. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 70, 5-12.

- ✿ Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54, 4364-4370

- ✿ Arancibia, L., Naspi, C., Pucci, G., Arce, M., 2010. Aromatic plants from Patagonia: chemical composition and antimicrobial activity of de essential oil of *Senecio mustersii* and *S. subpanduratus*. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas 9 (2), 123-126.

- ✿ Araujo, D. J. y Salas A. R., 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. Científica. Universidad Científica del Sur 6, 6-18.

- Aristegui, B., 2002. *Candida albicans* (Robin) Berkhout. Revista Iberoamericana de Micología 3, 25-26.

- Ávalos G.A. y Pérez U., C.E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2 (3), 119-145.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46, 446–475.

- Becerra, J. X., y Lawrence V. D., 1990. Rapid-Terpene-Bath and “squirt-Gun” Defence in *Bursera schlechtendalii* and the counterploy of chrysomelid beetles. Biotropica 22(3), 320-323.

- Braga, P. C., Dal Sasso, M., 2005. Morphostructural alterations of *Candida albicans* induced by thymol. A scanning electron microscopy study. J Chemother. 17, 109.

- Camporese A., Balick M. J., Arvigo R., Esposito R. G., Morsellino N., De Simone F., Tubaro A., 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology 87, 103-107.

- Cano, P. C. A., 2007. Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. Tesis para obtener el grado académico de maestría en recursos vegetales y terapéuticos. Universidad Nacional Mayor de san Marcos. Facultad de farmacia y bioquímica, Perú. 50 pp.

- Carretero, M. E., López-Pérez, J. L., Abad, M. J., Bermejo, J., Tillet, S., Israel, A., Noguera-P, B., 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane

extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. Journal of Ethnopharmacology 116, 11-15.

-  Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 1914–1920.

-  Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology 88, 170–175.

-  Dalleau, S., Catau, E., Bergès, T., Berjeaud, J. M., Inbert, C., 2008. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 31, 572-576.

-  Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. Journal of Agricultural Food Chemistry 54, 2745–2749.

-  Domínguez, S., Xorge, A. 1973. Métodos de Investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281pp.

-  Evans, P. H., Becerra J. X., Lawrence. D. V., y Bowers. W. S., 2000. Chemical analysis of squirt-Gun defence in *Bursera* and counterdefense by chrysomelid beetles. Journal of Chemical Ecology 26, 744-754.

- Fernández, B. Ma. N., 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. UNAM. 98 pp.

- García M., E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 3ª ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 252 pp.

- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R., 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology 26, 194–198.

- Harbone, J. B., Tomas-Barberan, F. A., 1991. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Editorial Oxford science publications. USA. 432 pp

- Helander I., M., Alakomi H., L., Latva K., K., Mattila S., T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris L., G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. Journal of Agricultural Food Chemistry 46, 3590–3595.

- Hernández, M. M. D., 2009. Variación espacio-temporal de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cordia Curassavica* (Jacq) Roemer y Schultes: Boraginaceae (Barredor) en dos zonas del valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 80pp.

- 🌿 Hernández, D. L., Rodríguez, J. M., García D., Pino, A. J., 2003. Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales. Revista Cubana de Plantas Medicinales [online]. 8, (2), pp. 0-0. ISSN 1028-4796.

- 🌿 Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Tan, T. G., Ma, Cuiying., Van Hung, Nguyen., Manh Cuong, Nguyen., Bunyaphatsara, Nuntavan., Doel Soejarto, D., S. Fong, Harry H., 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. Phytochemistry 66, 2745–2751.

- 🌿 Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriology 76, 626–631.

- 🌿 Kalembe, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils current medicinal chemistry. Instituto de Química General de Alimentos, Universidad Técnica de Lodz, Polonia, 10, 813-829.

- 🌿 Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research 1, 119–128.

- 🌿 Koneman, W. E., 1985. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 439 pp.

- 🌿 Kuklinski, C., 2000. Farmacognosia: estudio de ls drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega, Barcelona. 515pp.

- ❖ Kulijanabthagavad, T., Sriubolmans, N., Ruangrunsi, N., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Heracleum samicum*. Journal of Health Research 24, 55-60.

- ❖ Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91, 453–462.

- ❖ Linares, E., y R. Bye, 2008. El copal en México. CONABIO. Biodiversitas 78, 8-1

- ❖ López, H. L. R. 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera Morelensis* Ramírez. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 64pp.

- ❖ Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., Pizza C., 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. Phytochemistry 70, 641-649

- ❖ Martínez, M. D., Flores, A. R., Mendoza, C. M., Basurto, P. F., 2006. Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. Boletín de la Sociedad Botánica de México 79, 79-87.

- ❖ Martínez, J., Sulbarán de Ferrer, B., Ojeda de Rodríguez, G., Ferrer, A., Nava R., 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de la mandarina. Revista de la Facultad de Agronomía 20, 502-512.

- ✿ Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J.M., Viano, J., 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food* 51, 7115-7121.

- ✿ Medina, S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Lic. Biología. UNAM. Fac. Ciencias 35 pp.

- ✿ Mesa, A. A. C, Bueno, S. J. G., 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimioterap.* 17(4), 325-331.

- ✿ Mondello, F., De Bernardis, F., Girolamo, A., Cassone, A., Salvatore, G., 2006. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infectious Diseases.* 6, 158.

- ✿ Mooney H. A., and Emboden, W. A., Jr., 1968. The relationship of terpene composition, morphology, and distribution of populations of *Bursera microphylla* (Burseraceae), *Brittonia* 20, 44-51.

- ✿ Mouhssen, L., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18, 435–448.

- ✿ Noguera, B., Díaz, E., García, M. V., San Feliciano, A., López-Perez, J. L., Israel A., 2004. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 92, 129–133.

- 🌿 Ocampo, A. A., Jiménez, E. M., 1993. La herbolaria medicinal en el tratamiento de las enfermedades de los peces en México. *Veterinaria México* 24 (4), 291-295.
- 🌿 Organización Mundial de la Salud, 2002. Medicina tradicional necesidades crecientes y potencial, Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS, 2, 1-6 (Documento de referencia WHO/EDM/2002.4).
- 🌿 Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M., 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 69, 1046–1055.
- 🌿 Prado, J. V., 2001. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Chilena de Infectología* 18 (1), 6 -9.
- 🌿 Queiroga, C. L., Teixeira D., M. C., Ribeiro, B. B., Melillo de Magalhães, P., 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia* 78, 327–328.
- 🌿 Rosas-Arreguín, P., Arteaga-Nieto, P., Reynoso-Orozco, R., Villagómez-Castro, J. C., Sabanero-López, M., Puebla-Pérez, A. M., Calvo-Méndez C., 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and on the growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 119: 398–402.

- 🌿 Rosas, L. R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 94 pp.

- 🌿 Rzedowski, J., Medina L. R., Calderón, G., 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana* 70, 85-111.

- 🌿 Rzedowski, J. y Calderón, G., 2002. Dos especies nuevas de *Bursera* (BURSERACEAE) del estado de Oaxaca (México). *Acta Botánica Mexicana* 59, 81-90.

- 🌿 Rzedowski, J. y Guevara-Féfer, F., 1992. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Escuela de biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo En: Memoria de la primera Muestra “Los Recursos Vegetales de Michoacán”. Morelia, Mich.

- 🌿 Rzedowski J., Ortiz E., 1988. Estudios Quimiotaxonómicos de *Bursera* (Burseraceae). II. Una especie nueva de origen híbrido de la Barranca de Tolantongo, estado de Hidalgo. *Acta Botánica Mexicana* 001, 11-19.

- 🌿 Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. 429 pp.

- 🌿 Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 91, 621-632.

- Salcedo-Sánchez, B., 1997. Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Biología. UNAM Facultad de Ciencias 6-10 pp.

- Secretaría de Salud. Censo de población 2001. Casa de salud de la Comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, Mexico. 10pp.

- Skočibušić, M., y Bezić N., 2004. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research* 18, 967–970.

- Sikkema, J., De Bont, J. A .M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269, 8022–8028.

- Tadtong, S., Wannakhot, P., Poolsawat, W., Athikomkulchai, S., Ruangrunsi, N., 2009. Antimicrobial activities of essential oil from *Etilingera punicea* Rhizome. *Journal Health Research* 23(2), 77-79.

- Tampieri, M. P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M. S., Falcioni, L., Cioni, P. L. Morelli, I. 2005. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*. 159. 339-457.

- Tapia, P. C., 2008. Retrato microbiológico *Candida glabrata*. *Revista Chilena de Infectología* 25 (4), 293.

- Téllez, V. O., Reyes, C. M., Dávila, A. P., Guerréz, G. K., Téllez, P. O., Alvarez, E. R., Gonzalez, R. A., Rosas, R. I., Ayala, R., M., Hernandez, M. M., Murguia, R. M., Guzman, C. U., 2008. Guía Ecoturística, las plantas de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 48pp.

- Turina, A. V., Nolan, M. V., Zygodlo, J. A., Perillo, M. A., 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry* 122, 101–113.

- Ultee, A., Bennik, M. H., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1561–1568.

- Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174, 233–238.

- Valiente-Banuet, A., Alcantara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arismendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J.A., 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67, 25-75.

- Valiente, B. L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis. UNAM. México 65 pp.

- Vanden Berghe, D. A., & Vlietnick A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant Biochemistry* 6, 47-69 pp.

- 🌿 Wang, H., Bun, T.N., 2002 Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61, 1-6.

- 🌿 Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada M, E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R., 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology* 97 293–299.