



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales de *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Psidium guajava* L. y *Tradescantia pendula* var Zebrina.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA:

QFB. DANIEL ALEJANDRO VÁZQUEZ CAHUICH

VILLAHERMOSA, TABASCO.

MAYO, 2011.



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales de *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Psidium guajava* L. y *Tradescantia pendula* var Zebrina.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA:

QFB. DANIEL ALEJANDRO VÁZQUEZ CAHUICH

ASESORES INTERNOS

M. C. JUDITH ESPINOSA MORENO

M.C. JOSÉ RODOLFO VELÁZQUEZ MARTÍNEZ

ASESOR EXTERNO

DRA. ROCÍO DE LOURDES BORGES ARGAEZ

VILLAHERMOSA, TABASCO.

MAYO, 2011.

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Agropecuarias

"ESTUDIO EN LA DUDA, ACCIÓN EN LA FE"

ASUNTO: EL QUE SE INDICA

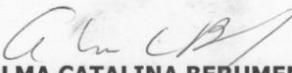
Villahermosa, Tab., 12 de Mayo de 2011.

QFB. DANIEL ALEJANDRO VAZQUEZ CAHUICH
EGRESADO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS ALIMENTARIAS
PRESENTE

Por este conducto y de acuerdo a su solicitud de autorización de impresión de Tesis, informo a usted que sobre la base del Artículo 26 del reglamento de Posgrado de esta Universidad, esta Dirección a mi cargo le **autoriza** la **impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de Tesis intitulado: "**Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales de *Malvaviscus arboreus Cav*, *Pimenta dioica (L.) Merr*, *Byrsonima crassifolia (L.) Kunth*, *Psidium guajava L.* y *Tradescantia pendula var Zebrina*".**

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

ATENTAMENTE


M.A.A. ALMA CATALINA BERUMEN ALATORRE
DIRECTORA

U.J.A.T.



DIVISION ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN

4 C.c.p. Expediente del Alumno.
C.c.p. Archivo

Miembro CUMEX desde 2008
Consortio de
Universidades
Mexicanas
UNA ALMIZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Carretera Villahermosa-Teapa Km 25. Tel. (993) 142-9151, 358-1585 Fax (993) 142-9150
e-mail: direccion@daca.ujat.mx

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Agropecuarias
"ESTUDIO EN LA DUDA, ACCIÓN EN LA FE"

Mayo 11 de 2011

ASUNTO: EL QUE SE INDICA

M. A. A. ALMA CATALINA BERUMEN ALATORRE

Villahermosa, Tab., 12 de Mayo de 2011.

DIRECTORA DE LA DIVISION ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE.

QFB. DANIEL ALEJANDRO VAZQUEZ CAHUICH

Por este conducto y de la manera más atenta solicito la autorización para llevar a cabo la impresión del trabajo recepcional bajo la modalidad de tesis titulado "Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales de *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Psidium guajava* L. y *Tradescantia pendula var Zebrina*", realizado por un servidor, en virtud de que se encuentra aprobado por el jurado.

informo a usted que sobre el tema del Artículo 26 del reglamento de Posgrado de esta

Universidad, esta Dirección le autoriza la impresión de su trabajo

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Actividad antimicrobiana y composición química de las plantas de *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Psidium guajava* L. y *Tradescantia pendula var Zebrina*

M.A.A. Alma Catalina Berumen Alatorre
13/05/2011
D.B.G.

ATENTAMENTE

QFB. DANIEL ALEJANDRO VAZQUEZ CAHUICH

EGRESADO DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS ALIMENTARIAS



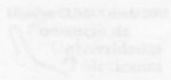
DEPARTAMENTO DE
CERTIFICACION Y
TITULACION

M.A.A. ALMA CATALINA BERUMEN ALATORRE
DIRECTORA

c.c.p. Dr. Rodolfo Osorio. Coordinador de investigación y posgrado. DACA-UJAT.

c.c.p. Pedro García Alamilla. Jefe del área de estudios de posgrado. DACA - UJAT.

c.c.p Archivo.



Carretera Villahermosa-Teapa Km 26. Tel: (983) 442-9181, 354-1805 Fax: (983) 442-9181
e-mail: direccion@daca.ujat.mx



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Plantas aromáticas	2
2. Plantas con actividad biológica	3
2.1. Pimienta (<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.)	4
2.2. Nance (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth)	4
2.3. Matalí (<i>Tradescantia pendula</i> var. Zebrina)	5
2.4. Tulipancillo (<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.)	5
2.5. Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	5
3. Aceites esenciales (AE)	6
3.1. Procesos de extracción de AE	8
3.2. Identificación de componentes en los AE	9
3.2.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	10
3.2.2. Cromatografía de Gases (CG)	11
3.2.3. Cromatografía de Gases- Espectrometría de masas (CG-MS)	12
4. Enfermedades transmitidas por los alimentos	13
5. Actividad antimicrobiana de extractos derivados de plantas	14
5.1. Difusión en agar	15
5.2. Dilución en agar	16
5.3. Dilución en caldo	16
5.4. Epsilon-test (E-test)	17
5.5. Bioautografía	17

III	OBJETIVOS	18
	Objetivo general	18
	Objetivos específicos	18
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1.	Acondicionamiento de la materia prima	19
4.2.	Extracción de aceite esencial	19
4.3.	Evaluación de actividad antimicrobiana	20
4.3.1.	Activación de la cepa y ajuste del inóculo	20
4.3.2.	Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar	20
4.3.3.	Identificación de los componentes activos de los aceites esenciales mediante el método de Bioautografía	20
4.3.4.	Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida por el método de microdilución en placa	21
4.3.5.	Identificación de compuestos en los aceites esenciales por cromatografía de gases- espectrometría de masas	22
4.3.6.	Diseño experimental y análisis estadístico	23
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1.	Extracción de aceite esencial	24
5.2.	Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	25
5.2.1	Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar	25
5.3.	Identificación de los componentes activos de los aceites esenciales mediante el método de Bioautografía	26
5.4.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en placa	28
5.5.	Concentración mínima bactericida (CMB) por el método de microdilución en placa	30
5.6.	Identificación de componentes por cromatografía de gases- espectrometría de masas (GC-MS)	31
5.6.1.	Composición química del aceite esencial de la hoja de <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	31
5.6.2.	Composición química del aceite esencial de la hoja de <i>Psidium guajava</i> L.	32

5.6.3.	Composición química del aceite esencial de la hoja de <i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.	33
5.6.4.	Composición química del aceite esencial de la hoja de <i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth.	34
VI.	CONCLUSIONES	35
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
VIII.	ANEXOS	45
	Anexo 1. Cromatograma del aceite esencial de la hoja de pimienta (<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.)	46
	Anexo 2. Cromatograma del aceite esencial de la hoja de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	47
	Anexo 3. Cromatograma del aceite esencial de la hoja de tulipancillo (<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.)	48
	Anexo 4. Cromatograma del AE de la hoja de nance (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth)	49

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de los aceites esenciales (AE)	8
Cuadro 2. Principales métodos de extracción de AE, ventajas y limitaciones	9
Cuadro 3. Principales grupos químicos contenidos en diversas plantas con actividad antimicrobiana	10
Cuadro 4. Casos de enfermedades potencialmente transmitidas por alimentos en México de 1996 a 2000	14
Cuadro 5. Algunos agentes causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's)	14
Cuadro 6. Rendimiento (%) de los aceites esenciales	24
Cuadro 7. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar de los AE	25
Cuadro 8. Referencias frontales en cromatografía en capa fina para cada fracción activa de los aceites esenciales	27
Cuadro 9. Concentración mínima inhibitoria (mg mL^{-1}) de los aceites esenciales	29
Cuadro 10. Concentración mínima bactericida (CMB) de aceites esenciales	30
Cuadro 11. Compuestos del aceite esencial de la hoja de pimienta (<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.)	31
Cuadro 12. Principales compuestos del aceite esencial de la hoja de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	33
Cuadro 13. Composición química del aceite esencial de la hoja de tulipancillo (<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.)	34
Cuadro 14. Principales compuestos del aceite esencial de la hoja de nance (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth)	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Industrias y categorías donde se emplean AE	7
Figura 2. Placa de bioautografía de los AE de las especies vegetales frente a <i>S. aureus</i>	27

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

RESUMEN

Los aceites esenciales (AE) están constituidos por compuestos volátiles, por lo general son terpenos; la presencia de uno o varios terpenos, así como la abundancia en la que se encuentran en el aceite esencial juegan un papel importante para que la actividad antimicrobiana pueda manifestarse. El presente trabajo evaluó la actividad antimicrobiana y composición química de los AE de las hojas de tulipancillo (*Malvaviscus arboreus* Cav.), pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), guayaba (*Psidium guajava* L.) y matalí (*Tradescantia pendula* var *Zebrina*). El AE de cada especie vegetal se extrajo por hidrodestilación en un equipo tipo Clevenger. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se emplearon los métodos de difusión en disco, bioautografía y microdilución, subsecuentemente cada extracto fue analizado por cromatografía de gases- espectrometría de masas para conocer el perfil químico. El mayor rendimiento de AE se obtuvo de la hoja de tulipancillo seguido de la hoja de pimienta, guayaba y nance mientras que de las hojas de matalí no se obtuvo AE. Los AE de las cuatro especies presentaron actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar frente a *S. aureus*, *S. typhimurium* y *B. cereus*. En cuanto a la bioautografía, la fracción 4 del AE de la hoja de pimienta inhibió el crecimiento de *B. cereus*, *S. typhimurium* y *S. aureus*, mientras que la fracción 3 del mismo AE fue activa para *S. aureus*. En el AE de guayaba se mostraron activas las fracciones 2, 3 y 4, las cuales inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. Los AE de nance y tulipancillo mostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* sin definir fracciones específicas. En el método de microdilución en placa se determinó que *B. cereus* fue el más sensible a los AE de pimienta, guayaba, nance y tulipancillo a concentraciones de 10, 5, 20 y 20 mg mL⁻¹, respectivamente. El eugenol fue el principal componente del AE de pimienta y guayaba, con porcentajes de abundancia de 94.86% y 33.84% determinado por cromatografía de gases- espectrometría de masas.

Palabras claves: aceites esenciales, actividad antimicrobiana, cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-MS), eugenol.

ABSTRACT

Essential Oils (AE) are formed by volatile compounds are usually terpenes; the presence of one or more terpenes and abundance in found in the essential oil play an important role in the antimicrobial activity may manifest . The present study evaluated the antimicrobial activity and chemical composition of the leaves of AE of tulipancillo (*Malvaviscus arboreus* Cav.), pepper (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), guava (*Psidium guajava* L.) and matalí (*Tradescantia pendula* var Zebrina). The AE of each plant species was extracted by hydrodistillation in a Clevenger-type equipment. For the evaluation of antimicrobial activity were used disk diffusion methods, microdilution bioautography and subsequently each extract was analyzed by gas chromatography – mass spectrometry to determine the chemical profile. The highest yield of AE was obtained from the leaf blade followed tulipancillo pepper, guava and nance while the leaves of matali there was no AE. The AE of the four species showed antimicrobial activity by agar diffusion method against *S. aureus*, *S. typhimurium* and *B. cereus*. As for the bioautography AE fraction 4 of pepper leaf inhibited the growth of *B. cereus*, *S. typhimurium* and *S. aureus*, while the fraction 3 of the same AE was active for *S. aureus*. In the AE of guava were active fractions 2, 3 and 4, which inhibited the growth of *S. aureus*. AE tulipancillo, nance and showed antibacterial activity against *S. aureus* without defining specific fractions. The microdilution method was determined that *B. cereus* was the most sensitive to AE pepper, guava, nance and tulipancillo at concentrations of 10, 5, 20 and 20 mg mL⁻¹, respectively. Eugenol was the main component of the AE of pepper and guava, with Percentage of abundance of 94.86% and 33.84% determined by gas chromatography – mass spectrometry.

Key words: essential oils, antimicrobial activity, gas chromatography – mass spectrometry (CG-MS), eugenol.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se reconoce que las plantas sintetizan metabolitos secundarios, la mayoría con actividad antimicrobiana (Tajkarimi, 2010). Existen numerosos estudios sobre extractos de plantas los cuales se proponen como alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Acosta *et al.*, 1998). Los aceites esenciales poseen actividad antimicrobiana, debido a que están constituidos por compuestos volátiles, la mayoría de ellos, terpenos. Investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de diversas plantas, hierbas y/o especias, han resaltado que dichos extractos son ligeramente más activos frente a bacterias Gram positivas que a bacterias Gram negativas (Burt, 2004).

Los aceites esenciales se pueden extraer de la flor, la semilla, las hojas y/o frutos de las plantas y tanto su concentración como su composición dependen de diversos factores como la variación estacional (Cristiani *et al.*, 2010), los nutrientes del suelo (Powell y Raffa, 1999), la parte de la planta utilizada (Palá-Paúl *et al.*, 2005), la etapa de desarrollo de la misma (Amna *et al.*, 2010) y el método de extracción (Quintero *et al.*, 2004).

El conocimiento de la composición química de los aceites esenciales ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas analíticas como la cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta presión y cromatografía de gases, que han permitido conocer los compuestos que integran una considerable parte de los aromas y sabores que proveen los aceites esenciales (Ricker y Daly, 1998; Janardhanan y Thoppil, 2004). Muchos de ellos están siendo aplicados en la industria de alimentos, como aditivos, conservadores y bactericidas (Tajkarimi *et al.*, 2010). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las hojas de plantas alimentarias tropicales nativas, *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Psidium guajava* L. y *Tradescantia pendula* var *Zebrina* frente a tres bacterias de importancia alimentaria.

II. ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) han declarado que las dos terceras partes de la población de nuestro planeta (aproximadamente 4 mil millones de personas) recurre a las hierbas aromáticas y medicinales (Mendoza, 2008). Recientemente ha aumentado el interés, por parte de instituciones de investigación y compañías farmacéuticas, en el estudio de productos naturales con actividad antimicrobiana (George *et al.*, 2005). Este interés se debe a los crecientes reportes sobre la resistencia de los microorganismos a los fármacos utilizados, cuyo problema genera cuantiosos gastos a la salud pública así como a la economía del país o región que los sufre (Mahady, 2005).

En Tabasco se han realizado diversos inventarios de plantas con propiedades medicinales donde se ha reportado el uso de diferentes partes de la planta, en infusión o en extracto alcohólico, para combatir diversas enfermedades respiratorias y gastrointestinales, entre otras. Algunas de las especies son utilizadas como alimento y/o condimento, por ejemplo: guayaba (*Psidium guajava*), orégano (*Plectranthus amboinicus*), perejil (*Eryngium foetidum*), pimienta (*Pimenta dioica*) y albahaca (*Ocimum micranthum*) (Maldonado, 2003).

Por otro lado, los aceites esenciales son los aditivos naturales que más interés han generado en los últimos años en la industria de los alimentos ya que ofrecen una alternativa antimicrobiana y antioxidante que pueden garantizar la seguridad e inocuidad de los alimentos en donde se adicionen y sin riesgo de contaminar el entorno (Bosquez-Molina *et al.*, 2009).

1. Plantas aromáticas

La vida en la tierra depende de las plantas, su biodiversidad ha desempeñado un papel fundamental para el desarrollo de la humanidad, que las ha utilizado para sustituir necesidades básicas como vivienda, alimento y medicina (Celis *et al.*, 2008), inclusive las fragancias que generan algunas plantas aromáticas se

empleaban para rituales religiosos o como perfumes (Skaria *et al.*, 2007). La presencia de aromas o compuestos volátiles en las plantas se debe, principalmente, al establecimiento de comunicación entre insectos y/o plantas, teniendo la particularidad de inducir cambios en el comportamiento de los que tienen contacto con ellas, ya que actúan como atrayentes o no, a la alimentación u ovoposición de los insectos, es decir como semioquímicos (Herrmann, 2010).

Las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de compuestos volátiles o aromáticos y por tanto constituyen la materia prima para su obtención, ya sea empleando toda la planta o parte de ella como las hojas, la flor, la raíz, etc. (Ortuño, 2006); también pueden aportar más de un producto comercialmente importante, dependiendo de factores relativos a la especie, del medio ambiente o de los procesos de extracción empleados. Por ejemplo, el naranjo es una planta típica de la que se pueden obtener distintos productos aromáticos dependiendo de la parte utilizada: de las flores se obtiene la esencia del azahar, del epicarpio de los frutos se obtiene la esencia de naranja y de los frutos aún verdes y hojas se obtiene la esencia del “petit grain” (Bandoni, 2002).

2. Plantas con actividad biológica.

Los hombres primitivos reconocieron su dependencia por la naturaleza tanto en la salud como en la enfermedad. Conducido por instinto, gusto y experiencia, la gente primitiva se curaba de las enfermedades usando plantas, animales y los minerales que no eran la parte de su dieta habitual. De hecho, la mayor parte de las farmacopeas de medicina científica fueron elaboradas a partir de la ciencia herbaria de pueblos nativos (Kim, 2005).

Para determinar el potencial y promover el empleo de plantas con actividad biológica, es esencial intensificar el estudio de plantas medicinales que se encuentran en el conocimiento popular (Buenz, 2005).

2.1. Pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merr).

Pertenece a la familia Myrtaceae, es nativa de la región del Caribe especialmente de países como México, Cuba y Jamaica, también se le puede identificar (sinonimia botánica) como *Pimenta officinalis* Lindl, *Myrtus dioica* L.; *Myrtus pimenta* L.; *Pimenta officinalis*. Esta especie aromática es importante en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos. El aceite esencial se usa como aditivo alimentario y como antioxidante facilitando la conservación de la carne. Las semillas contienen entre un 3 y 4% de aceites esenciales así como resinas, taninos, azúcar y gomas (Martínez *et al.*, 2004). En el campo medicinal se ha usado como anestésico y en perfumería se usa el aceite esencial de hoja o de fruto debido a su característico aroma (Macia, 1998).

Dentro del saber tradicional popular se emplea para combatir el vómito que implica administrar por vía oral la decocción, con sal, de la semilla en asociación con la corteza de la canela (*Cinnanomum verum*) (Germosén- Robineau, 2005).

2.2. Nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)

En América latina, se le conoce por los siguientes nombres comunes: Maricao, manteco, chi, maricao verde, nance, nance agrio, nance verde, nanche. Pertenece a la familia Malpighiaceae y es originario de Mesoamérica (Centurión *et al.*, 2004).

En la medicina tradicional, la infusión de hojas de esta especie es empleada contra infecciones cutáneas, para corregir desórdenes gastrointestinales, es digestivo, emenagogo, febrífugo, vulnerario y se recomienda para tratar la leucorrea y problemas de las encías, mientras que su corteza tiene propiedades astringentes y la infusión de la misma es empleada como antidiarreico, inflamaciones de la vejiga, contra la sarna y en la cicatrización de heridas (Centurión *et al.*, 2004; González, 2007).

De la corteza de esta planta se obtienen fibras muy resistentes que contienen de 17-28% de taninos y 3% de ácido oxálico; las flores son una importante fuente de néctar para las abejas y sus frutos son ricos en vitamina C (90-240 mg 100 g⁻¹),

éstos se consumen crudos o cocidos y a veces se dejan reposando en distintos tipos de licor para incrementar su sabor (Gonzalez, 2007).

2.3. Matalí (*Tradescantia pendula* var. *Zebrina*)

Es originaria de México, El Caribe y Centroamérica (Restrepo *et al.*, 2005). La coloración de sus hojas es debido a las antocianinas, que pueden usarse como colorantes alimentarios, así como a los flavonoides, zebrinina y el compuesto mono-decafeilado (Argueta *et al.*, 1994). La infusión de esta planta se usa contra trastornos digestivos o para controlar la diabetes mellitus tipo 2 (Restrepo *et al.*, 2005). La toxicidad de dicha especie se ha reportado para infusiones en dosis altas ($750 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) la cual produce un porcentaje bajo de alteraciones hepáticas, en específico, tumefacción celular (Isaza *et al.*, 2005).

2.4. Tulipancillo (*Malvaviscus arboreus* Cav.)

La planta es originaria de México. En la sinonimia popular se le conoce como chocho, manzanilla, manzanita de pollo, manzanito, monacillo, tulipán, tulipán de monte, tulipancillo, tulipancillo de monte. Mientras que en la sinonimia botánica destacan: *Malvaviscus acapulcensis* Kunth; *Malvaviscus mollis* DC. El fruto es comestible y la infusión de las hojas se usa para lavar el pelo y dejarlo lustroso y suave (Arboretum UFM, 2007) y también es utilizado para la tosferina; su raíz se usa como antiséptico urinario, enfermedades del riñón y como diurético. La flor o tallo y hojas macerados se aplican localmente contra el sarampión (Argueta *et al.*, 1994).

2.5. Guayaba (*Psidium guajava* L.)

Pertenece a la familia Myrtaceae y se cultiva en zonas tropicales. Su origen es incierto pero se le ubica en Mesoamérica. En México se encuentra silvestre desde el Sur de Tamaulipas, Este de San Luis Potosí y al Norte de Puebla hasta Veracruz y en la Península de Yucatán en la vertiente del Golfo, de Sonora hasta Chiapas en la vertiente del Pacífico. Dentro de los nombres comunes con el cual

se le conoce están: Al-pil-cal (l. chontal, Oaxaca.); A'sihuit't (l. totonaca, Puebla.); Bjuí, Bui, Pehui, Yaga-huí (l. zapoteca, Oaxaca.); Ca'aru (l. cora, Nayarit.); Chak-pichi, Pichi (l. maya, Yucatán.) y Guayaba manzana (Tabasco). (CONAFOR, 2009). Su fruta es utilizada para hacer bebidas, dulces, jalea, pasta o para consumirla en fresco; contiene más del doble de Vitamina C que la naranja y puede contener, dependiendo de la variedad, entre 486 mg y 871 mg de Vitamina C por 100 g de fruto fresco. La hoja es usada para teñir seda por los malayos así como curar enfermedades gastrointestinales, escalofríos y dolor de estómago (Argueta *et al.*, 1994).

3. Aceites esenciales (AE)

El término "Aceite Esencial" (AE) lo utilizó por primera vez Paracelso en el siglo XVI, quien utilizó dichos aceites como medicamento (Ortuño, 2006).

Las aplicaciones de los AE en distintas industrias se muestran en la Figura 1, en cosmética se utilizan como fragancias o lociones por sus características aromáticas, en la industria de alimentos se emplean como saborizantes o conservadores, y, por último, en la industria farmacéutica son aprovechadas sus propiedades para la elaboración de antisépticos, analgésicos, antibióticos, anticancerígenos y recientemente ha despuntado su uso en la aromaterapia (López, 2004; Guentert, 2007).

La demanda mundial de AE está tradicionalmente cubierta por algunos países; más del 50% de la producción mundial proviene de países en desarrollo lo que demuestra la importancia de los climas tropicales o subtropicales para las especies productoras de aceites esenciales, además de disponer de mano de obra barata para poder competir en calidad y precio en el mercado global. Sudamérica representa desde 1998 la segunda región del mundo que provee de aceites esenciales a Estados Unidos de América (USA); entre los 35 países líderes proveedores de este mercado se encuentra ocho países de la región: Brasil, Argentina, México, Chile, Perú, Paraguay, Guatemala y República Dominicana (Bandoni, 2002).

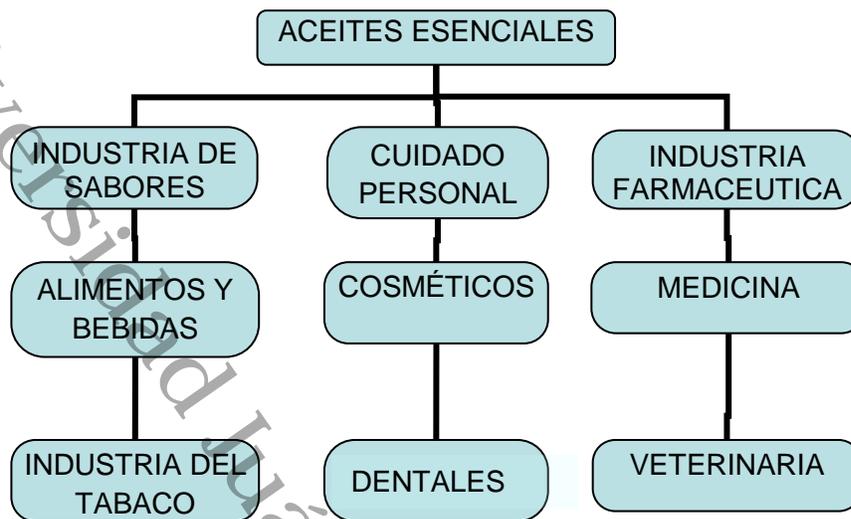


Figura 1. Industrias y categorías donde se emplean AE.

Fuente: Douglas *et al.*, 2005

Los AE o esencias son parte del metabolismo de las plantas, están constituidos generalmente por terpenos, la mayoría de ellos volátiles. Se pueden localizar en diferentes partes de la planta tales como la flor, las semillas, las hojas y los frutos. Constituyen entre 0.1% y 1% del peso seco de la planta y cuando están frescos a temperatura ambiente son incoloros, por lo general son menos densos que el agua y con un alto índice de refracción (López, 2004). Los AE se pueden clasificar con base en diferentes criterios, por ejemplo por su consistencia y origen (Cuadro 1).

Cabe destacar que los AE varían, en concentración y composición, debido a diversos factores como son: la variación estacional (Toncer *et al.*, 2010; Cristiani *et al.*, 2010), los nutrimentos del suelo (Powell y Raffa, 1999), la parte de la planta utilizada (Palá-Paúl *et al.*, 2005) y la etapa de desarrollo de la misma (Amna *et al.*, 2010), así como las condiciones de secado (Mejia *et al.*, 2007), el método de extracción (Quintero *et al.*, 2004), entre otros factores.

Cuadro 1. Clasificación de los aceites esenciales (AE).

CRITERIO	CLASIFICACION	EJEMPLOS
Consistencia	Fluidos	Líquidos muy volátiles a temperatura ambiente: esencias de menta, salvia, limón, albahaca, etc.
	Bálsamos	De consistencia espesa, poco volátiles y propensos a polimerizarse: bálsamo de Perú.
	Oleorresinas	Líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas: caucho, gutapercha, oleorresina de paprika, etc.
Origen	Naturales	Se obtienen directamente de la planta y no se someten posteriormente a ninguna modificación física o química: esencias de plantas aromáticas y flores.
	Artificiales	Se obtienen a través de los procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno de sus componentes principales, o son la mezcla de varias esencias naturales, por ejemplo, esencia de anís enriquecida con anetol.
	Sintéticos	Mezclas de diversos productos químicos obtenidos sintéticamente.

Fuente: Gil y Saéz, 2005.

3.1. Procesos de extracción de AE

La extracción es una operación unitaria de transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios componentes en un disolvente selectivo (Costa *et al.*, 1991). Para extraer los compuestos que poseen las plantas es necesario poner en contacto la fuente natural, que contenga a dichos compuestos, con una fase líquida (solvente). Los métodos tradicionales de extracción se han generado aprovechando las características físicas y químicas de los compuestos; entre ellas el método Soxhlet, hidrodestilación y maceración, donde el disolvente puede ser agua, alcohol o grasa caliente, los cuales requieren de prolongados tiempos de contacto (soluto-solvente) y grandes volúmenes de solventes (Cuadro 2). Con el objeto de acortar el tiempo de extracción, aumentar el rendimiento y mejorar la calidad de los extractos se han desarrollado técnicas nuevas para la extracción de solutos en matrices sólidas, dentro de éstas destacan: la extracción asistida con

ultrasonido, la extracción asistida por microondas, extracción líquida a alta presión y la extracción con fluidos supercríticos (Velasco *et al.*, 2007).

Para el caso de los AE, el proceso de extracción debe ser cuidadoso para no alterar los metabolitos del material vegetal. El rendimiento y la composición química de los AE serán distintos según cada método de extracción que se emplee, ya que unos favorecen la volatilidad y solubilidad de determinados compuestos (Quintero *et al.*, 2004). No obstante, la técnica más utilizada para la obtención de AE es la denominada por arrastre de vapor, aunque también pueden obtenerse por extracción con disolventes orgánicos a temperatura ambiente (Romero, 2004; López, 2004).

Cuadro 2. Principales métodos de extracción de AE, ventajas y limitaciones.

Método	Ventajas	Limitaciones
Arrastre con vapor.	Buenos rendimientos en aceite extraído. Obtención del aceite puro, libre de solvente. Bajo costo.	Procesos colaterales de polimerización y resinificación de terpenos o hidrólisis de ésteres. Destrucción térmica de algunos componentes.
Extracción líquido-líquido (solventes volátiles).	Uso de temperaturas bajas. No provoca termodestrucción, ni alteración química de los aceites.	Costoso, contaminante, riesgo de incendio y explosión. Difícil separar completamente el solvente.
Extracción con fluido supercrítico CO ₂ .	Alto rendimiento. No contamina. Se puede reciclar el solvente. No hay alteración química del aceite.	Ácidos grasos, pigmentos y ceras también pueden ser extraídos junto con el AE. Alta inversión inicial.
Maceración (solventes no volátiles y Enfleurage).	No hay destrucción térmica y deterioro químico de los compuestos. Extracción de esencias de flores delicadas (rosa, jazmín, azahar, etc.).	Poco rendimiento del AE. Difícil separación del solvente

Fuente: Gil y Saéz, 2005.

3.2. Identificación de componentes en los AE

La interacción microorganismo-planta ha generado una gran variedad de compuestos, muchos con actividad antimicrobiana (Cuadro 3), de la cual se estima que se han aislado tan solo 12,000 compuestos, lo que constituye el 10%

de los metabolitos secundarios, por ejemplo: fenoles simples, quinonas, cumarinas, taninos, flavonas y alcaloides (Tajkarimi *et al.*, 2010).

El conocimiento de los componentes de los AE y de su estructura molecular ha permitido el desarrollo de la industria de perfumes y aromatizantes sintéticos, mientras que en la industria de alimentos los componentes con actividad antimicrobiana se usan para la preservación de los alimentos y para prevenir o controlar el crecimiento de microorganismos patógenos (seguridad alimentaria). Cabe aclarar que los métodos, mecanismos de acción, toxicidad y efectos sensoriales en los alimentos aún no están bien comprendidos (Primo, 1995; Tajkarimi *et al.*, 2010). Conocer el perfil químico de los AE no hubiera sido posible si no se hubieran desarrollado en el campo de la química una gran cantidad de herramientas sofisticadas entre las cuales destacan: técnicas cromatográficas como la cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta presión y cromatografía de gases; de hecho, una considerable parte de los aromas y sabores que proveen las plantas han sido identificados en los AE utilizando estas técnicas (Ricker y Daly, 1998; Janardhanan y Thoppil, 2004).

Cuadro 3. Principales grupos químicos contenidos en diversas plantas con actividad antimicrobiana.

Grupos químicos	Compuesto	Planta	Inhibe
Fenoles simples	Ác. antémico	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i>	Virus y bacterias
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i>	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>S. mutans</i>
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Cocos Gram positivos.
	Pipericina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>

Fuente: Modificado de Domingo y López-Brea, 2003.

3.2.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

LA CCF es ampliamente utilizada en la separación, identificación y cuantificación de diversas sustancias de origen bioquímico, químico-biológico, farmacéutico y toxicológico, ya que es rápida y con una adecuada resolución (Skoog *et al.*, 2001).

En general, una CCF se realiza añadiendo pequeñas gotas de solución cerca del extremo inferior de la placa (matriz de soporte que se denomina fase estacionaria). Dicha placa se sumerge en un pequeño volumen de fase móvil (mezcla de solventes). La polaridad de la mezcla de solventes se elige de acuerdo a la mezcla de compuestos que se desea separar. Como sólo la base de la placa queda sumergida, el solvente asciende por capilaridad. Al recorrer la placa, la fase móvil va arrastrando a las sustancias apolares y aquellas más polares son retenidas por la fase estacionaria dando lugar a la separación. Finalmente, una vez que la placa esté desarrollada, se deja secar y se revela con un reactivo que colorea las sustancias de interés. La movilidad relativa o referencia frontal (R_f) es la relación entre la distancia recorrida por la mancha de un compuesto, dividida entre la distancia recorrida por el frente de solvente al momento de sacar la placa del solvente (Marcano y Hasegawa, 2002).

Entre las investigaciones realizadas empleando este tipo de separación cromatográfica, se tiene la determinación cuantitativa de vitaminas liposolubles, pesticidas clorados y fosforados, analgésicos, purificación de fungicidas, cuantificación de aflatoxinas en alimentos para ganado tales como cacao, maíz, algodón, antioxidantes de aceites y grasas, separación e identificación de polifosfatos y ácidos orgánicos, ácido cítrico o ácido láctico, usados como aditivos en productos cárnicos y actividad antioxidante (López y Valadez, 2008).

3.2.2. Cromatografía de Gases (CG)

En la CG se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamada gas portador. En cromatografía gas-líquido, la fase líquida es un líquido no volátil que recubre la pared interior de la columna, mientras que en la cromatografía gas-sólido el analito se adsorbe directamente sobre las partículas sólidas de la fase estacionaria. La muestra se inyecta a través de un septo (diafragma de silicona), en un inyector caliente en cuyo interior se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador que puede ser He, N₂ o H₂ y los analitos después de

separados llegan al detector cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o registrador. La columna debe estar lo suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan en un tiempo razonable (Harris, 2007).

Las principales ventajas de la CG son su alta resolución, rapidez, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos, necesita de pequeñas cantidades de la muestra (microgramos y miligramos en ocasiones); sus desventajas son que las muestras deben ser volátiles o capaces de volatilizarse, muestras puras, la presencia de compuestos con mismos tiempos de retención que impiden su identificación. Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizado en la separación de diversos componentes de origen biológico, bioquímico, farmacéutico, alimentario, toxicológico y ambiental. Algunos ejemplos prácticos que se tienen son: proteína del suero afectado por las altas presiones hidrostáticas, la degradación de limoneno por *Bacillus stearotherophilus*, determinación de antocianinas en zarzamora (*Rubis occidentales*), efecto de nitritos en oxidación de productos volátiles a partir de croleína en productos cárnicos curados, la calidad de aceite de maíz con base en el contenido de ácidos grasos y β -caroteno, así como antioxidantes naturales y principios amargos en aceite de oliva virgen (López y Valadez, 2008).

3.2.3. Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas (CG-MS)

La cromatografía de gases (CG) se puede combinar con otras técnicas espectroscópicas como la espectrometría de masas (MS) o espectroscopía infrarroja (IM), proporcionando de esta manera una poderosa herramienta para la identificación de compuestos de una mezcla compleja. El procedimiento más usado para la identificación y cuantificación de componentes volátiles en los AE, es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masa (Marcano y Hasegawa, 2002). En la Cromatografía de Gases-Masas, el cromatógrafo se encuentra acoplado al espectrómetro de masas de manera que los analitos separados, anteriormente, en la columna cromatográfica penetran directamente

en la cámara de ionización registrándose así el espectro de masas de cada uno de ellos (Climent *et al.*, 2005).

El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector que permite analizar el compuesto químico. Se identifica cada uno de los compuestos mediante librerías (base de datos) comerciales (Marcano y Hasegawa, 2002).

4. Enfermedades transmitidas por los alimentos

La seguridad o inocuidad de los alimentos es un requisito al que deben conceder la máxima prioridad tanto las instituciones públicas como las industrias alimentarias (Piedrola, 2002), ya que el aumento de la densidad poblacional genera una mayor dependencia de la producción de alimentos y por lo tanto se incrementa la probabilidad de registrar casos de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's), las cuales tienen graves consecuencias en la salud, causando principalmente trastornos en el tubo intestinal, dolores abdominales, diarrea y vómito (Bello, 2005).

Las ETA's se dividen en dos categorías: A) Enfermedades ocasionadas por la ingestión de bacterias vivas en una dosis propicia para el crecimiento y multiplicación en el alimento, y B) enfermedades ocasionadas por la absorción de toxinas sintetizadas por microorganismos durante su crecimiento sobre un alimento (Pascual, 2005). No se conoce la incidencia exacta de las ETA's debido a las limitaciones inherentes de los sistemas de información epidemiológica. De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), las ETA's son consideradas enfermedades de carácter relevante para la salud pública en México debido a que generan costos substanciales para los enfermos, los productores de alimentos y la economía nacional, por lo cual son constantemente monitoreadas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Casos de enfermedades potencialmente transmitidas por alimentos en México de 1996 a 2000.

Padecimiento	1996	1997	1998	1999	2000
Cólera	1,088	2,356	71	9	5
Fiebre Tifoidea	9,149	12,608	11,546	8,893	7,567
Paratifoidea y Otras Salmonelosis	151,895	192,967	215,155	181,239	99,722
Shigelosis	32,256	38,140	45,372	39,029	36,397
Intoxicación alimentaria bacteriana	48,267	51,820	35,081	42,661	31,665

Fuente: SINAVE, 2010.

Las bacterias más frecuentemente asociados a enfermedades alimentarias son *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella*, *Bacillus cereus*, *Campilobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, entre otras. Dentro de las toxinas destacan las enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Cuadro 5). Estos llegan a los alimentos mediante agua contaminada, tierra, aire, fauna nociva, entre otros (Bravo, 2004).

Cuadro 5. Algunos agentes causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's).

Agente causante (enfermedad)	Alimentos típicos transmisores	Contaminación
<i>B. cereus</i> (intoxicación alimentaria, diarreico)	Productos cárnicos, sopas, salsa, vegetales	De la tierra o el polvo
<i>C. perfringens</i> (intoxicación alimentaria)	Pollo y carne de res cocidos	De la tierra y alimentos crudos
Enterotoxina de <i>S. aureus</i> (intoxicación alimentaria)	Jamón, productos cárnicos y avícolas, pastelería rellena de crema, mantequilla batida y queso.	Operarios con resfriados, dolor de garganta o cortadas que estén infectadas, rebanadoras de carne
<i>E. coli.</i> (infecciones enterotoxigénicas)	Alimentos crudos	Contaminación fecal humana, directa o a través del agua
<i>Salmonella</i> (salmonelosis)	Huevos crudos o mal cocinados, leche, carne y pollo crudos	Alimentos de origen animal, infectados y heces humanas

Fuente: Knabel, 2010.

5. Actividad antimicrobiana de extractos derivados de plantas

Aproximadamente el 20% de las plantas en el mundo han sido sometidas a evaluaciones biológicas y/o farmacológicas generando una cantidad considerable

de nuevos antibióticos (Suffredini *et al.*, 2004); estas evaluaciones tienen la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos y para el control de contaminación microbiológica (Acosta *et al.*, 1998).

El proceso para encontrar productos naturales, derivados de plantas, con actividad antimicrobiana implica el examen de los extractos de alguna parte de la planta de interés en ensayos *in vitro*, seguido de un bioensayo con fraccionamiento guiado con extractos activos y por últimos el aislamiento y purificación de los activos constituyentes (Cragg y Newman, 2005). Los organismos internacionales, Federation of Drugs and Foods (FDA), International Committee for Susceptibility Test (ICS), National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y Center for Disease Control (CDC), proponen que las técnicas para ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos sean una difusión en medio sólido con discos de carga constante (Kirby-Bauer) dos de dilución, en medio sólido y líquido, respectivamente, en las cuales se utiliza una gama de concentración del antimicrobiano, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) o menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano; la elección de la técnica depende en gran medida del material disponible y de la experiencia del personal del laboratorio, para asegurar la exactitud y reproducibilidad (García *et al.*, 1997).

5.1. Difusión en agar

Es el método de elección en el laboratorio por su sencillez, su exacta reproducción, su fácil ejecución, la facilidad de lectura y la fiabilidad de sus resultados. Este método consiste en inocular masivamente una placa de agar con el microorganismo de interés; el extracto impregnado en el disco de papel filtro difunde en el medio y después de un tiempo determinado, el microorganismo se desarrolla en toda la placa excepto alrededor de los discos, en el caso de que el extracto presente actividad antimicrobiana. La lectura se lleva a cabo midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento con una regla, esta medida se

expresa en mm, clasificando al microorganismo en sensible o resistente de acuerdo con el diámetro crítico establecido. El diámetro del halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo: su tamaño está influenciado por el grosor del medio de cultivo, la concentración o densidad del inóculo, la carga del disco, entre otros (García *et al.*, 1997). La correlación diámetro/CMI no se efectúa en términos cuantitativos, porque la técnica no es lo suficientemente exacta como para permitir cuantificar con precisión las CMI en relación a los halos de inhibición producidos (Prats, 2005).

5.2. Dilución en agar

En el método de dilución en agar, el agente antimicrobiano es incorporado en el medio de cada placa que contenga una concentración diferente del mismo. El inóculo puede ser aplicado rápida y simultáneamente a la superficie del agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. Las placas inoculadas se dejan reposar hasta que el inóculo se absorba completamente y luego se incuban en condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo (Hood *et al.*, 2003).

La CMI representa la menor concentración del antimicrobiano capaz de producir inhibición total del crecimiento. Es un método adecuado para probar muchas cepas simultáneamente; presenta mejor reproducibilidad que el método de dilución en caldo; sus desventajas incluyen el trabajo requerido para preparar las placas de dilución en agar (García *et al.*, 1997).

5.3. Dilución en caldo

Este método es apropiado para el estudio simultáneo de varios antimicrobianos frente a un microorganismo (García *et al.*, 1997). En esta prueba, los tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico o extracto. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la CMI es determinada tomando en cuenta la menor concentración del antibiótico o extracto a la cual se produce inhibición total del microorganismo (Palavecino, 1997).

5.4. Epsilon-test (E-test).

Este método ha sido desarrollado más recientemente y representa una sofisticada combinación de los métodos descritos anteriormente. El E-test es más simple que otros métodos para obtener una CMI. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0,016 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hasta 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el microorganismo en estudio. Después de incubar la placa por 16 a 18 horas, se forma un área de inhibición de forma elíptica, donde la concentración mínima inhibitoria será la concentración del antibiótico o extracto, localizado en la tira, donde intercepte el halo de inhibición (Palavecino, 1997). El E-test es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución. Es una técnica con características intermedias entre las técnicas de difusión y dilución (Prats, 2005).

5.5. Bioautografía

Es usado como una técnica de selección, representa la única forma de descubrir antibióticos en extracto crudos que han sido fraccionados en cromatogramas de capa fina o de papel, ya sé que se basa en el efecto inhibitorio o promotor del crecimiento del microorganismo expuesto a las fracciones del extracto o antibiótico (Touchstone, 1992). Dicha técnica es la combinación del método de difusión en agar y la cromatografía, ya que consiste en colocar la placa cromatográfica que contiene a los extractos previamente eluidos, sobre una placa de agar. Después se vierte el agar líquido que contiene la suspensión bacteriana de determinada densidad, de tal forma que el agar líquido cubra la placa cromatográfica, posteriormente se somete a un periodo de incubación y se observan las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano (Ramírez y Díaz, 2007).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana y la composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Malvaviscus arboreus* Cav., *Pimenta dioica* (L.) Merr., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Psidium guajava* L. y *Tradescantia pendula* var. *Zebrina* frente a tres bacterias patógenas.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales por el método de difusión en agar.
- Identificar las componentes activos de los aceites esenciales mediante el método de Bioautografía.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de los aceites esenciales utilizando el método de microdilución en placa.
- Caracterizar la composición química preliminar de los aceites esenciales mediante cromatografía de gases acoplada a masas.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Acondicionamiento de la materia prima

El material vegetal, tulipancillo, pimienta, nance, guayaba y matalí, se adquirió durante el mes de Septiembre en el mercado “José María Pino Suárez” de Villahermosa, Tabasco. Durante la limpieza de las hojas, se eliminaron las que estaban incompletas y/o con algún color diferente al característico de cada especie; a continuación se realizó el proceso de lavado mediante inmersión en agua purificada durante tres minutos, repitiéndolo tres veces con el fin de eliminar restos de suciedad, insectos, larvas y huevecillos; el agua residual se eliminó mediante una centrífuga manual para vegetales. Posteriormente, para secar las hojas se esparcieron sobre papel de estraza, protegidas de la luz (sombra) a una temperatura promedio de 32 °C. Una vez completado el secado, se redujo el tamaño de partícula en un molino de martillos y sucesivamente se tamizó en una malla número 60. Finalmente se envasó en bolsas de polietileno almacenadas en recipientes de tereftalato de polietileno (PET) de boca ancha en un lugar fresco y seco.

4.2. Extracción de aceite esencial

Los aceites esenciales se obtuvieron de las hojas de las especies vegetales de interés por la técnica de hidrodestilación empleando el equipo tipo Clevenger. En el matraz de bola se colocaron 500 g de muestra molida y 3 L de agua destilada la cual se mantuvo a 100 °C durante 7 h. El destilado se recolectó en frascos de vidrio de 250 mL cubiertos de papel aluminio. Posteriormente, el aceite esencial se separó del producto destilado adicionando hexano residual, en un embudo de separación; dicho aceite se depositó en frascos de color ámbar, evaporándose el hexano residual mediante una corriente de gas nitrógeno, y se almacenó a 4 °C (Toncer *et al.*, 2010).

4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

4.3.1. Activación de la cepa y ajuste del inóculo

La activación de las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 4028) y *Bacillus cereus* (ATCC 11778) se realizó en cajas Petri con Agar Trypticaseína de Soya (TSA) por estrías múltiples; se incubó a 28°C durante 24 h y, después de la incubación se realizó la propagación del microorganismo en cajas Petri con Agar TSA sembrando por estrías para su posterior uso en los bioensayos. El inóculo de la bacteria correspondiente utilizada para los ensayos, se preparó ajustando al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland equivalente a 1×10^8 UFC mL⁻¹.

4.3.2. Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Moulari *et al.* (2006), para lo cual se utilizaron discos de papel filtro Whatman No.1 estériles previamente impregnados con 10 µL de la solución que se obtuvo de disolver 0.005 g del aceite esencial en 1 mL de hexano, como control positivo se utilizó 10 µL de solución de amikacina al 1% y 10 µL de hexano como control negativo; posteriormente, se distribuyó cada uno de los discos de papel filtro en una caja Petri con agar TSA, previamente inoculada con 0.1 mL de la bacteria correspondiente. Las cajas Petri se incubaron a 37°C durante 24 h y después de este tiempo con el Vernier se realizó la medición del diámetro de la zona de inhibición de crecimiento producto de la acción antimicrobiana de los aceites esenciales diluidos.

4.3.3. Identificación de los componentes activos de los aceites esenciales mediante el método de Bioautografía

En seguida, de una solución diluida de cada aceite esencial al 2% en hexano (0.002 g del aceite esencial en 1 mL de hexano) se tomaron 10 µL con ayuda de una pipeta automática y se impregnó el punto de referencia de cada muestra en dos placas de cromatografía en capa fina (CCF, fase normal), las cuales se eluyeron en un sistema de hexano-acetona (80:20). Una vez finalizada la elución,

a una placa de CCF, que se utilizó como referencia, no se le impregnó los controles, amikacina al 1 % y hexano, y la placa fue revelada con ácido fosfomolibdico; mientras que la otra placa de CCF si se le impregnaron dichos controles y se depositó en una caja Petri con 15 mL de TSA. Posteriormente, se tomó 0.3 mL de la suspensión bacteriana con 1×10^8 UFC mL⁻¹ el cual se mezcló en 30 mL de agar TSA (previamente desgelificado y atemperado), se agitó suavemente y se midieron 10 mL de la suspensión en un tubo Falcon, teniendo una concentración final de 1×10^6 UFC mL⁻¹, que se adicionaron sobre la placa cromatográfica cuidando de cubrir totalmente la misma. Una vez que gelificó el agar TSA, la placa se dejó incubando en una estufa bacteriológica durante 24 h a 37 °C. Cuando finalizó el periodo de incubación se inició la fase de revelado, para la cual se adicionaron 3 mL de cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (MTT) al 1% a la placa y se dejó en agitación constante dentro de un orbitador durante una hora. La presencia de bacterias vivas se observó por la coloración rojo intenso; se evaluó la presencia de los halos de inhibición y se comparó con la placa cromatográfica revelada con ácido fosfomolibdico para corroborar la presencia de fracciones con actividad antimicrobiana registrando su R_f (referencia frontal) (Moulari *et al.*, 2006).

4.3.4. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida por el método de microdilución en placa

Primeramente se inoculó *S. aureus*, *S. typhimurium* y *B. cereus* en Caldo Mueller Hinton (MHB) ajustando la turbidez al patrón 0.5 del Nefelómetro de MacFarland. Por otra parte, se diluyó el aceite esencial de cada muestra al 2% en Dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, se procedió a llenar los pozos de una microplaca estéril: a la primera columna de los pozos se le adicionaron 190 µL de caldo MHB y 10 µL del aceite esencial diluido, el resto de los pozos se llenaron con 100 µL de caldo MHB. Seguidamente, con la ayuda de una pipeta multicanal, se agitó 2 veces en sentido horario, succionando y depositando de nuevo dentro del mismo pozo; este procedimiento se repitió cinco veces con la finalidad de

mezclar homogéneamente el aceite esencial con el medio MHB; después se transfirieron 100 μL de esta mezcla a la siguiente columna de pozos y así sucesivamente hasta la columna de pozos que contiene la última concentración del aceite esencial, descartando los últimos 100 μL de la dilución. En el caso de los controles, en los pozos del control positivo, se adicionaron 98 μL de medio MHB, 2 μL de amikacina al 1% y 100 μL del microorganismo a evaluar con una concentración de 1×10^8 UFC mL^{-1} . Los pozos de control negativo de DMSO, se llenaron con 190 μL de medio MHB más 10 μL de DMSO y 100 μL del microorganismo a la concentración anteriormente citada. Con respecto al control negativo del microorganismo, se adicionaron 100 μL de medio MHB y 100 μL del microorganismo a la concentración anteriormente citada y, por último, los pozos que contenían el control negativo se llenaron con 200 μL de medio MHB. La concentración final de los AE quedó comprendida en un rango de 20 mg mL^{-1} , 10 mg mL^{-1} , 5 mg mL^{-1} , 2.5 mg mL^{-1} , 1.25 mg mL^{-1} , 0.62 mg mL^{-1} , 0.31 mg mL^{-1} y 0.0156 mg mL^{-1} . La microplaca se incubó a 37 °C durante 18 h (Andrews, 2001). Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se observó visualmente la presencia de turbidez en los pozos y se adicionaron 100 μL de MTT al 1%. La presencia de las bacterias vivas se confirmó por una coloración roja según la técnica realizada por Andrews (2001). Posteriormente, para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se realizó una réplica de la microplaca tomando 1 μL de cada pozo y se depositó en una caja con medio MHB la cual se incubó a 37 °C durante 24 h observando la presencia o ausencia de bacterias (Taylor *et al.*, 1983).

4.3.5. Identificación de compuestos en los aceites esenciales por cromatografía de gases- espectrometría de masas

Se utilizó un cromatógrafo de Gases Marca Agilent Technologies 6890N acoplado a un detector selectivo de masas 5973N. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: inyección de modo Split: 1 μL del AE a una concentración de 1% en hexano en una columna HP5 MS Fenil, con diámetro interno de 0.25 mm y

longitud de 30 m, empacada con metil silicona; como gas acarreador se utilizó Helio grado cromatográfico, a flujo constante de 1 mL min⁻¹. Las muestras se analizaron a una temperatura inicial de 60 °C por min después de la inyección, incrementando a 260 °C con un gradiente de 10 °C por minuto. La identificación de los compuestos en el aceite Split se realizó mediante la comparación entre los patrones de fragmentación de cada compuesto y los compuestos de la biblioteca NIST 02L (Palá-Paúl *et al.*, 2005; Palá-Paúl *et al.*, 2007; Raseetha *et al.*, 2009).

4.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico.

Para la actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar, se realizó un diseño completamente al azar con una distribución factorial 4x3: Cuatro especies vegetales: tulipancillo, pimienta, nance y guayaba; tres microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*) con un total de 12 tratamientos, con tres repeticiones. Para determinar si existían diferencias significativas en cada uno de los tratamientos, se realizó un análisis de varianza y se aplicó la prueba de comparaciones de medias de Tukey al nivel de significancia del $\alpha \leq 0.05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción de aceite esencial

El rendimiento de aceite esencial AE de las hojas de las especies vegetales estudiadas se presenta en el Cuadro 6 encontrando que el mayor rendimiento fue para *Malvaviscus arboreus* 0.043±0.016 % y en, orden decreciente, *Pimenta dioica* 0.027±0.005%, *Psidium guajava*. 0.011±0.006%, *Byrsonima crassifolia* 0.004±0.004% y *Tradescantia pendula* var *Zebrina* 0%.

Cuadro 6. Rendimiento (%) de los aceites esenciales.

Especie vegetal	Rendimiento de AE (%)
Pimienta (<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.)	0.027±0.005
Nance (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth)	0.004±0.004
Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	0.011±0.006
Matali (<i>Tradescantia pendula</i> var. <i>Zebrina</i>)	0.0
Tulipancillo (<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.)	0.043±0.016

Todos los datos están expresados en base a la media ± desviación estándar (n=3). El porcentaje están en masa/masa (mg de AE/ 100g de material vegetal seco).

Un porcentaje inferior fue determinado por Boughalleb *et al.* (2005), para el aceite esencial de la hojas de tulipancillo con un rendimiento de 0.005%, destacando que dicho aceite esencial fue obtenido el método de arrastre de vapor, siendo ocho veces más bajo a lo determinado en el presente trabajo (0.043%). Para el caso del aceite esencial de la hoja de pimienta se ha reportado rendimientos de 0.7-2.9% (Rao *et al.*, 2010), destacando que el aceite esencial fue obtenido por arrastre de vapor, valor que es mayor a lo determinado en este estudio. Por otra parte, Aparecida de Oliveira *et al.* (2009), reportaron un rendimiento de 1.02% para la hoja de la misma especie cultivada en Brasil, secadas en una estufa de ventilación forzada a 50 °C durante 5 h, siendo un valor mayor al obtenido en la presente investigación. Con respecto al rendimiento de los aceites esenciales de las hojas de guayaba y nance no se encontraron datos en la literatura consultada acerca de

dicho parámetro. Debido a que en las hojas de matalí no se obtuvo rendimiento de aceite esencial, se decidió descartar esta especie de los análisis posteriores.

5.2. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

5.2.1 Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar

Los aceites esenciales de las hojas de las cuatro especies vegetales presentaron actividad antimicrobiana tanto para *Staphylococcus aureus* como *Bacillus cereus*, con halos de inhibición de 8.0 ± 1.7 mm hasta 17.06 ± 2.9 mm y 13.46 ± 2.2 mm hasta 18.16 ± 3.2 mm, respectivamente; Sin embargo, *Salmonella typhimurium* presentó mayor susceptibilidad al aceite esencial de la hoja de *Malvaviscus arboreus* Cav. y *Pimenta dioica* L. Merr. presentando halos de inhibición de 21.8 ± 0.8 mm y 19.46 ± 5.1 mm, respectivamente (Cuadro 7), valores semejantes a los registrados para el control, amikacina, el cual registró un diámetro de inhibición de 22.83 ± 2.7 mm. El microorganismo que presentó mayor sensibilidad a los aceites esenciales de las hojas de las cuatro especies estudiadas fue *Bacillus cereus*. Mientras que *Salmonella typhimurium* fue susceptible al aceite esencial de la hoja de *Pimenta dioica* (L.) Merr. y *Malvaviscus arboreus* Cav.

Cuadro 7. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar de los AE.

Aceite esencial al 5%	Halos de inhibición (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Pimienta</i> (<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.)	$17.06^c \pm 2.9$	$19.46^c \pm 5.1$	$13.46^c \pm 2.2$
<i>Nance</i> (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth)	$15.3^c \pm 5.2$	0.0	$18.16^c \pm 3.2$
<i>Guayaba</i> (<i>Psidium guajava</i> L.)	$8.0^a \pm 1.7$	0.0	$13.8^b \pm 1.2$
<i>Tulipancillo</i> (<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav)	$10.0^a \pm 2.0$	$21.8^c \pm 0.8$	$14.2^b \pm 1.5$
Amikacina 1%	$23.83^d \pm 2.7$	$22.83^d \pm 2.7$	$28.96^d \pm 2.2$

Todos los datos están expresados en base a la media \pm desviación estándar (n=3).

Letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$).

En estudios realizados por Gouvech y Girova (2009) con AE comercial de hojas de *Pimenta dioica* (L.) Merr, reportaron que *S. aureus* presentó un halo de inhibición de 41.7 mm mientras que el valor obtenido en el presente estudio fue menor (17.06 ± 2.9 mm) debido a que se utilizó el AE crudo. Sin embargo, Girova *et al.* (2010) reportaron que el AE de las hojas de *Pimenta dioica* L. inhibieron el crecimiento de bacterias Gram positivas con un halo de inhibición de 12-13.7 mm y para Gram negativas de 10-11 mm, al comparar con los resultados obtenidos se observan los halos de inhibición fueron mayores para Gram positivas (*B. cereus* y *S. aureus*) entre 13 y 17 mm, y de igual manera para la bacteria Gram negativa (*S. typhimurium*) que presentó un halo de inhibición de 19 mm. Para las otras especies vegetales no se reportan datos en la literatura.

5.3. Identificación de los componentes activos de los aceites esenciales mediante el método de Bioautografía

En el cuadro 8 se muestran las referencias frontales (R_f) para los AE estudiados. En el aceite esencial de la hoja de pimienta se encontró un compuesto (fracción 4) con un R_f de 0.42 cm y con actividad antimicrobiana frente a los tres microorganismos estudiados (*Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*) mientras que para *Staphylococcus aureus* también fue activa la fracción 3 con un R_f de 0.34 (Figura 2). El aceite esencial de la hoja de tulipancillo solo presentó una banda de inhibición de crecimiento en *Staphylococcus aureus* sin definirse fracciones específicas (Figura 2). No obstante, el aceite esencial de la hoja de guayaba presentó tres fracciones de inhibición referentes a los compuestos 2, 3 y 4 (R_f de 0.5, 0.56 y 0.68 cm, respectivamente). Por otra parte, los AE de las hojas de nance y tulipancillo mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* sin fracciones definidas. Es importante mencionar que podría existir un sinergismo en los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas de nance y guayaba frente a *Bacillus cereus* debido a que dichos aceites esenciales presentaron actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar pero evaluando las fracciones de

ambos AE por el método de bioautografía ninguno presento actividad. El aceite esencial de las hojas de Tulipancillo también podría presentar el mismo efecto pero para *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus* ya que las fracciones generadas por el método de autobiografía no presentaron actividad pero por el método de difusión en agar el aceite esencial si presento dicha actividad.

Cuadro 8. Referencias frontales en cromatografía en capa fina para cada fracción activa de los aceites esenciales.

Aceite esencial de hojas	R _f en cm		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Pimienta</i> (<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.)	Fracción 3 y 4 R _f : 0.34 y 0.42	Fracción 4 R _f : 0.42	Fracción 4 R _f : 0.42
<i>Tulipancillo</i> (<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav)	A	S.A	S.A
<i>Nance</i> (<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth)	A	S.A	S.A
<i>Guayaba</i> (<i>Psidium guajava</i> L.)	Fracción 2, 3 y 4 R _f : 0.5, 0.56 y 0.68	S.A	S.A

A= Activo, S.A= Sin actividad.

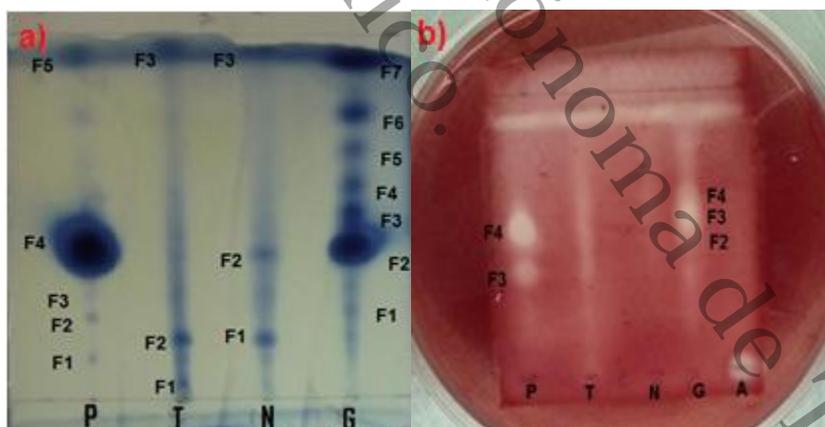


Figura 2. Placa de bioautografía de los AE de las especies vegetales frente a *S. aureus*. a) Placa cromatográfica revelada con ácido fosfomolibdico; b) Placa cromatográfica del bioensayo de bioautografía. (P: *Pimenta dioica* (L.) Merr, T: *Malvaviscus arboreus* Cav., N: *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, G: *Psidium guajava* L., A: Amikacina).

En el aceite esencial de las hojas de pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merr) obtenido por arrastre de vapor, Borgez-Argaez *et al.* (2010) reportaron que la fracción 4, con un Rf de 0.5 cm, inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, dato que concuerda con lo determinado en el presente estudio. Para las otras especies vegetales no se encontraron datos en la literatura consultada, siendo estos datos lo primeros reportes que se obtienen para los aceites esenciales de las hojas de *Malvaviscus arboreus* Cav., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth y *Psidium guajava* L.

5.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en placa

El microorganismo más susceptible a la presencia de los aceites esenciales de las hojas de *P. dioica* (10 mg mL^{-1}), *P. guajava* (5 mg mL^{-1}), *B. crassifolia* (20 mg mL^{-1}) y *M. arboreus* (20 mg mL^{-1}) fue *Bacillus cereus*. El aceite esencial de la hoja de *P. guajava* presentó la menor CMI (5 mg mL^{-1}) para inhibir el crecimiento de dicha bacteria seguido de *P. dioica* (10 mg mL^{-1}) y, por último *B. crassifolia* y *M. arboreus* a las concentraciones de 20 mg mL^{-1} (Cuadro 9). En el caso de *Staphylococcus aureus*, *P. dioica* (10 mg mL^{-1}), *B. crassifolia* (20 mg mL^{-1}) y *M. arboreus* (20 mg mL^{-1}) inhibieron su crecimiento, mientras que *Salmonella typhimurium* fue el microorganismo menos susceptible, ya que solo dos de ellos (*P. dioica* y *P. guajava*) inhibieron el crecimiento a concentraciones de 20 y 10 mg mL^{-1} , respectivamente.

Borgez- Argaez *et al.* (2010) reportaron que el aceite esencial de la hoja de *P. dioica*, obtenido por arrastre de vapor, presentó una CMI de 6.25 mg mL^{-1} frente a *Staphylococcus aureus*, por el método de microdilucion en placa, valor que es menor a lo obtenido en el presente estudio. Si bien no se encontraron reportes para el aceite esencial de las hojas de *Byrsonima crassifolia* referentes a la concentración mínima inhibitoria, el resultado reportado en el presente trabajo era de esperarse ya que diversas especies y estructuras de *Byrsonima* han mostrado actividad antimicrobiana. Rivero-Cruz *et al.* (2009) determinó que el extracto diclorometánico de corteza de *Byrsonima crassifolia* presentó actividad

antimicrobiana por el método de microdilución en placa, una CMI de 63 mg mL⁻¹ en contra de *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 9. Concentración mínima inhibitoria (mg mL⁻¹) de los aceites esenciales.

Aceites esenciales de hojas	CMI (mg mL ⁻¹) de aceite esencial		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Pimienta (<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.)	20	10	10
Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	10	S.A	5
Nance (<i>Byrsonima crassifolia</i> L. Kunth)	S.A	20	20
Tulipancillo (<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.)	S.A	20	20

CMI= Concentración mínima inhibitoria; S.A= Sin actividad.

Aunque no se encontraron datos reportados en la literatura consultada para el aceite esencial de hojas de *Psidium guajava*, existen reportes de extractos con otros solventes para *Psidium guajava*. que muestran actividad antimicrobiana por el método de microdilución. Rogéiro *et al.* (2005) reportaron que los extractos de *Psidium guajava* obtenidos por maceración (etanol: agua) de hoja, raíz y corteza presentaron en dicha actividad, valores de CMI de 0.5, 0.25 y 0.12 mg mL⁻¹, respectivamente, frente a *Staphylococcus aureus*. Barbieri *et al.* (2002) reportaron una CMI de 0.25 mg mL⁻¹ frente a *Staphylococcus aureus* con el extracto etanol-agua (90:10) de hojas de *Psidium guajava*. Analizando los datos anteriormente expuestos, se puede establecer que la hoja de *Psidium guajava* presenta compuestos con actividad antimicrobiana aun cuando la concentración evaluada (2% en DMSO) no es suficiente para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 1x 10⁸ bacterias mL⁻¹. Finalmente, no se encontraron datos en la literatura consultada para el aceite esencial de la hoja de *Malvaviscus arboreus*.

5.5 Concentración mínima bactericida (CMB) por el método de microdilución en placa

El aceite esencial de la hoja de *Pimenta dioica* presentó actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* a concentraciones de 20 y 2.5 mg mL⁻¹, respectivamente, mientras que *Salmonella typhimurium* requirió de una concentración de 20 mg mL⁻¹ de aceite esencial para mostrar efecto bacteriostático (Cuadro 10). Por otro lado, el aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* requirió de concentraciones de 5 y 10 mg mL⁻¹ del AE para presentar efecto bactericida en *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*; mientras que el aceite esencial de dicha especie demostró efecto bacteriostático para *Salmonella typhimurium* a la máxima concentración utilizada en el estudio (20 mg mL⁻¹). El aceite esencial de la hoja de *Byrsonima crassifolia* fue el menos efectivo para eliminar a las cepas de los microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*) ya que presentó efecto bacteriostático a una concentración de 20 mg mL⁻¹ mientras que *Malvaviscus arboreus* requirió de una baja concentración (5 mg mL⁻¹) del aceite esencial para eliminar a *Bacillus cereus*, no así para *Salmonella typhimurium* que requirió la máxima concentración de aceite esencial estudiada en el presente estudio (20 mg mL⁻¹) para eliminarlo. En el caso de *Staphylococcus aureus*, el aceite esencial requirió de 20 mg mL⁻¹ para presentar efecto bacteriostático.

Cuadro 10. Concentración mínima bactericida (mg mL⁻¹) de aceites esenciales.

Aceite esencial de hojas	CMB (mg mL ⁻¹) de aceite esencial		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	20 Bactericida	20 Bacteriostático	2.5 Bactericida
<i>Psidium guajava</i> L.	10 Bactericida	20 Bacteriostático	5 Bactericida
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	20 Bacteriostático	20 Bacteriostático	20 Bacteriostático
<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.	20 Bacteriostático	20 Bactericida	5 Bactericida

CMB= Concentración mínima bactericida.

5.6. Identificación de componentes por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

5.6.1. Composición química del aceite esencial de la hoja de *Pimenta dioica* (L.) Merr

En el aceite esencial de la hoja de *Pimenta dioica* (L.) Merr se identificaron 10 compuestos principales con un tiempo de retención (t_R) entre 6.61 y 30.20 min (Anexo 1); dentro de estos compuestos destaca el eugenol con un porcentaje del 94.86%, seguido del α -terpineol con 2.45% como compuestos mayoritarios, y en menor porcentaje el ester metílico del ácido cinámico con 1.06%, un compuesto no identificado con 0.90%, óxido de cariofileno con 0.72% y de 4-terpineol, eucalipto, cariofileno, α -selineno y β -selineno en una abundancia menor de 0.01% (Cuadro 11).

Cuadro 11. Compuestos del aceite esencial de la hoja de pimienta (*Pimenta dioica* L. Merr)

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Abundancia (%)
4-Terpineol	11.62	>0.01
Eucaliptol	6.61	>0.01
Cariofileno	21.24	>0.01
Óxido de cariofileno	27.51	0.72
Ester metílico del ácido cinámico	20.10	1.06
Eugenol	19.28	94.86
No identificado	30.20	0.90
α -Selineno	24.20	>0.01
α -Terpineol	12.18	2.45
β -Selineno	23.84	>0.01

Se ha reportado que el principal componente del aceite esencial de las hoja de *Pimenta dioica* (L.) Merr es el eugenol con una abundancia del 95% (Rao *et al.*,

2010) valor muy cercano a lo determinado en este trabajo. Jirovetz *et al.* (2007) también reportaron que el aceite esencial comercial de la hoja de *Pimenta dioica* L. Merr. contiene eugenol (76.02%), α -selineno (1.04%), 4-terpineol (0.19%), α -terpineol (0.09%) y β -selineno (0.52%). Aparecida de Oliveira *et al.* (2009) destacaron que el eugenol se mantiene como componente mayoritario en porcentajes de abundancia de 78.57 y 72.87 % para las condiciones de secado directo al sol y secado en estufa, respectivamente.

5.6.2. Composición química del aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L.

El aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L. presentó como compuestos mayoritarios (Cuadro 12): al eugenol (33.84%), cariofileno (7.08%), óxido de cariofileno (7.02%), β -bisaboleno (4.62%), longiborneol (4.33%) y nerolidol (3.48%). Su espectro de masas se puede consultar en el anexo 2.

Se ha reportado que el eugenol es uno de los principales componentes del aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* L., y que contiene, además, α -pineno, limoneno, mentol y compuestos volátiles como β -cariofileno, β -bisaboleno, cariofileno, β -copaeno y eucaliptol en menores porcentajes (Joseph and Priya, 2011). La mayoría de estos compuestos también formaron parte de la composición química del aceite esencial de la hoja de guayaba utilizado en el presente estudio. Por otro lado, Karin de Lima *et al.* (2010) reportaron como compuestos mayoritarios al selin-11-en-4- α -ol (22.19%), 1,8-cineol (12.83%), trans-cariofileno (8.89%), óxido de cariofileno (9.09%), guaieno (6.74%), α -selineno (5.79%) y cadinol (8.18%) en el aceite esencial de la hoja de *Psidium guajava* (variedad silvestre) haciendo hincapié en que dicha especie fue cultivada en Brasil.

Adam *et al.* (2007) también reportaron diferentes compuestos mayoritarios para la misma especie pero cultivada en Tahití, destacando al 1,8-cineol (4.85%), β -cariofileno (17.14%), cariofileno (0.24%), limoneno (6.41%), α -selineno (5.79%), cadinol (8.18%), nerolidol (5.02%), α -cadinol (12.36%), valenceno (14.90%) y biciclogermacreno (15.31%). Con los datos anteriormente expuestos, puede

mencionarse que las diferencias etnogeográficas establecen una variación entre la composición y la abundancia de los componentes químicos (Toncer *et al.*, 2010, Cristiani *et al.*, 2010, Powell y Raffa, 1999, Palá-Paúl *et al.*, 2005, Amna *et al.*, 2010, Mejía *et al.*, 2007, Quintero *et al.*, 2004).

Cuadro 12. Principales compuestos del aceite esencial de la hoja de guayaba (*P. guajava* L.)

Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Abundancia (%)
Acoradieno	22.97	0.55
Cariofileno	21.25	7.08
Cis α -bisaboleno.	24.65	2.02
Copaeno	19.50	0.53
Eugenol	19.17	33.84
Longiborneol	30.25	4.33
Nerolidol	27.06	3.48
Óxido de cariofileno	27.57	7.02
Selineno	24.22	4.0
α -Cariofileno	22.54	1.25
α -Terpineol	12.15	0.83
α -Bisabolol	31.41	0.47
β -Bisaboleno	24.89	4.62

5.6.3 Composición química del aceite esencial de la hoja de *Malvaviscus arboreus* Cav.

El análisis de GC-MS del aceite esencial de las hojas de tulipancillo (*Malvaviscus arboreus* Cav.) permitió identificar dos compuestos, el eugenol y diclorobenceno (Cuadro 13, Anexo 3), en abundancias menores a 0.01%. Se puede establecer que dicho aceite es pobre en compuestos aromáticos, razón por la cual no se pudieron analizar en el GC-MS, ya que son no volátiles. Es importante mencionar que no se han reportado estudios de aceite esencial de tulipancillo y sus componentes en la literatura consultada.

Cuadro 13. Composición química del aceite esencial de la hoja de tulipancillo (*M. arboreus* Cav)

Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Abundancia (%)
1-4-diclorobenceno	6.10	>0.01
Eugenol	19	>0.01

5.6.4. Composición química del aceite esencial de la hoja de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth.

El análisis por GC-MS del aceite esencial de la hoja de nance (*B. crassifolia* (L.) Kunth.) presentó un espectro de masas complejo (Anexo 4), donde se identificaron tres compuestos: el 1-4- diclorobenceno, curcumeno y 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metilbenceno en abundancias menores al 0.01% (Cuadro 14, Anexo 4). Este puede ser de los primeros reportes sobre la composición química de los aceites esenciales de esta especie, ya que en la literatura no se han reportado aceites esenciales de nance y la composición química del mismo.

Cuadro 14. Principales compuestos del aceite esencial de la hoja de nance (*B. crassifolia* (L.) Kunth).

Compuestos	Tiempo de retención (min)	Abundancia (%)
1-4-diclorobenceno	6.10	>0.01
1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metilbenceno	23.82	>0.01
Curcumeno	30.16	>0.01

VI. CONCLUSIONES

Pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merr.)

- El aceite esencial de la hoja de pimienta presentó actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar frente a *S. aureus* y *B. cereus*.
- El método de bioautografía permitió identificar en el aceite esencial de la hoja de pimienta fracciones que inhibieron el crecimiento de *B. cereus*, *S. typhimurium* y *S. aureus*.
- El eugenol es el principal componente del aceite esencial de la hoja de pimienta siendo analizado por cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-MS).

Guayaba (*Psidium guajava* L.)

- El aceite esencial de la hoja de guayaba ejerció actividad antimicrobiana frente *S. aureus* y *B. cereus* por el método de difusión en agar.
- Se identificaron fracciones activas en el aceite esencial de esta especie que inhibieron el crecimiento de *S. aureus*.
- El análisis de cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-MS) detectó que el principal componente del aceite esencial de la hoja de guayaba es el eugenol.

Nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth)

- El aceite esencial de la hoja de nance demostró tener actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar frente *S. aureus* y *B. cereus*.
- Por el método de bioautografía, el aceite esencial de la hoja de nance presentó actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* sin definir fracciones específicas.
- La composición química del aceite esencial de la hoja de esta especie está conformada por 1-4- diclorobenceno, curcumeno y 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metilbenceno, todos a la concentración mínima detectada por el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Tulipancillo (*Malvaviscus arboreus* Cav.)

- El mayor rendimiento de aceite esencial se obtuvo de la hoja de tulipancillo por el método de hidrodestilación.
- Dicho aceite es pobre en compuestos aromáticos, ya que contiene eugenol y diclorobenceno, compuestos identificados por cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-MS).
- El aceite esencial de la hoja de esta especie inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *B. cereus* por el método de difusión en agar.

- Por el método de bioautografía, el aceite esencial de la hoja de tulipancillo inhibió el crecimiento de *S. aureus* sin definir fracciones y/o componentes específicos.

Matali (*Tradescantia pendula* var. Zebrina)

- Por el método de hidrodestilación no se obtuvo aceite esencial de la hoja de matalí.

México.

de Tabasco.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta L., Menéndez R., Fuentes V., Rodríguez C., Hechevarría I., Carballo C. 1998. Instructivo Técnico del cultivo de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (orégano francés). Revista cubana de plantas medicinales, 3(1): 51-53.
- Adam F., Vahirua-Lechat I., Mitermite Y., Deslandes E., Menutt C.. 2007. Chemical composition of essential oils of leaves of *Psidium catleyanum* Sabine and *Psidium guajava* L. from Tahiti island (French Polynesia). 38th International Symposium on Essential Oils. 9-12 de Septiembre. Karl-Franzens-University of Graz, Austria.
- Amna T., Deepika S., Ganeshaiyah K. N., Shaanker R. U., Puri S., Qazi N. 2010. Changes in the essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. during annual growth from Kumaon Himalaya. Current Science, 98(8): 1010-1012.
- Andrews J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentration. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48(1): 5-16.
- Aparecida de Oliveira R., Vieira R. T., Kersul do Sacramento C., Pains D. L., Faustino de Oliveira F. 2009. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 19(3): 771-775.
- Arboretum UFM. 2007. *Malvaviscus arboreus*. Descargado directamente de <http://www.arboretum.ufm.edu/plantas/catalogo.asp?id=47<r=m&campo=NombreComun#47>.
- Argueta V. A., Cano A. L. M., Rodarte M. A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Tomos I, II, III. Instituto Nacional Indigenista, México. pp: 1786.
- Bandoni A. L. 2002. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). 2^a Edición. México. pp: 19-20.

- Barbieri F. H., Pessini G. L., Rogério N. S., García D. A. C., Vataru C. N., Dias Filho B. P. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7): 1-5.
- Bello G. J., 2005. Calidad de vida, alimentos y salud humana: fundamentos científicos. Ediciones Díaz de Santos, España. pp: 175-203.
- Borges-Argaez. R., Cáceres F. M., Reyes C. E. D., Zarrabal U. G. J., Espinosa M. J., Centurión H. D., Novelo P. J. I., Rocha U. J. A. 2010. Antimicrobial activities and composition of essential oils of *Pimenta dioica* L. Merr and *Plectranthus amboinicus* Lour obtained by supercritical CO₂ extraction and steam distillation. II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, PROSCIBA. Brazil.
- Bosquez-Molina. E., Bautista-Baños S., Morales-López. J. 2009. Essentials oils: Biopreservatives oh high potential in the food industry. *Revista Industria Alimentaria*. Enero/Febrero. 31(1):12-24.
- Boughalleb N., Débbabi N., Ben H. J., Mighri Z., El Mahjoub M. 2005. Antifungal activity of volatile components extracted from leaves, stems and flowers of four plants growing in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea.*, 44(3): 307–312.
- Bravo M. F. 2004. El manejo higiénico de los alimentos: guía para la obtención del distintivo H. Editorial Limusa, México. pp: 11-14.
- Buenz E. J. 2005. Country development does not presuppose the loss of forest resources for traditional medicine use. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:118–123.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223–253.
- Celis A., Mendoza C., Pachón M., Cardona J., Delgado W., Cuca L. E. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Agronomía Colombiana*, 26(1): 97-106.

- Centurión H. D., Cazares C. J., Espinosa M. J. 2004. Inventario de recursos fitogenéticos alimentarios de Tabasco. Colección José María Pino Suárez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. pp: 65 -155.
- Climent O. M. J., García G. H., Iborra C. S., Morera B. I. 2005. Experimentación en química: Química Orgánica, Ingeniería Química. Editorial Universidad Politécnica de Valencia, España. pp: 71-91.
- CONAFOR. 2009. Fichas técnicas para la reforestación. Última modificación: Webmaster (13/08/2009 a las 15:22). Descargado directamente de http://www.conafor.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=58&Itemid=129
- Costa, J. L., Cervera, S. M., Cunill F. G., Esplugas, S. V., Mans C. T., Mata J. A. 1991. Curso de ingeniería química. Editorial Reverte. pp: 49.
- Cragg M. G. and Newman D. J. 2005. Drug discovery and development from natural products: the way forward. 11th Natural Products Research Network for Eastern and Central Africa (NAPRECA) symposium book of proceedings, Madagascar. pp: 56-69.
- Cristiani Z. G., Amorim A. C. L., Hovell A. M. C., Rezende C. M., Nascimento I. A., Ferreira G. A., Garcia D. A. C. 2010. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules*, 15(8): 5509-5524.
- Douglas M, Heyes J, Smallfield B. 2005. Herbs, spices and essential oils: post-harvest operations in developing countries. Descargado de <http://www.fao.org/inpho/isma?m=library&txt=herbs&i=INPhO&p=SimpleSearchFrame&lang=en&op=or&n=1>
- García M. P., Fernandez del Barro M. T., Paredes S. F. 1997. Microbiología Clínica Practica. 3^{era} Edición. España. pp: 133- 149.
- George S., Brat P., Alter P., Amiot M. J. 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5): 1370-1373.

- Germosén-Robineau L. 2005. Farmacopea vegetal caribeña. Editorial Prosis, Unión Europea. pp: 485.
- Gil P. E., Saéz V. A. 2005. Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía "cero emisiones". Grupo de Investigación Procesos Ambientales y Biotecnológicos. Universidad EAFIT, Colombia. pp: 38.
- Girova T., Gochev V., Jirovetz L, Buchbauer G., Schmidt E., Stoyanova A. 2010. Antimicrobial activity of essential oils from spices against psychrotrophic food spoilage microorganisms. Second Balkan Conference on biology Special. Biotechnol. & Biotechnol. 21-23 de Mayo, Plodvid, Bulgaria.
- Gouchev V. K., Girova T. D. 2009. Antimicrobial activity of various essential oils against spoilage and pathogenic microorganisms isolated from meat products, XI Anniversary scientific conference, 23(2): 900-904.
- Gonzalez J. 2007. Malpighiaceae Juss. Catalogo: OET-PVFLO-000487. Flora Digital de Palo Verde. Organización para Estudios Tropicales.
- Guentert M. 2007. The flavor and fragrance industry-past, present and future in flavor and fragrances. In: Chapter 1. Chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer-Verlag, Alemania. pp: 1-14.
- Harris D. C. 2007. Análisis químico cuantitativo. 3^{era} edición. Editorial Reverte. España. pp: 548- 566.
- Herrmann A. 2010. The Chemistry and Biology of Volatiles. In: Chapter 1. Volatiles- An interdisciplinary Approach. John Wiley and Sons, United Kingdom. pp: 1-2.
- Hood J. R., Wilkinson J. M., Cavanagh H. M. A. 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. Journal of Essential Oil Research, 15(6): 428-433.
- Isaza G. M., Arango M. C. A., Buriticá O. P., Marulanda H. 2005. Determinación de la toxicidad subcrónica de la Zebrina péndula en ratones. Biosalud, 14: 67-77.

- Janardhanan M., Thoppil J. 2004. Herb and spice essential oils. Therapeutic, flavour and aromatic chemicals of Apiaceae. Editorial Discovery, India. pp: 20- 22.
- Jirovetz L., Buchbauer G., Stoilova I., Krastanov A., Stoyanova A., Schmidt E. 2007. Spice plants: Chemical composition and antioxidant properties of *Pimenta* Lindl. essential oils Part 1: *Pimenta dioica* (L.) Merr. Leaf oil from Jamaica. *Nutrition*, 31(2): 55-62.
- Joseph B., Priya R. M. 2011. Phytochemical and biopharmaceutical of *Psidium guajava* (L.) Essential oil: A review. *Research of Journal Medicinal Plants.*, 5(4): 432-442.
- Karin de Lima K., Cardoso M., Aparecida M. A., Nascimento E. A., Lemos de Moraes S. A., Lee D. N. 2010. Composition of the essential oil from the leaves of three domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(1): 41-44.
- Kim H-S. 2005. Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:37–39.
- Knabel S. J. 2010. Resumen de la situación científica: enfermedades transmitidas a través de los alimentos. Documento descargado directamente de <http://www.worldfoodscience.org/cms>.
- López H. E., Valadez V. A. 2008. Análisis cromatográfico en las ciencias agropecuarias. Colección Ángel Ramos Sánchez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. pp: 315.
- López L. M. T. 2004. Los aceites esenciales, aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Ámbito Farmacéutico*, 23 (7):88-91.
- Macia B. M. J. 1998. La pimienta de Jamaica [*Pimenta dioica* (L.) Merril, Myrtaceae] en la sierra norte de Puebla. 1998. *Anales jardín botánico de Madrid*, 56(2): 337-350.

- Mahady G. B. 2005. Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 2405-2427.
- Maldonado M. F. 2003. Flora medicinal de Tabasco. ISOPROTAB, UJAT. Tabasco, México. pp: 119.
- Marcano D., Hasegawa M. 2002. Fotoquímica Orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Venezuela. pp: 69-72.
- Martinez M. A., Evangelista V., Mendoza M., Basurto F., Mapes C. 2004. Estudio de la pimienta gorda *Pimenta dioica* (L.) Merril, un producto forestal no maderable de la sierra norte de Puebla, México. En: Capítulo 2: Productos forestales, medios de subsistencia y conservación, estudios de casos sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Centro para la Investigación Forestal Internacional, Volumen 3: pp: 23-41.
- Mejía O., Julio M., Sanchez M. S., Bonilla C., Vanegas P. 2007. Efecto de la altura y frecuencias de corte y secado en el rendimiento y calidad del aceite esencial de pronto alivio. *Scientia et Technica*, XIII (033): 253-255.
- Mendoza V. 2008. Informe Sectorial de la Industria de Alimentos y Bebida de Mendoza, México. pp: 29-31. Extraído desde www.idits.org.ar/.../publicaciones/Inf%20sectorial%20alimentos%20no%20conservados%20Mza%20-%20IDITS
- Moulari B., Pellequer Y., Lboutounne H., Girad C., Chaumont J., Millet J., Muyar, F. 2006. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavonone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). *Ethnopharmacology*, 106(2): 272-278.
- Ortuño S. M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones Aiyana, España. pp: 7-45.
- Palá-Pául J., Copeland L. M., Brophy J. J., Goldsack R. J. 2007. Essential oil composition of *Eryngium rosulatum* P.W. Michael ined.: A new undescribed species from eastern Australia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(11):796-801.

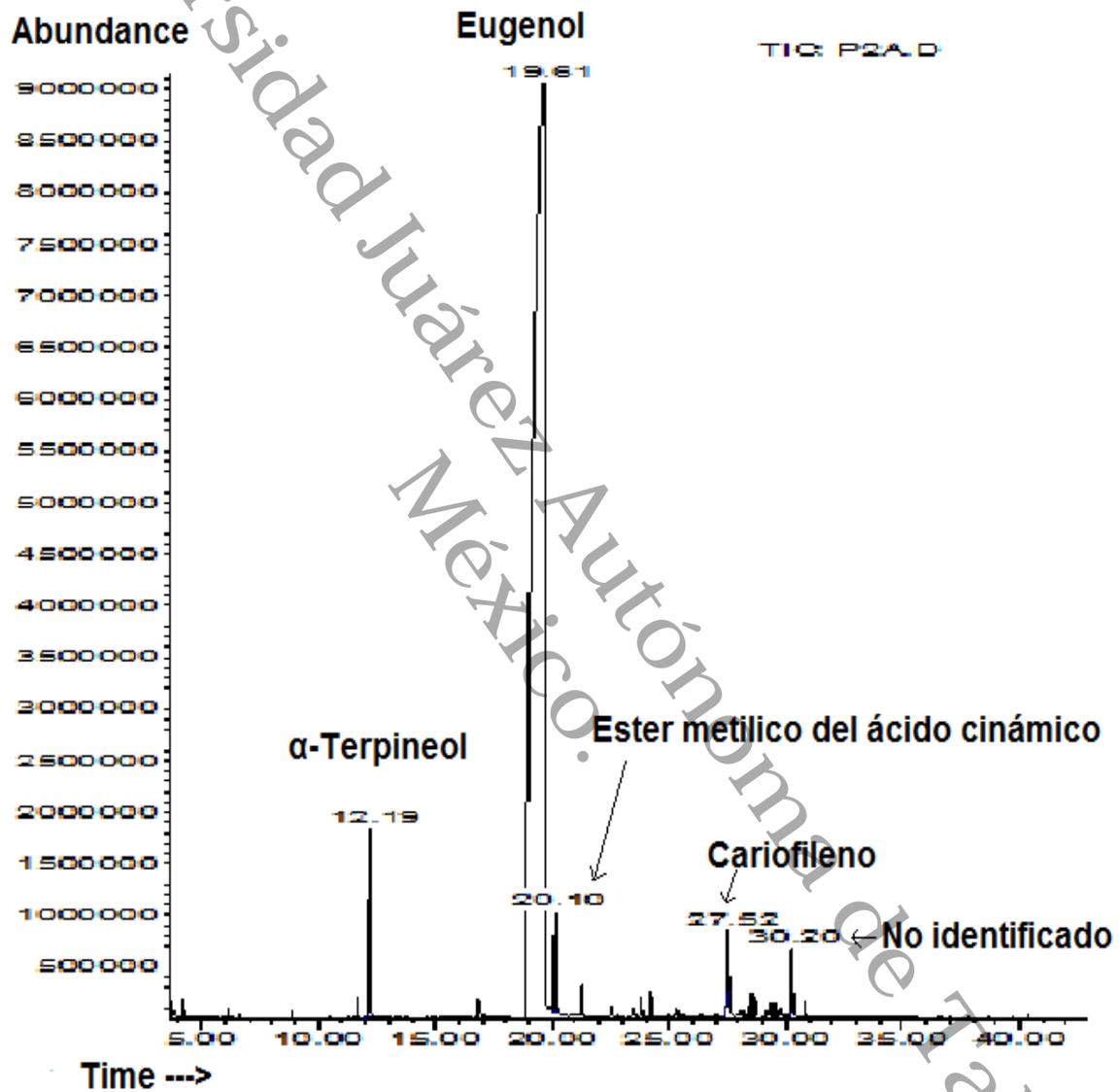
- Palá-Paúl J., Pérez-Alonzo J. M., Velasco-Negueruela A., Varadé J., Villa, A. M., Sanz J., Brophy J. J. 2005. Analysis of the essential oil composition from the different parts of *Erygium glaciale* Boiss from Spain. Journal of Chromatography, A1094(1-2): 179-182.
- Palavecino R. E. 1997. Interpretación de los estudios de susceptibilidad microbiana. Boletín de la Escuela de Medicina, 26:156-160.
- Pascual Anderson R. 2005. Enfermedades de origen alimentario: su prevención. Ediciones Díaz Santos. España. pp: 22-23.
- Piedrola G. G. 2002. Medicina preventiva y salud publica. 10ª Edición. Editorial Masson, España. pp: 371-372.
- Powell J. S., Raffa K. F. 1999. Sources of variation in concentration and composition of foliar monoterpenes in tamarack (*Larix laricina*) seedlings: roles of nutrient availability, time of season, and plant architecture. Journal of Chemical Ecology, 25(8):1771-1797.
- Prats G. 2005. Microbiología clínica. Editorial Panamericana. 1ª edición. Argentina. pp: 50-59.
- Primo E. Y. 1995. Química orgánica básica y aplicada. Tomo II. Editorial Reverte. España. pp: 852.
- Quintero C. A., González de Colmenares N., Staschenko E. 2004. Aceite esencial de las hojas de *hyptis umbrosa* salzm extraído por diferentes técnicas. Acta Científica Venezolana, 55(2): 181-187.
- Ramirez A. L. S., Diaz B. H. E. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). Scientia et Technica, 13(33):397-400.
- Rao, P. S., Sheth N. R., Jayaveera K. N., Rao S. K. 2010. Pharmacognostic standardisation of the leaves of *pimenta dioica* linn. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 1(9):110-115.
- Raseetha V. S., Cheng S. F., Chuah C. H. 2009. Comparative Study of Volatile Compounds from Genus Ocimum. American Journal of Applied Sciences, 6(3): 523-528.

- Restrepo M., Romeo P. Q., Fraume N. J. 2005. Manual: El milagro de las plantas. Aplicaciones medicinales y orofaríngeas. Editorial San pablo. Colombia. pp: 141.
- Ricker M., Daly D. C. 1998. Botánica económica en bosques tropicales, Principios y métodos para su estudio y aprovechamiento. Editorial Diana, México. pp: 115-123.
- Rivero-Cruz J. F., Sanchez-Nieto S., Benitez G., Casimiro X., Ibarra-Alvarado C., Rojas-Molina A. and Rivero-Cruz B. 2009. Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. Revista Latinoamericana de Química., 37(2): 155- 163.
- Rogério N. S., García D. A., Simone M. S., Celso Vataru C. N., Benedito Prado Dias B. P. F. 2005. An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.). Brazilian archives of biology and technology, 48(39): 429-436.
- Romero M. D. M., 2004. Tratado de aromaterapia científica. 1ª edición. Editorial Buenos aires. pp: 61-64.
- SINAVE. 2010. Documento descargado directamente de http://cofepris.salud.gob.mx/RevistaRED/portada2006enero/num4_art_4sec2.htm
- Skaria B. P., Joy P. P., Mathew S., Matew G., Joseph A., Joseph R. 2007. Aromatic plants. Chapter 1: History, importance and scope of aromatic plants. New indian publishing agency. India. pp: 1-2.
- Skoog D., West D., Holler F. 2001. Fundamento de química analítica. Volumen 2. 4ª edición. Editorial Reverte. España. pp: 730-732.
- Suffredini I. B., Sader H. S., Gonçalves A. G., Reis A. O., Gales A. C., Varella A. D. and Younes R. N. 2004. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. Brazilian journal of medical and biological research, 37(3): 379-384.
- Tajkarimi S.A., Ibrahim D.O., Cliver M. M. 2010. Review: Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9):1199–1218.

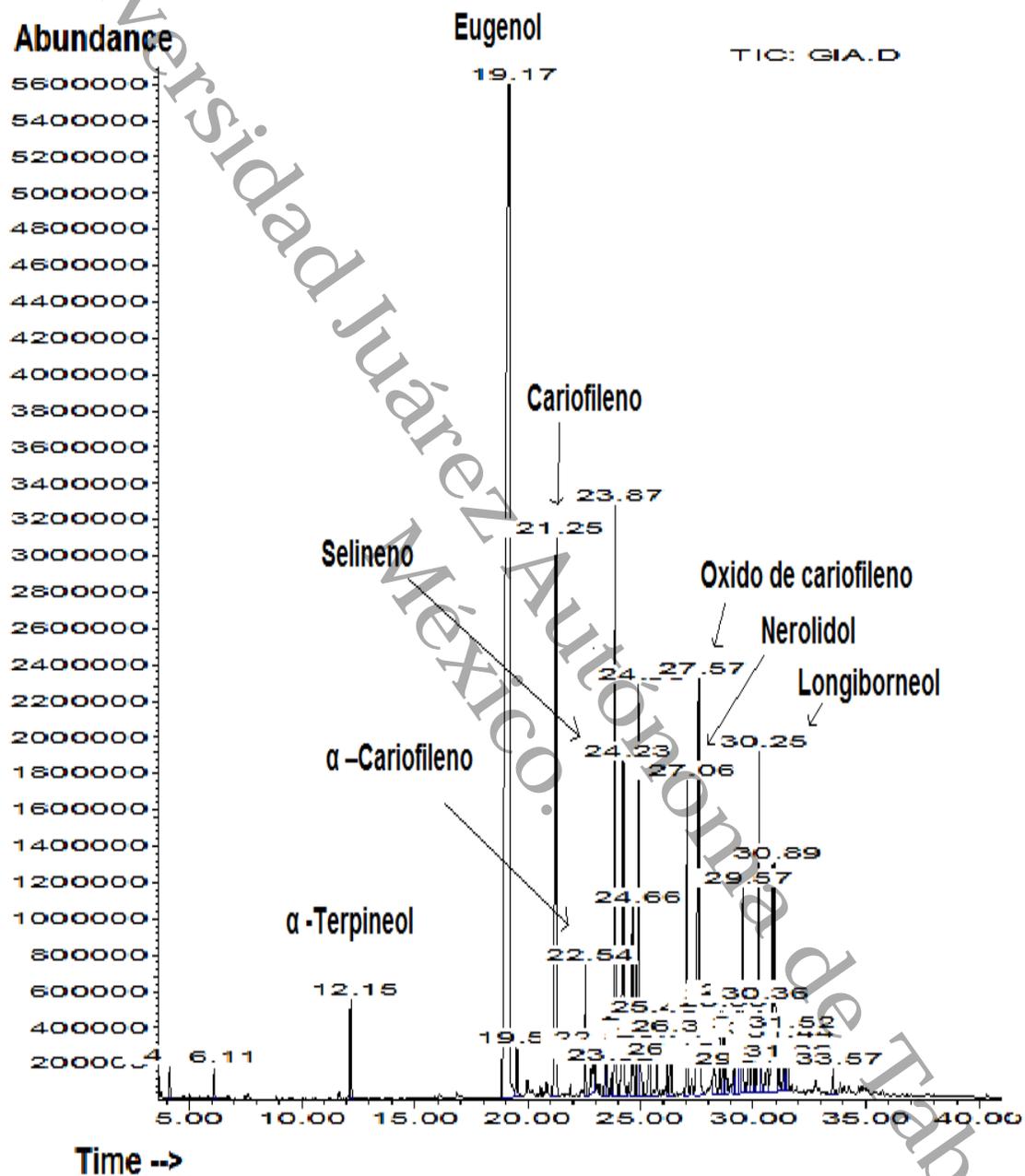
- Taylor P. C., Shoenknecht F. D., Sherris J. C., Linner E. C. 1983. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: Influence and significance of technical factors. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 23(1): 142-150.
- Toncer O., Karaman S., Diraz E. 2010. An annual variation in essential oil composition of *Origanum syriacum* from Southeast Anatolia of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(11):1059-1064.
- Touchstone J. C. Practice of thin layer chromatography. 1992. 3rd edition. Wiley-Interscience publication. USA. pp: 311-315.
- Velasco R. J., Villada H. S. y Carrera J. E. 2007. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1): 53-65.

VIII. ANEXOS

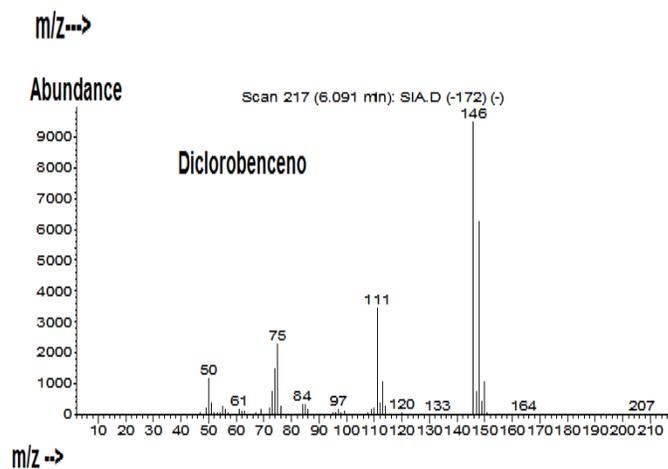
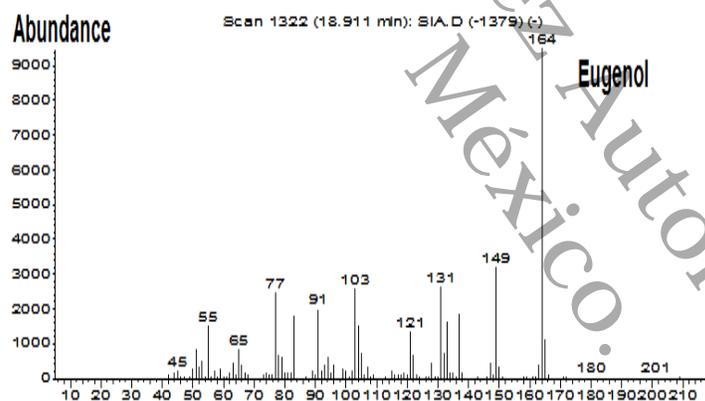
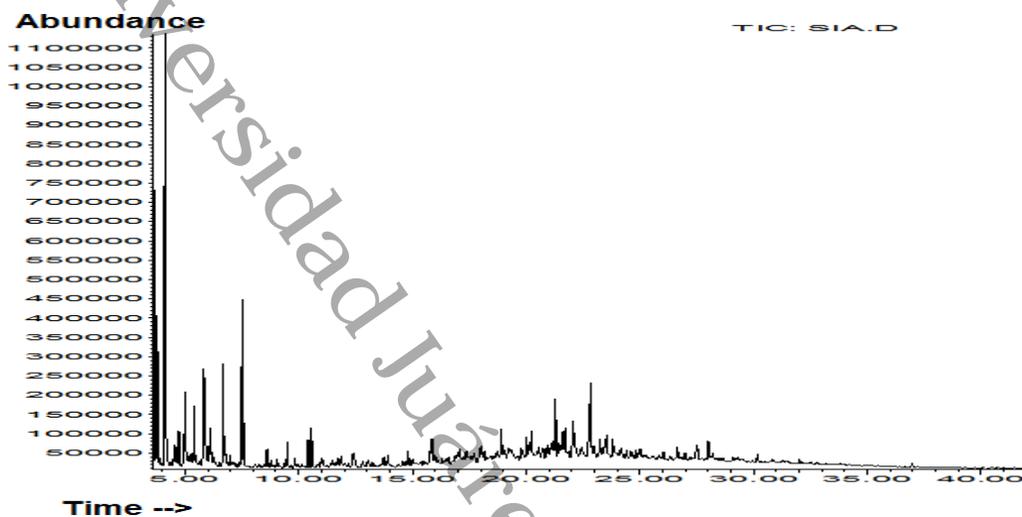
Anexo 1. Cromatograma del aceite esencial de la hoja de pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merr.)



Anexo 2. Cromatograma del aceite esencial de la hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.)



Anexo 3. Cromatograma del aceite esencial de la hoja de tulipancillo (*Malvaviscus arboreus* Cav.)



Anexo 4. Cromatograma del aceite esencial de la hoja de nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth.)

